

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

**Valoración de un protocolo de estimulación ovárica a base de FSH/LH vía epidural previo a la aspiración ecoguiada (OPU) en vacas Holstein mestizas**

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


**Autores:**

Kimberly Elizabeth Montaleza Guamán

Carina Graciela Vásquez Luna

**Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2025-09-01

### Resumen

La investigación se llevó a cabo en una sola granja comercial “La Zelanda”. El objetivo fue evaluar la respuesta ovárica a la estimulación con 250 UI de FSH/LH vía epidural en vacas Holstein mestizas. Se utilizaron 8 animales, los cuales fueron utilizados como testigo (T0) y tratamiento (T1) en momentos diferentes. Ambos tratamientos recibieron 0,4 mg de benzoato de estradiol (E2) + 25 mg de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) y un dispositivo intravaginal de 0,50 g de progesterona (DIV), en día 0. El día 4 T1 recibió 250 UI de FS/LH y T0 placebo. La aspiración folicular (OPU) se realizó el día 6. Se valoró el número y tamaño de folículos antrales (FA) visualizados el día de la OPU, así como el recuento y calidad de complejos cúmulo - ovocito (COC's) recuperados. El número de FA observados el día de la OPU fue similar en T0 ( $19,6 \pm 3,02$ ) y T1 ( $17,3 \pm 0,83$ ;  $p > 0,05$ ). Los animales de T1 mostraron un folículo dos veces más grande ( $9,0 \pm 0,18$  mm) que en T0 ( $4,6 \pm 0,20$  mm;  $p < 0,05$ ). La cantidad de COC's fue similar o igual entre T0 ( $93 \pm 1,85$ ) y T1 ( $102 \pm 0,64$ ;  $p > 0,05$ ), sin embargo, el porcentaje de recuperación presentó una diferencia entre T0 ( $59,2\% \pm 2,04$ ) y T1 ( $73,9\% \pm 2,55$ ;  $p < 0,05$ ), y el porcentaje de COC's aptos de T1 ( $72,4 \pm 4,9$ ) fue mayor que T0 ( $48,3 \pm 4,2$ ;  $p < 0,05$ ). En conclusión, la FSH/LH aplicada vía epidural no alteró el número de FA, pero permitió un crecimiento superior de los mismos, evidenciándose una mayor recuperación de COC's de mejor calidad.

*Palabras clave del autor:* complejo cúmulo-ovocito, folículos antrales, biotécnicas reproductivas



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

This study was carried out on a single commercial farm "La Zelanda". The objective was to evaluate ovarian response to epidural stimulation with 250 IU of FSH/LH in crossbred Holstein cows. Eight animals were used as controls (T0) and treatments (T1) at different times. Both treatments received 0,4 mg of estradiol benzoate (E2) + 25 mg of prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ), and a 0,50 g intravaginal progesterone device (IVD) on day 0. On day 4, T1 was administered 250 IU of FSH/LH, while T0 received a placebo. Follicular aspiration (OPU) was performed on day 6. The number and size of antral follicles (AF) visualised on the day of OPU, as well as the count and quality of recovered cumulus-oocyte complexes (COCs) retrieved. The number of AF observed on the day of OPU was similar in T0 ( $19.6 \pm 3.02$ ) and T1 ( $17.3 \pm 0.83$ ;  $p > 0.05$ ). Follicle diameter in T1 animals was twice as large ( $9.0 \pm 0.18$  mm) compared to T0 ( $4.6 \pm 0.20$  mm;  $p < 0.05$ ). The number of COCs was similar between T0 ( $93 \pm 1.85$ ) and T1 ( $102 \pm 0.64$ ;  $p > 0.05$ ), however, the recovery percentage was different between T0 ( $59.2\% \pm 2.04$ ) and T1 ( $73.9\% \pm 2.55$ ;  $p < 0.05$ ), and the percentage of viable COCs (Type A and B) in T1 ( $72.4 \pm 4.9$ ) was higher than T0 ( $48.3 \pm 4.2$ ;  $p < 0.05$ ). In conclusion, epidurally administered FSH/LH did not alter the number of AF, but enhanced follicular growth, resulting in a higher recovery of COCs with improved quality.

*Author Keywords:* cumulus-oocyte complexes, antral follicles, reproductive biotechniques



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

1. Introducción.....	11
2. Objetivos .....	13
2.1.    Objetivo general .....	13
2.2.    Objetivos específicos .....	13
3. Revisión bibliográfica .....	14
3.1.    Ciclo estral.....	14
3.1.1.    Proestro .....	14
3.1.2.    Estro .....	14
3.1.3.    Metaestro.....	15
3.1.4.    Diestro .....	15
3.2.    Eje hipotálamo-hipófisis-ovario .....	15
3.2.1.    Hormonas del hipotálamo .....	16
3.2.2.    Hormonas de la hipófisis.....	16
3.2.3.    Hormonas del ovario .....	17
3.3.    Dinámica folicular .....	18
3.3.1.    Reclutamiento.....	19
3.3.2.    Selección .....	19
3.3.3.    Dominancia.....	19
3.4.    Biotecnologías reproductivas .....	20
3.4.1.    Inseminación artificial (IA) .....	20
3.4.2.    Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) .....	21
3.4.3.    Multiovulación y transferencia de embriones (MOET).....	21
3.4.4.    Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	21
3.4.5.    Aspiración folicular transvaginal ecoguiada (OPU).....	22
4. Materiales y métodos.....	31

4.1.	Materiales .....	31
4.1.1	Materiales biológicos .....	31
4.1.2.	Materiales químicos .....	31
4.1.3.	Materiales de campo .....	31
4.1.4.	Materiales de laboratorio.....	32
4.2.	Métodos.....	32
4.2.1.	Área de estudio .....	32
4.2.2.	Unidad experimental .....	33
4.2.3.	Diseño experimental.....	33
4.2.4.	Metodología.....	34
4.2.5.	Valoración del número y tamaño de folículos.....	35
4.2.6.	La aspiración ecoguiada (OPU).....	35
4.2.7.	Valoración de la calidad de COC's colectados en la OPU.....	35
4.3.	Análisis estadísticos .....	36
5.	Resultados y discusión .....	37
5.1.	Resultados del objetivo 1 .....	38
5.1.1.	Recuento y tamaño de folículos antrales.....	38
5.1.2.	Clasificación de los folículos antrales en grupos según su tamaño.....	39
5.2.	Resultados del objetivo 2.....	41
5.2.1.	Recuento de COC's recuperados .....	41
5.2.2.	Clasificación de los COC's recuperados en grupos según su calidad .....	42
5.2.3.	Clasificación de los COC's recuperados en aptos y no aptos.....	43
6.	Conclusiones.....	45
7.	Recomendaciones .....	45
8.	Referencias .....	47
9.	Anexos .....	62

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Interacción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario .....	18
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos .....	20
<b>Figura 3.</b> Sonda ecográfica transvaginal, mango de la OPU y guías de punción .....	24
<b>Figura 4.</b> Ubicación de la Granja Comercial “La Zelanda” .....	32
<b>Figura 5.</b> Ubicación de la Granja Experimental “Irquis” .....	33
<b>Figura 6.</b> Tratamientos utilizados en el experimento. T0= protocolo testigo. T1= protocolo alternativo vía epidural. BE= benzoato de estradiol PG= prostaglandina. PL= placebo. D0= día cero. D4= día 4. D6= día 6. DIV=dispositivo intravaginal. FSH=FSH-LH 250 UI. OPU= la aspiración ecoguiada .....	34
<b>Figura 7.</b> Clasificación de COC's.....	36
<b>Figura 8.</b> Media y error estándar del número de los folículos observados el día de la OPU en T0 y T1 (Panel A). Tamaño de los folículos visualizados el día de la OPU en los dos tratamientos (Panel B). Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia entre tratamientos.....	39
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de folículos presentes en cada grupo (grupo 1: 3-5 mm; grupo 2: 5-8 mm; grupo 3: >8 mm), comparados entre tratamientos T0 y T1. Prueba de Chi cuadrado al 5%. .....	41
<b>Figura 10.</b> Media y error estándar del número de complejos cúmulo ovocitos (COC's) recuperados mediante la aspiración ecoguiada en T0 y en T1 (Panel A). Porcentaje de recuperación de COC's mediante OPU en los dos tratamientos (Panel B). Prueba de T de Student al 5%. ns = no hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia entre tratamientos...	42
<b>Figura 11.</b> Media y error estándar del número de COC's clasificados en cada uno de sus tipos: A, B, C y D, comparados en T0 con T1 obtenidos en la OPU. Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia entre tratamientos.....	43
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de COC's aptos y no aptos obtenidos en T0 y T1. Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia entre tratamientos...	44

### Agradecimientos

Agradezco a mi mami Laura y mi papi Rigo por su amor y apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida, especialmente en mi trayectoria universitaria, gracias por haber confiado en mí y por nunca permitirme darme por vencido, deseo en un futuro poder recompensarles por todo lo que han hecho por mí. De igual forma quiero agradecer a mis hermanos Juve y Chris, por su compañía y su ánimo en los momentos difíciles, su presencia ha sido indispensable para alcanzar esta meta, gracias por estar conmigo en todos los momentos especiales de mi vida. Además, agradezco a mi abuela Delia y mi abuelo Clemente por su cariño y paciencia, por siempre estar pendiente de mí en cualquier situación, nada hubiera sido posible sin ustedes, mi familia.

Un agradecimiento profundo y especial al Dr. Luis Ayala, no hay palabras suficientes para expresar todo lo que siento, pero gracias por ser más que un guía académico, por todos los conocimientos y enseñanzas que me ha brindado, gracias por ser el mejor tutor y un gran ser humano, no es fácil encontrar profesionales con un gran corazón como usted. Gracias Dr. Xavier Samaniego por su ayuda con este trabajo, y por todos los conocimientos que me ha brindado para llegar a ser mejor en el ámbito profesional, espero poder aprender mucho más con el tiempo.

Por último, quiero agradecer a Cari mi compañera de tesis y una gran amiga, gracias por tu paciencia, comprensión y por nunca haberme dejado sola. A mi mejor amiga Meli quién estuvo siempre para mí desde el inicio de la carrera y me impulsó a decidirme por las cosas que me gustan hacer, siempre estarás en mi corazón, y en general a todos los doctores y amigos que de una u otra forma me han acompañado y proporcionado su apoyo.

*Kimberly Montaleza*

### Agradecimientos

Agradezco a mi familia, a mis padres por no soltarme, por enseñarme a resistir y apoyarme durante este largo camino. A mi casi hermana Anilka, quien se mantuvo a mi lado siempre que lo necesitara sin importar cuan complicada fuera su vida en ese momento, este logro también es suyo.

Doctor Luis Ayala, gracias por su conocimiento, paciencia, tiempo y amistad, usted me ha enseñado a ser valiente, ha llegado a ser mucho mas que nuestro tutor de tesis, y me enorgullece poder llamarlo amigo. Doctor Xavi Samaniego, eres un profesional brillante y admirable, gracias por tu ayuda durante este proyecto, gracias por tus interminables conocimientos, y tu falta de egoísmo al compartirlos con nosotras.

Kim, gracias por ser la mejor compañera que pude tener, gracias por el esfuerzo invertido en este trabajo, no sé qué nos deparará el destino, pero espero que nos encontremos en el camino. A mis amigas incondicionales, Rafa y Meli, gracias por escuchar mis interminables problemas con sencillas soluciones, gracias por siempre hacerme sentir entendida, no hay palabras suficientes para agradecerles.

Andrés, gracias por mostrarme la pasión que se puede llegar a tener por esta carrera, gracias por transmitirla y enseñarme a vivirla. Eres una inspiración para mí, y te estaré eternamente agradecida.

*Carina Vásquez*

## Dedicatoria

Dedico esta tesis de pregrado a mis padres, hermanos y abuelos, quienes fueron mi refugio en los momentos difíciles y mi mayor motivación para seguir adelante. Este logro es tan suyo como mío, porque sin ustedes no hubiera sido posible. También les dedico a mis mascotas, Toby y Bruno quienes siempre me dieron alegría en mis momentos de tristeza o estrés.

*Kimberly Montaleza*

Me gustaría dedicar este trabajo a mis padres, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida y me han demostrado lo que es la fuerza y perseverancia. A mi Nico, quien aguantó noches de desvelo junto a mí, aunque no pudiéramos compartir ninguna palabra tu compañía fue todo lo que necesité durante muchos años, gracias por estar conmigo hasta el último momento, para siempre, te amo.

*Carina Vásquez*

## Lista de abreviaturas

**FSH** = Hormona folículo estimulante

**IM** = Intramuscular

**OPU** = Ovum Pick Up, por sus siglas en inglés

**PIVE** = Producción de embriones *in vitro*

**COC's** = Complejo cúmulos ovocitos

**LH** = Hormona luteinizante

**UI** = Unidades internacionales

**CL**= Cuerpo Lúteo

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

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

**E<sub>2</sub>** = Estradiol

**GnRH** = Hormona liberadora de gonadotropinas

**IA** = Inseminación artificial

**IATF** = Inseminación artificial a tiempo fijo

**MOET** = Multiple Ovulation and Embryo Transfer, por sus siglas en inglés

**FIV** = Fertilización *in vitro*

**TE** = Transferencia embrionaria

**DIV** = Dispositivo intravaginal

**eCG** = Gonadotropina coriónica equina

**CC** = Condición corporal

**RFA** = Recuento de folículos antrales

**mm/Hg** = milímetros de mercurio

**MHz** = Mega Hertz

## 1. Introducción

Para estimular el crecimiento folicular y mejorar la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* (Hasler, 2014), a nivel mundial se han estandarizado protocolos que usan hormona foliculo estimulante (FSH) vía intramuscular (IM) cada 12 horas por cuatro días consecutivos (Mapletoft et al., 2002), debido a que la FSH tiene una vida media de entre 2 a 5 horas (Bó & Mapletoft, 2020).

La necesidad de aplicar varias veces FSH requiere una atención meticulosa del personal encargado del protocolo, aumentando la posibilidad de fallas durante el manejo de la hormona (Looney et al., 1981). Además, está descrito que la manipulación excesiva de los animales ocasiona estrés, produciendo una disminución en la respuesta del animal al proceso de estas biotécnicas reproductivas (Macedo et al., 2011).

Una de estas biotécnicas es la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido (*Ovum Pick UP* "OPU"; por sus siglas en inglés), técnica descrita inicialmente por Pieterse et al. (1988), la cual permite obtener ovocitos de animales *in vivo* y que combinado con la producción *in vitro* de embriones (PIVE) se han convertido en una forma eficiente de producir embriones.

La OPU fue creada inicialmente para obtener ovocitos sin la necesidad de utilizar hormonas (De Roover et al., 2008); sin embargo, el número de embriones obtenidos al final de la OPU-PIVE mediante estos protocolos es reducido (15-30%). Esta particularidad está ligada a la gran heterogeneidad de la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados en la sesión de la OPU (Ruiz, 2010). Estudios realizados demuestran que sin estimulación ovárica la recuperación de complejos cúmulo-ovocito (COC's) aptos en promedio se encuentra entre 4,0 (Ayala et al., 2020) y 4,2 (Alvarado et al., 2015) por sesión en vacas criollas y Holstein mestizas respectivamente.

Para mejorar el porcentaje de recuperación de COC's se han realizado estudios sobre la sincronización de la onda folicular, proceso que genera el desarrollo simultáneo de folículos, permitiendo que sean más homogéneos en relación con el diámetro y etapa de desarrollo (Dogan & Yenilmez, 2024), lo cual permite mejorar la recuperación de COC's mediante OPU (Lucy, 2001). Además, hay trabajos que combinan la utilización de estradiol y progesterona administrados en el día 0 del protocolo, llegando a observar reinicio de la onda folicular en un promedio a los 4 días (Dután, 2013).

Otra alternativa para mejorar la recuperación y calidad de COC's es la estimulación hormonal ovárica previa a la OPU (Ding et al., 2008), con gonadotropinas como la FSH (Chaubal et al., 2006), recuperando entre 8 y 9 COC's y de estos un 56% fueron considerados aptos para la PIVE (tipo I, II, y III), evidenciando resultados alentadores; sin embargo, el 44% de los COC's

obtenidos fueron clasificados como no aptos (tipo IV, V y degenerados; Morera et al., 2022). Este porcentaje alto de COC's no aptos para PIVE estaría ligado a un crecimiento asincrónico entre el folículo y el ovocito, producto de la administración de solo FSH exógena en alta concentración dentro de compuesto (Ruiz et al., 2013).

Para que el desarrollo del folículo mantenga sincronía con el ovocito es necesario recordar que la onda folicular en el ganado bovino tiene tres fases: 1) reclutamiento en la cual los folículos son sensibles a la FSH gracias a la presencia de receptores para esta hormona. 2) A continuación, los folículos ingresan en la fase de selección, en la cual se observan receptores para FSH, pero también para la hormona luteinizante (LH). 3) Finalmente, un folículo llega a la fase de dominancia en la cual poseen receptores únicamente para LH (Espinoza et al., 2007).

Por lo tanto, el uso combinado de 500 UI de FSH-LH en igual proporción permite mejorar el crecimiento del folículo y la calidad de COC's recuperados en cada sesión, llegando obtenerse en promedio de 10 COC's/sesión/vaca y de estos el 65% fueron clasificados como aptos (tipo A y B) para su utilización en programas de PIVE (Ayala et al., 2020).

Con la idea de reducir la dosis de la FSH/LH utilizada para estimular el ovario previo a la aplicación de biotécnicas como la superovulación y la OPU, en los últimos años se viene estudiando la utilización de la vía epidural, como una alternativa para la administración de esta hormona, llegando a demostrar que la aplicación de 250 UI de FSH/LH vía epidural en una sola dosis produce porcentajes de crecimiento folicular en número y tamaño similares al uso de 1000 UI de FSH repartidas en 8 dosis consecutivas; sin embargo, el porcentaje de ovulación obtenido fue bajo (Farías et al., 2023).

La baja respuesta en el proceso final del protocolo de superovulación (% de ovulación), al administrar FSH vía epidural, estaría relacionado con los niveles altos que debe mantener en sangre esta hormona (mínimo 72h) y que es necesaria para que los folículos crezcan y terminen ovulando; pero al administrar la FSH por vía epidural estos niveles se mantienen en sangre por 52h y luego descienden a concentraciones basales (Farías et al., 2023).

Basados en este principio fisiológico y considerando que en los protocolos de la OPU es necesario en promedio 48h de niveles altos de FSH/LH para obtener una respuesta ovárica adecuada, se consideró importante probar esta vía de administración (epidural) en dosis de 250 UI para estimular el ovario previo a la sesión de aspiración ecoguiada.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta ovárica a la estimulación con 250 UI de FSH/LH vía epidural en vacas Holstein mestizas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Estimar la respuesta ovárica a través del tamaño y número de folículos antrales mayores a 3 mm presentes en el día de la OPU, luego de la estimulación ovárica con 250 UI de FSH vía epidural en vacas Holstein mestizas.
- Valorar la calidad y cantidad de COC's recuperados mediante la OPU en vacas Holstein mestizas.

### 3. Revisión bibliográfica

#### 3.1. Ciclo estral

Se conoce como ciclo estral o calor al conjunto de eventos fisiológicos que tienen lugar entre un estro y el siguiente (Rippe, 2009). Los bovinos son animales poliéstricos continuos (Colazo & Mapletoft, 2014) que presentan comúnmente un ciclo de entre 18 a 24 días, considerándose como promedio 21 días. Esto transcurre de manera constante únicamente interrumpido durante la gestación o debido a procesos patológicos; a lo largo de él se producen una serie de cambios hormonales a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario causando cambios fisiológicos y conductuales (Carvajal et al., 2020).

El ciclo estral se divide en dos fases según las estructuras ováricas predominantes: fase lútea y fase folicular. La fase folicular abarca el tiempo previo al estro hasta la ovulación, conformado por 2 etapas: proestro y estro. Mientras que la etapa lútea, es el periodo donde se forma y destaca el cuerpo lúteo, se encuentra constituida por el metaestro y el diestro (Boeta et al., 2023).

Durante el ciclo estral la síntesis de LH es pulsátil o episódica, dentro de la fase folicular existen pulsos de alta frecuencia y baja amplitud (20-30/24 horas), siendo el pico preovulatorio de LH es el conjunto de múltiples pulsos de secreción. En la fase luteal existen pulsos de baja frecuencia y elevada amplitud de LH (6-8 pulsos/24 horas), siendo esto suficiente para el mantenimiento del cuerpo lúteo (Matamoros & Salinas, 2017).

##### 3.1.1. Proestro

Esta presenta una duración de entre 2 a 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo (CL) del ciclo pasado y finaliza con el inicio del estro. La luteolisis del CL sucede debido a la acción de la prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF\alpha$ ) producida por el útero, debido a esto se presenta la caída de progesterona ( $P_4$ ), provocando que el feedback negativo hipotalámico desaparezca, incrementando así la secreción pulsátil de la FSH y LH, lo que induce al crecimiento folicular (Rippe, 2009). Durante el proestro ya existe un folículo dominante, el cual progresivamente aumenta las concentraciones de estradiol ( $E_2$ ), lo que induce un pico de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y a su vez permite la visualización del comportamiento estral (Colazo & Mapletoft, 2014).

##### 3.1.2. Estro

El estro se caracteriza por la receptividad sexual, donde se puede visualizar como signo principal la quietud de la vaca al ser montada, entre otros signos se puede observar inflamación de la vulva, inquietud y secreción vaginal de moco claro y transparente. Este

periodo tiene un lapso promedio de  $16 \pm 4$  horas (Rippe, 2009). El comportamiento estral ocurre a causa de la alta concentración de  $E_2$  originario del folículo dominante (Atuesta et al., 2011), debido a esto se crea un feedback positivo en el hipotálamo, provocando la liberación de GnRH, lo que a su vez induce a la adenohipófisis a la síntesis de FSH y LH, desencadenando así, 24 horas después del pico, la ovulación (Colazo & Mapletoft, 2014). La LH se considera como la gonadotropina responsable de la ovulación, y por otro lado el papel de la FSH se relaciona directamente con el inicio de la primera onda folicular (Rippe, 2009).

### 3.1.3. Metaestro

Durante este periodo acontece la ovulación y a continuación la formación del CL, tiene una duración de 4 a 5 días. Durante el proceso de desarrollo del CL las concentraciones de  $P_4$  aumentan hasta llegar a niveles mayores de 1 ng/mL, circunstancia que nos indica la madurez del CL y a su vez el inicio de la fase luteal o diestro (Hernández, 2016).

### 3.1.4. Diestro

La fase luteal es la etapa que presenta mayor duración en el ciclo, de aproximadamente 15 días (Rodrigues, 1991), se caracteriza debido a la alta funcionalidad del CL (Del Campo, 1985), en donde predomina la  $P_4$  y se reduce la concentración de estrógenos provocando la disminución del tono uterino, edema e hipertermia. El moco cervical se condensa y su cantidad disminuye, el cérvix se ocluye aislando el útero del exterior. Si ocurrió la fertilización, el CL persiste para mantener la gestación, caso contrario se luteiniza al final del diestro (Boeta et al., 2023). Este evento ocurre cuando aumentan los receptores de oxitocina en el endometrio, lo que a su vez estimula la secreción de  $PGF_{2\alpha}$  (Atuesta et al., 2011) de origen uterino, siendo esta transportada por la vena útero-ovárica con la función de provocar la regresión del CL (Rippe, 2009).

## 3.2. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario es un sistema neuroendocrino fundamental para la regulación de la función reproductiva en los bovinos. El hipotálamo da origen a la GnRH, la cual, a su vez a través del sistema neuronal, estimula a la adenohipófisis para la liberación de FSH y LH (Sintex, 2005), las cuales a través del sistema circulatorio llegan al ovario (Aréchiga et al., 2019). En el ovario estas hormonas se unen a sus receptores específicos ubicados las células de la granulosa (receptores para FSH) y de la teca (receptores para LH) para activar la foliculogénesis y para la producción de esteroides sexuales como los estrógenos, progesterona, y péptidos gonadales como la activina e inhibina. Estos factores que son producidos a nivel ovárico, generan una retroalimentación hacia el hipotálamo y

adenohipófisis para aumentar o inhibir la liberación de GnRH y a su vez FSH/LH (López, 2012).

### 3.2.1. Hormonas del hipotálamo

La GnRH denominada originalmente hormona liberadora de hormona luteinizante (Telésforo, 2011) es un decapeptido que posee un peso molecular de 1183 Daltons (Morgan et al., 2006) y es producida principalmente en los núcleos preópticos y arcuatos del hipotálamo, y de forma secundaria en las gónadas y la placenta (Hassanein et al., 2024). Según López (2012) la secreción de la GnRH es de forma pulsátil, es decir, discontinua, y depende de la retroalimentación positiva o negativa de las gonadotropinas, ya que ejerce su acción sobre la adenohipófisis, permitiendo la liberación de FSH/LH.

La secreción pulsátil puede clasificarse en dos tipos: tónica y cíclica. La tónica es liberada por los núcleos ventro-medial, arcuato y la eminencia media, se da durante todo el ciclo estral manteniendo niveles basales de FSH/LH, mientras que la secreción cíclica se encuentra determinada por los núcleos preópticos y supraquiasmático, y se da como un pico o descarga masiva debido a los niveles elevados de  $E_2$ , los cuales son producidos por folículos maduros y niveles disminuidos de  $P_4$  (Jiménez, 2016).

### 3.2.2. Hormonas de la hipófisis

La adenohipófisis o también llamada hipófisis anterior, es uno de los dos lóbulos de la glándula pituitaria, la cual está ubicada en la base del encéfalo (Hernández et al, 2010). En este lóbulo se produce la liberación de diferentes tipos de hormonas, de las cuales las relacionadas con la reproducción son la FSH/LH. Estas son hormonas heterodiméricas glicoproteicas con un peso molecular de alrededor 32.000 Daltons, las cuales tienen características estructurales similares como la subunidad- $\alpha$ , y difieren en la subunidad- $\beta$  (Franco & Uribe, 2012).

Ambas gonadotropinas desarrollan funciones importantes en las gónadas de la hembra. Por una parte, la FSH está encargada del crecimiento y desarrollo folicular mediante la unión con su receptor específico (FSH-R) localizado en las células de la granulosa (Hernández et al., 2008). Actúa sobre estas células promoviendo la proliferación celular, producción de  $E_2$  y la expresión de receptores de LH. La LH induce la ovulación y la posterior liberación del ovocito maduro del folículo dominante, además, produce la formación del CL, y en acción conjunta con la FSH estimula la secreción de estrógenos (Gutiérrez, 2008).

### 3.2.3. Hormonas del ovario

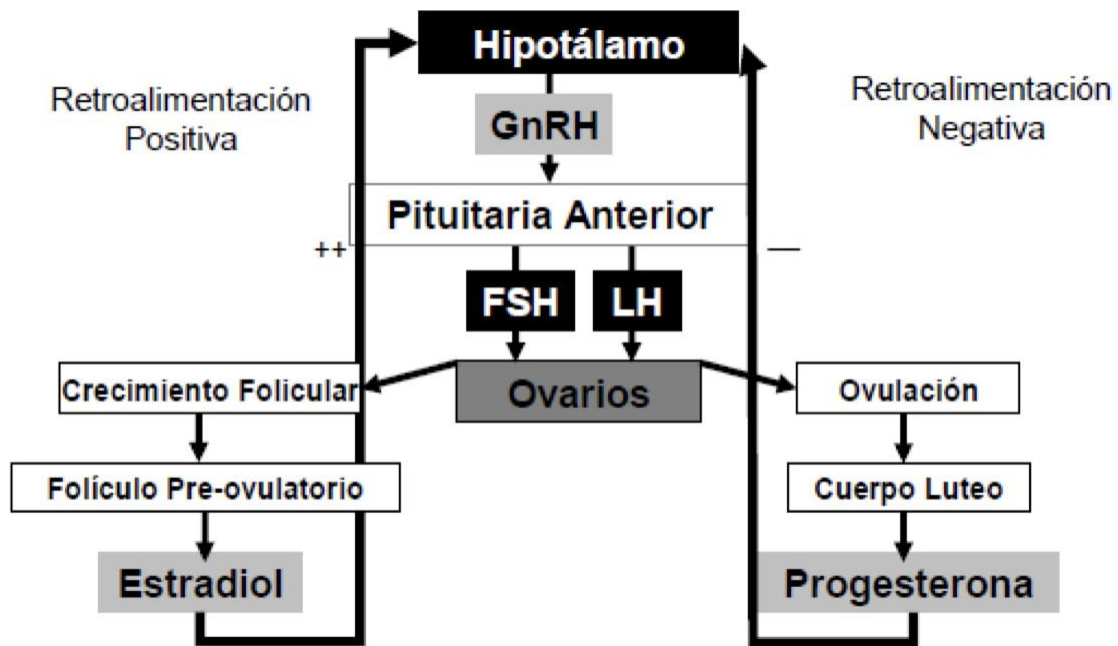
El ovario es una estructura fundamental para la producción de dos tipos de hormonas: los estrógenos y la progesterona, estas hormonas desempeñan su acción en la regulación del ciclo estral, inducción de la ovulación y mantenimiento de la gestación.

Por una parte, los estrógenos son hormonas esteroideas sintetizadas por la transformación del colesterol (Saavedra et al., 2012) y son secretadas por las células de la teca interna del folículo ovárico. Según Hernández et al. (2008) existen diferentes tipos de estrógenos que varían según su tiempo de vida media, los cuales son:

- **17 Beta-Estradiol:** conocido como estrógeno natural, posee una vida media corta de 24 a 36 horas.
- **Benzoato de Estradiol:** Posee una vida media de 3 días.
- **Valerato de Estradiol:** Tiene una vida media entre 7 a 9 días.
- **Cipionato de Estradiol:** Caracterizado por tener una vida media larga desde 10 a 12 días.

Los estrógenos son producidos en mayor cantidad por los ovarios, y en menor cantidad en la placenta y glándulas adrenales (Lopez, 2005). Dentro de sus principales funciones es la estimulación de la conducta de celo, expresión de características sexuales secundarias y realizar una retroalimentación negativa sobre el centro tónico y positiva sobre el centro cíclico en el hipotálamo (Sintex, 2005).

Mientras que la  $P_4$  descrita inicialmente por Fonseca et al. (1983), es secretada principalmente por el CL y en menor cantidad por la placenta, posee importancia en el mantenimiento y desarrollo de la gestación, ya que permite la preparación del útero para el implante del embrión (Ferreira, 2016). Además, realiza una retroalimentación negativa en el centro tónico del hipotálamo, inhibiendo la liberación de GnRH y esta a su vez de FSH/LH, con el propósito de evitar el desarrollo de folículos nuevos (Aréchiga et al., 2019).



**Figura 1.** Interacción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Guzmán, 2018).

### 3.3. Dinámica folicular

El desarrollo de folículos bovinos ocurre durante el ciclo estral en un patrón denominado ondas de crecimiento folicular (Motta et al., 2011), siendo más frecuente animales que presentan dos y tres ondas foliculares (Pérez et al., 2004). A lo largo de cada onda de crecimiento existe una población de folículos pequeños, medianos y grandes en cada ovario, de los cuáles uno se torna dominante mediante un proceso de selección hasta el diámetro preovulatorio, generando al mismo tiempo la atresia de los folículos pequeños (Motta et al., 2011).

Se requiere aproximadamente de 80 a 100 días para que un folículo primordial alcance el tamaño ovulatorio; al folículo primordial le toma 20 días para pasar a ser un folículo primario, este último necesita 10 días para alcanzar la medida del folículo preantral, y aún requiere 10 días más para convertirse en un folículo antral (Cavestany & Galina, 2021), cuando este entra en el grupo de crecimiento, será conducido finalmente a la degeneración por atresia, proceso que afecta a casi todos folículos (Motta et al., 2011) o a la ovulación. Cada onda de crecimiento folicular en los bovinos enmarca tres fases: reclutamiento, selección y dominancia (Pérez, 2004).

### 3.3.1. Reclutamiento

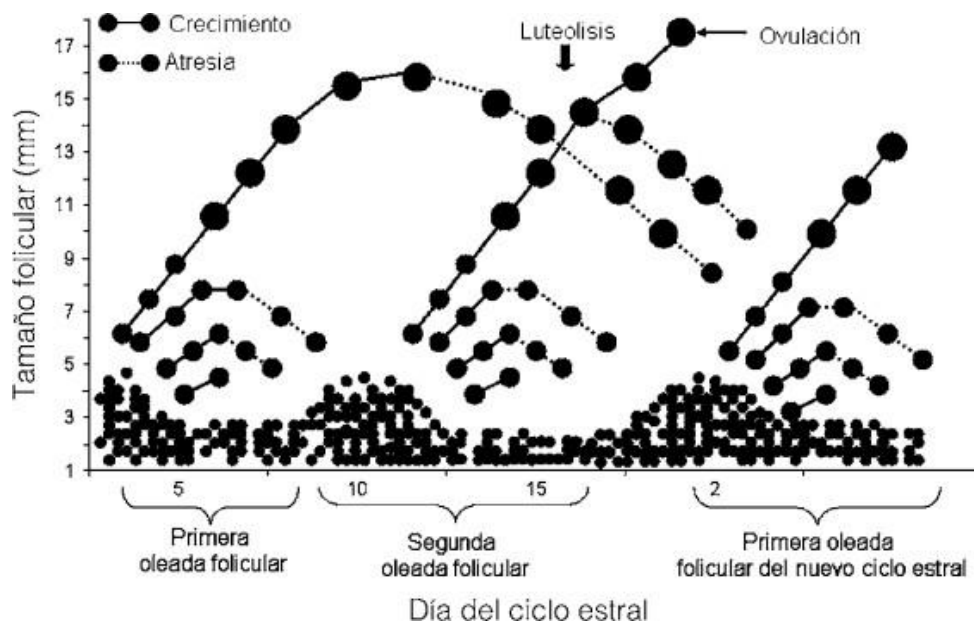
Esta etapa comienza a causa del aumento de la concentración de gonadotropinas originario del segundo pico de FSH (pico ovulatorio) producido durante el ciclo estral. Una cohorte de entre 3 a 6 folículos pequeños, antrales o tempranos (2 a 3 mm) empiezan su desarrollo, aumentando su tamaño y la síntesis de  $E_2$ , inhibina y activina, todo esto como respuesta al incremento de la FSH. Solamente un folículo de este grupo obtiene desarrollo funcional y estructural, lo que lo hace capaz de continuar su crecimiento mientras los otros folículos del grupo se atresian (Fernández, 2003; Tovío & Duica, 2012).

### 3.3.2. Selección

Durante la selección existen uno o varios folículos de entre 6 a 9 mm que comienzan a madurar y depender de la LH, siendo este el proceso de selección del folículo dominante, en donde este último interfiere sobre la capacidad de los folículos más pequeños de obtener un soporte gonadotrófico apto (Tovío & Duica, 2012) y entran en un proceso denominado desviación o atresia. La desviación folicular se vincula a la obtención del folículo dominante de receptores de LH justo antes del inicio de la atresia, la acción de la inhibina y a la posterior disminución de la concentración de FSH circulante provocado por el folículo seleccionado, quien con el aumento del  $E_2$  suprime la secreción de la FSH resultando en la atresia de los folículos subordinados 3 días después del inicio del descenso (Espinoza et al., 2007).

### 3.3.3. Dominancia

A lo largo de la fase de dominancia el folículo seleccionado ejerce inhibición sobre la aparición de una nueva cohorte de folículos antrales. Además, en esta etapa se presenta el proceso de desviación del resto de folículos subordinados, los cuales sufren atresia, mientras que el folículo dominante crece de forma constante hasta alcanzar un diámetro de  $\geq 10$  mm (Espinoza et al., 2007), sintetizando  $E_2$ , hormona relacionada directamente con la obtención de receptores de LH (Tovío & Duica, 2012). En este momento el folículo dominante adquiere capacidad ovulatoria, en caso de no suceder este se mantiene en una fase estacionaria de aproximadamente 6 días manteniendo su tamaño y funciones. Si hasta entonces no se ha producido la ovulación comienza el proceso de atresia (Fernández, 2003).



**Figura 2.** Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos (Espinoza et al., 2007).

### 3.4. Biotecnologías reproductivas

Las biotecnologías reproductivas son un conjunto de técnicas desarrolladas con el propósito de aumentar la eficiencia reproductiva, mejoramiento genético y optimización de la productividad del hato (Rosete et al., 2021). Estas biotécnicas desde su origen hasta la actualidad poseen cinco generaciones (Ugalde, 2014). Sin embargo, las más estudiadas y relevantes pertenecen a las tres primeras generaciones, en las cuales se incluyen inseminación artificial, criopreservación de embriones, control hormonal, ultrasonografía, transferencia de embriones y fertilización *in vitro* (Bertolini & Bertolini, 2009). Además, la combinación de diferentes biotécnicas en los protocolos, manifiestan un aumento en la capacidad de cada animal durante su periodo de vida (Aldana & Pinilla, 2021).

#### 3.4.1. Inseminación artificial (IA)

La inseminación artificial es una biotécnica de primera generación y una de las más difundidas para el mejoramiento genético del hato, debido a su sencilla aplicación (Urrego & Restrepo, 2006). Consiste en la recolección y almacenamiento del semen del macho seleccionado genéticamente, para posteriormente colocarlo en el útero de la hembra, mediante el uso de instrumentos específicos (Robson et al., 2004), sin embargo, es indispensable que el animal

se encuentre en la fase estral, ya que es la única forma para que se presente una correcta inseminación.

#### **3.4.2. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)**

Consiste en un protocolo donde no tiene relevancia la detección de celo en comparación con la inseminación artificial convencional, debido a que esta técnica permite el manejo de bovinos en situaciones de anestro postparto, pubertad tardía, y en complicaciones de detección de celo (Loayza, 2017). Su principal beneficio es la sincronización de celos de una gran cantidad de animales mediante la aplicación de hormonas (estrógenos, prostaglandina), obteniendo un mayor número de inseminaciones en un corto periodo de tiempo (Quijano et al., 2015)

#### **3.4.3. Multiovulación y transferencia de embriones (MOET)**

La multiovulación y transferencia de embriones consiste en una combinación de biotécnicas reproductivas que se ha venido utilizando desde la década de los 80's (Mapletoft, 2012). Está conformado por diferentes procesos como la superovulación, administración de hormonas exógenas, inseminación artificial, recuperación y transferencia de embriones hacia las receptoras (Aldana & Pinilla, 2021). Se utiliza como una herramienta para el mejoramiento genético, seleccionando previamente a los donadores, y para aumentar la capacidad de reproducción por parte de la hembra.

A pesar de ser considerada una de las biotécnicas más usadas e importantes en la actualidad (Faizah et al., 2018) posee efectos negativos en la salud del animal donante, ya que al realizar multiovulación mediante la aplicación de hormonas exógenas como la FSH (Arega, 2019), produce un alto nivel de estrés por la manipulación excesiva que se realiza durante cuatro días consecutivos, dos veces al día (Mogollón & Burla, 2013), y, también, provoca en el animal una reducción en la producción de leche (Callesen et al., 1996). Una de las principales condicionantes para utilizar esta biotécnica es la necesidad de tener animales que posean ciclos estrales regulares junto con un aparato reproductor saludable y eficiente (van Wagtendonk et al., 2000).

#### **3.4.4. Fertilización *in vitro* (FIV)**

La fertilización *in vitro* o también llamada producción *in vitro* (PIV) es una de las biotecnologías más avanzadas y utilizadas en este campo de estudio (Salgado & Lopera, 2020), está conformada por otras biotécnicas como la maduración *in vitro* de ovocitos, capacitación espermática y la FIV netamente (Moreno, 2018). Consiste en la recuperación de ovocitos de los folículos ováricos, los cuales van a ser madurados y fertilizados en el laboratorio, estos se

cultivan hasta el estadio de blastocisto, y se transfieren al animal receptor o se realiza criopreservación para una transferencia posterior (Rosete et al., 2021).

### **3.4.5. Aspiración folicular transvaginal ecoguiada (OPU)**

La primera OPU realizada con éxito en ganado vacuno la llevó a cabo el holandés Pieterse en 1988, mediante la adaptación de la técnica utilizada en humanos. El procedimiento original de OPU no contemplaba el uso de estimulación hormonal y se realizaba de manera rutinaria dos veces por semana, lo que permitía maximizar la recuperación de ovocitos. En las últimas dos décadas, las investigaciones sobre la OPU han explorado el uso de hormonas. La súper-estimulación combinada con la OPU permite recuperar un mayor número de ovocitos gracias al desarrollo de más folículos, lo que resulta en una producción superior de embriones. En esta técnica, el promedio de folículos aspirados, ovocitos recuperados y embriones obtenidos es considerablemente mayor cuando se aplican tratamientos con FSH, en comparación con hembras no súper estimuladas colectadas por la OPU una vez a la semana (Held, 2014).

La OPU es una alternativa a la PIV con uso de ovarios de origen de matadero, siendo que en la OPU se emplean ovocitos de vacas vivas con material genético conocido (Ondiz & Ruiz, 2011). Esta es una técnica con gran potencial, ya que se ha demostrado que al final del período de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y ser incorporados a programas de cría (Kruip et al., 1994; López, 2017). Puede aplicarse en vacas adultas bajo diversos estados fisiológicos: cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación (Brogliatti & Adams, 1996) y en aquellas que no responden a estímulos hormonales. Además, es útil en animales longevos con trastornos reproductivos no relacionados con la genética, así como en terneras y novillas prepúberes a partir de los 6 a 8 meses de edad (Ruiz, 2010).

Mediante esta técnica se logra conseguir un mayor número de embriones (hasta cien embriones al año por vaca) en comparación con los obtenidos a través del uso de protocolos estándar de transferencia embrionaria (TE) como MOET (Ondiz & Ruiz, 2011; Puerta, 2006).

#### **3.4.5.1. Importancia de la OPU a nivel mundial**

La OPU ha evolucionado en la reproducción asistida, ya que es una de las biotécnicas más utilizadas y efectivas para la recuperación de ovocitos *in vivo* de hembras que posean un alto potencial genético (Castillo, 2023), facilitando posteriormente la FIV. La implementación de la OPU ha ido en aumento desde su creación en 1988 (Pieterse et al., 1988) y aplicando de forma conjunta con FIV, se presenta como una alternativa competitiva a biotécnicas convencionales como MOET, debido a su amplio campo de aplicación (Boni, 2012).

Estas biotécnicas se han extendido ampliamente a nivel mundial, y, sobre todo, en países líderes en producción ganadera. Según Munar (2024), un estudio realizado en Argentina en el año 2022, evidencia que se produjeron 46 000 embriones, de los cuales 31 000 o el 67% fue producido mediante la OPU y FIV, y 15 000 o el 33% por MOET. Por otra parte, en Estados Unidos, un estudio evidenció el crecimiento del uso de la OPU, ya que pasó de obtener 2 000 colecciones en el año 2 000 a 32 000 colecciones en el año 2015 (Aldana & Pinilla, 2021).

Según Castillo (2023) menciona que un estudio realizado en Turquía indica que 1 031 567 del total de los embriones producidos *in vitro* en 2019, los provenientes de la OPU fueron 1 010 680, mientras que los recolectados de material de matadero fueron 20 887. Además, según el informe de International Embryo Technology Society (IETS) de 2023, se produjo un total de 1 876 591 de embriones *in vitro*, mientras que los embriones producidos *in vivo* fueron de 371 138 (Viana, 2024).

Por lo tanto, la combinación de estas biotécnicas, ha tenido un impacto significativo en la reproducción bovina a escala mundial, permitiendo incrementar de forma relevante el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca/año, además, pudiendo realizar desde una hasta dos sesiones de la OPU por semana, obteniendo un promedio de 4,1 ovocitos/vaca/sesión (Morera et al., 2022), e inclusive aumentando el nacimiento de animales que posean un alto valor genético en un 2% de forma anual (Slade et al., 2014).

#### **3.4.5.2. Materiales y técnica para la OPU**

Durante la OPU se requiere un ecógrafo de 5 — 7,5 MHz y un “*handgrip*” de 60 cm de largo en donde se ubicará la guía de punción. Por esta última pasará una aguja desechable (18 G, 1,2 x 40 mm) conectada a un tubo cónico estéril de 50 mL a través de la conducción de teflón, este tubo cónico deberá mantenerse a una temperatura regular de 37°C. Todo esto se complementa con una bomba de vacío mediante la cual se podrá acceder a una presión constante de 50 — 53 mmHg (Ruiz, 2014).



**Figura 3.** Sonda ecográfica transvaginal, mango de la OPU y guías de punción (Ruiz, 2014).

Antes de iniciar la aspiración los animales deben recibir anestesia epidural con xilacina y lidocaína al 2%, pasamos a desinfectar el área perianal y la vulva cumpliendo los protocolos de higiene para posteriormente ingresar el transductor acoplado con la guía de la aguja y ubicarlo en el cuello del útero. Introducimos la mano vía rectal para fijar el ovario de interés contra la cabeza del transductor, lo que nos facilita la visualización de los folículos en la pantalla del ecógrafo y lograr una punción exitosa al atravesar la pared vaginal y folicular permitiendo que la bomba de vacío aspire el contenido y lo deposite en el tubo cónico de recolección (Held, 2014; Nava & Hernández, 2005)

### **3.4.5.3. Protocolos de la OPU sin terapia hormonal**

Según Watanabe et al. (2017) y Wrenzycki (2018) la OPU al ser un protocolo no invasivo, se puede realizar sin estimulación hormonal una o dos veces a la semana, al realizarlo dos veces por semana se ha demostrado una mayor cantidad de recuperación de ovocitos de mejor calidad en comparación con la aplicación de una vez por semana, esto es debido a que se produce la aspiración de todos los folículos que se pueden observar, impidiendo como tal el crecimiento de otro folículos (Çizmecci, 2022; Qi et al., 2013). Al realizar la OPU dos veces/semana sin estimulación hormonal, se puede conseguir alrededor de 130 embriones/año, dando como resultado el nacimiento de 70 terneros (Merton et al., 2003). Sin embargo, en donantes de raza Holstein sin estimulación hormonal se recuperan tan solo de 4 a 5 ovocitos de calidad, por lo que, debido a este bajo número de ovocitos recuperados

en cada sesión de la OPU, es necesario la aplicación exógena de hormonas previo a este protocolo (Dogan & Yenilmez, 2024)

#### 3.4.5.4. Protocolos de la OPU con sincronización de la onda folicular

En un ciclo estral natural, el total de ovocitos recuperados está definido por la dinámica folicular en el proceso de aspiración, además, los folículos pequeños son idóneos para el desarrollo de los ovocitos (Ledur, 2013). Sin embargo, estudios realizados como el de Alvarado et al. (2016) demuestran que, en protocolos de la OPU, el uso de hormonas exógenas para el control de la emergencia de la onda folicular, mejora la calidad de los ovocitos, siendo crucial para el éxito de procedimientos de FIV y producción de embriones de buena calidad. Las hormonas que se usan para manipular la dinámica folicular son la GnRH, los estrógenos y la progesterona (Baracaldo, 2000). Para manipular la duración de la fase lútea se puede usar  $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$  y  $\text{P}_4$  (Lamb et al., 2010).

- **Benzoato de estradiol:** Hormona sintética la cual actúa promoviendo el desarrollo y maduración de folículos pequeños a folículos dominantes capaces de ovular (Williams & Trujillo, 2022), además, mejora la respuesta de los folículos a otras hormonas como la FSH/LH, facilitando la ovulación sincronizada en un grupo de vacas (Abdullah, 2000).
- **Progesterona:** Producida por el cuerpo lúteo posterior a la ovulación, posee un efecto de mantener la fase luteal del ciclo estral. Cuando es administrada de forma exógena, genera un ambiente luteal artificial que produce la inhibición de la ovulación (Islam, 2011), el cual al administrar  $\text{PGF}_2\alpha$ , permite la regresión del cuerpo lúteo, y a su vez, que los bovinos reinicien su ciclo estral en un momento controlado (Dután, 2013).

La sincronización de la onda folicular para protocolos de la OPU puede ser realizada mediante una forma mecánica conocida como ablación folicular (Bergfelt et al., 1994) y a través de tratamientos farmacológicos combinados como  $\text{E}_2$  y  $\text{P}_4$  (Cavaliere et al., 2004). Existen diferentes estudios que comprueban la eficacia de estas dos técnicas de sincronización de la onda folicular, presentando diferentes resultados en cada método.

Un estudio realizado por Romero (2019) compara tres tratamientos: la ablación de folículos > 5 mm, la aplicación de GNRH (Gonadorelina 250 mg), y la aplicación de 2 mg de  $\text{E}_2$ , en el cual evidencia que la ablación folicular permite obtener mayor COC's de calidad A, en relación a los otros tratamientos, mientras que, Solís et al. (2012) evidencia que no existe diferencia significativa entre ablación folicular y aplicación hormonal en la cantidad y calidad de COC's recuperados.

No obstante, Quispe (2016), Ledur (2013) y Ayala et al. (2020) demuestran que el uso combinado de E<sub>2</sub> en dosis de 2,0 — 2,5 mg con P<sub>4</sub> en dosis desde 0,5 g hasta 1,38 g en forma de dispositivo intravaginal (DIV), permite la atresia tanto del folículo dominante como de los subordinados, dando lugar a un desarrollo sincrónico de la onda folicular en promedio a los 3,2 días, siendo este el más eficiente para protocolos de la OPU.

#### **3.4.5.5. Protocolos de la OPU combinados con sincronización de la onda folicular y estimulación hormonal**

Durante las ondas foliculares, en el ciclo estral una cohorte se recluta para la posterior selección de un solo folículo dominante destinado a ovular, y, en caso de presentarse apto, desarrollarse en un embrión, sin embargo, a lo largo de este transcurso gran parte de esta cohorte inicial sufren un proceso de atresia. Los protocolos de estimulación ovárica se desarrollaron con el objetivo de “rescatar” estos folículos destinados a atresarse, todo esto para emplear los ovocitos obtenidos en biotecnologías reproductivas como la OPU y la FIV de los COC's recuperados para su posterior transferencia (Restrepo et al., 2011).

La estimulación ovárica pretende alcanzar una respuesta supra fisiológica aumentando la cantidad de COC's obtenidos y por ende el número de embriones transferibles, además busca evitar oscilaciones hormonales (LH) que provoquen una ovulación temprana, afectando la obtención de los COC's, y, por último, pretende provocar la maduración folicular a través de fármacos que favorezcan el reclutamiento y la maduración de los folículos presentes en las ondas de crecimiento (Martínez, 2023).

Dentro de los métodos para la estimulación hormonal ovárica se puede destacar la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) o la FSH en diferentes protocolos (Bols & Stout, 2018; Mapletoft & Bó., 2012)

##### **➤ Gonadotropina coriónica equina (eCG)**

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona producida por el endometrio de las yeguas gestantes, esta molécula posee una gran cantidad de carbohidratos (45%) en su masa (ácido siálico) lo que le proporciona una vida media extensa, alcanzando los 3 días en sangre. Esta hormona se usa para optimizar los procesos reproductivos de novillas y vacas tanto lecheras como cárnicas, la eCG se une a los receptores foliculares de FSH y LH demostrando actividad similar a estas dos hormonas en el ganado, impulsando el desarrollo folicular e incrementando de esta manera la respuesta ovárica al momento de la aspiración (Baruselli et al., 2012) & (Baruselli et al., 2023). En un estudio realizado por Carvalho et al. (2021) se demostró que la administración de 400 UI de eCG aumentó el diámetro folicular y

el número de los folículos > 3mm, incrementó la cantidad de ovocitos totales y mejoró el número de ovocitos viables. Esto concuerda con Ribas et al. (2018) quienes demuestran que la administración de 800 UI de esta hormona aumenta la proporción de folículos medianos y grandes. A pesar de estos aciertos, existen estudios que discrepan en cuanto al uso de eCG, donde coinciden en que los efectos positivos en el aspecto morfológico folicular no superan a la FSH, declarando que esta última resulta una mejor alternativa que la eCG para el tratamiento previo a la OPU (Sendag et al., 2008).

#### ➤ **Hormona folículo estimulante (FSH)**

Hormona indispensable para la regulación de la fisiología reproductiva, especialmente en protocolos de la OPU, su administración exógena maximiza la producción de ovocitos viables para programas de reproducción asistida. A pesar de que la FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos (López et al., 2007), por sí sola ejerce un efecto poco favorable para la adquisición de una competencia apta dirigida al desarrollo de los ovocitos, debido a que fomenta el desarrollo folicular apresurado, lo que podría conllevar a una maduración asincrónica entre el folículo y el ovocito. Como una solución a este inconveniente se ha reducido el uso de FSH durante las fases terminales del crecimiento folicular, reemplazándola así con la LH exógena, lo que permite la obtención de ovocitos con una mejor calidad (Ayala et al., 2020), por lo cual la combinación de FSH/LH es necesario para sincronizar el crecimiento folicular y la ovulación, asegurando la maduración de múltiple folículos y la ovulación de los folículos seleccionados al mismo momento, mejorando la tasa de éxito en la recuperación de ovocitos de calidad A y B (Thatcher et al., 2001).

#### **3.4.5.6. Vías de administración de la hormona folículo - estimulante (FSH)**

Gran parte de los protocolos de estimulación ovárica se basan en el tratamiento con FSH previa a la OPU, lo que promueve el desarrollo de una población folicular uniforme (Baruselli et al., 2023). A consecuencia de la vida media corta de la FSH la respuesta a la estimulación ovárica se ve afectada por la vía de administración de la hormona y no debido a la cantidad de FSH suministrada (Ciftci & Dinc, 2023).

#### ➤ **FSH intramuscular convencional**

Consiste en la administración de dosis repetidas decrecientes o en igual proporción de FSH previo a la OPU durante 2 a 4 días, en intervalos de 12 horas entre aplicaciones (Baruselli et al., 2023; Bols & Stout, 2018; Ciftci & Dinc, 2023). Da Silva et al. (2016) encontraron que los protocolos con 200 mg de FSH IM divididas y repartidas en igual cantidad en 4 y 6 dosis

disminuyó el número de folículo menores a 6 mm y aumentó la cantidad de folículos entre 6 y 10 mm, lo que concuerda con Çech et al. (2002), quien administró en dosis decrecientes durante 3 días 80 y 40 UI de FSH, demostrando la disminución de los folículos pequeños y el incremento de los folículos medianos y grandes, reflejándose a su vez en un número mayor de ovocitos aspirados.

#### ➤ **FSH intramuscular más adyuvante**

Se basa en la aplicación de una única dosis de FSH (Vieira et al., 2016) o una dosis IM dividida en 2 administraciones (a las 48 horas) combinada con un polímero biodegradable, entre los adyuvantes más usados se encuentran:

- **Ácido Hialurónico:** Las soluciones de hialuronano (10 mg/mL), son sustancias que permiten la liberación lenta de la hormona sostenida durante varios días (Tribulo et al., 2012). Vieira et al. (2016) reportan que la administración en dosis única de 200 UI de FSH junto con hialuronato iguala en cuestión de COC's obtenidos y viables al protocolo convencional anteriormente descrito, pudiendo disminuir con esta opción el estrés de los animales debido al manejo constante (Ciftci & Dinc, 2023).
- **Oxihidróxido de aluminio:** Se describe también el uso de gel de hidróxido de aluminio, este componente es usado ampliamente como adyuvante, presenta baja viscosidad y se administra en monodosis junto con la FSH por vía IM (Ongaratto et al., 2020). En un estudio realizado por Kimura (2016) se empleó 30 mg de FSH combinado con 5 mL de hidróxido de aluminio, se evidenció la absorción y liberación de la hormona de manera eficaz, y se demostró que los resultados de este protocolo igualaron la respuesta del método convencional a dosis repetidas.
- **Polivinilpirrolidona (PVP):** Se basa en la administración única de FSH disuelta en PVP. La aplicación de este adyuvante ya ha demostrado resultados prometedores al mantener altas concentraciones plasmáticas de FSH, niveles similares a las que generan las inyecciones múltiples decrecientes de la hormona pertenecientes a protocolos convencionales (Takedomi et al., 1995).

#### ➤ **FSH subcutánea**

Se trata de la administración de una dosis única acumulada de FSH vía subcutánea en una región con acumulación de grasa, ya sea detrás del hombro o en el cuello, para crear un proceso de liberación lenta de la hormona a causa del tejido adiposo localizado. Este método produce una buena respuesta ovárica, sin embargo, la reacción a este protocolo parece ser

totalmente dependiente de la condición corporal (CC) en la que se encuentre el animal, mostrándose perjudicial en vacas lecheras como la Holstein (Morera et al., 2022).

#### **3.4.5.7. Vías alternativas para la administración de hormona previo a la OPU**

##### **➤ Vía epidural**

Consiste en la monodosis de FSH/LH vía epidural. En el canal epidural de bovinos con una CC  $\geq 3$  existe una cantidad de grasa que posibilita una liberación paulatina y constante de la hormona administrada hacia la circulación periférica, lo que sugiere una respuesta a la estimulación ovárica favorable debido a las altas concentraciones de FSH presentes en las primeras 50 horas post administración hormonal según (Ayala et al., 2023). En un estudio realizado por Sakaguchi et al. (2018) se concluye que la aplicación única de FSH vía epidural genera un desarrollo folicular similar al protocolo convencional, pudiendo mejorar la productividad de la OPU/PIVE, además, Sakaguchi et al. (2022) reportan que esta vía de administración logra concentraciones más altas en comparación con protocolos a dosis repetidas vía IM en vacas Holstein secas, demostrando que este esquema alternativo es capaz de competir con el estándar.

A pesar de los protocolos mencionados, la respuesta altamente inconsistente en la reacción ovárica a la estimulación hormonal es uno de los factores que más influye en la eficiencia de la PIVE. Esto podría explicarse parcialmente a causa de la cantidad variable de folículos en las ondas de crecimiento, siendo que los animales con más folículos responden mejor a la estimulación (Restrepo et al., 2011).

#### **3.4.5.8. Valoración de la respuesta a la estimulación ovárica**

La estimulación ovárica a base de hormonas como la FSH/LH, poseen gran importancia en el protocolo previo a la OPU, debido a que actúan de forma sinérgica (Baruselli et al., 2023) para inducir la maduración simultánea del folículo y ovocito, con el fin de obtener gametos de buena calidad (Restrepo et al., 2011). Sin embargo, en la valoración de la estimulación ovárica influye de forma considerable la dosis de hormona administrada y el intervalo de tiempo de la misma. En el estudio realizado por Morera et al. (2022), menciona que el rendimiento en la OPU sin estimulación hormonal fue de 30,68%, mientras que con estimulación hormonal a base de FSH/LH fue de 44,62%, evidenciando la necesidad de implementación hormonal.

Por otra parte, la ecografía transrectal consiste en una técnica necesaria para evaluar la respuesta a la estimulación ovárica, ya que a través de esta se puede monitorear el desarrollo y cantidad de los folículos durante el protocolo de la OPU (Romero, 2019). Esta técnica se usa en dos instancias, previo a la OPU y durante la OPU, para visualizar el número de folículos antrales del bovino, cabe mencionar que al aplicar FSH/LH, no predispone a un mayor número de folículos, ya que esto está determinado genéticamente, su objetivo es estimular el desarrollo de los folículos en un momento dado (Supliguicha, 2024). Un estudio realizado por Samaniego (2017) evidenció una aspiración de 61 folículos con una tasa de recuperación de 80,3% en un protocolo con estimulación hormonal a base de FSH/LH, mientras que, sin estimulación se aspiró únicamente 36 folículos con una tasa de recuperación de 66,7%, por lo que, se obtiene una mayor recuperación aplicando esta estimulación.

Además, la valoración de protocolos con estimulación ovárica no sólo se limita a la cantidad de folículos recuperados, sino que también posee un efecto directo en la cantidad y calidad de COC's recuperados. Según Ayala et al. (2020) la estimulación con FSH/LH permitió obtener 2,4 veces más de COC's que en aquellos que no se estimularon hormonalmente. Otro marcador eficiente pero indirecto está relacionado con los blastocistos, De Roover et al. (2008) menciona que la estimulación con gonadotropinas aumenta la tasa de desarrollo de los blastocistos, obteniendo un promedio de 29% con estimulación y un 18% sin estimulación.

#### **3.4.5.9. Valoración de los complejos cúmulo-ovocito**

Para la valoración de los COC's generalmente se utilizan criterios morfológicos, que se basan en la evaluación del número de capas y compactación de las células del cúmulo oóforo; así como en la homogeneidad y tonalidad del citoplasma (Estrella et al., 2017).

De esta forma los COC's se clasifican en: A = ovocito de apariencia compacta, con >4 capas de células del cúmulus, citoplasma granular uniforme y transparente; B = ovocito con 1 a 3 capas de células del cúmulus que cubren la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado; C = ovocitos totalmente desnudos, y/o citoplasma con zonas oscuras irregulares y D = ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con cumulus disperso y descolorido (Samaniego et al., 2017).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Materiales biológicos

- Hormonas
  - FSH-LH (Pluset®, Calier, Buenos Aires, Argentina)
  - Benzoato de estradiol (Gonadiol®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina)
  - Cloprostenol (Ciclase DL®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina)
- Vacas de genotipo Holstein mestizo

#### 4.1.2. Materiales químicos

- Gel
- Alcohol 70%
- Medio de recolección (suero fisiológico enriquecido con Polivinilalcohol al 1%)
- Lidocaína (Roxicaina® 2%, Ropsohn Therapeutics S.A.S, Bogotá, Colombia)
- Xilacina (Dormi-xyl® 2%, Agrovvet Market S.A, Lima, Perú)
- Implantes de progesterona (Dispositivo Intravaginal Bovino (DIB)®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina)
- Heparina (Heparina sódica, Sanderson S.A, Santiago, Chile)

#### 4.1.3. Materiales de campo

- Jeringas de 1, 3, 5, 10 y 20 ml.
- Guantes Nitrilo
- Guantes de chequeo ginecológico
- Pañitos húmedos
- Aplicador de implantes de progesterona
- Agujas desechables 18 G 1 ½, 21G 1 ½
- Tubos cónicos <sup>TM</sup> 50ml
- Recipientes
- Toallas desechables
- Equipo de ultrasonido (ProSound2®, Aloka, Tokio, Japón)
- Transductor sectorial
- Porta sonda de ultrasonido
- Bomba de Aspiración (WTA BV 003D, Sao Paulo, Brasil)

- Sistema de Guía de Aguja
- Filtro EMCON (Zona™ Agtech, Nueva York, EUA)

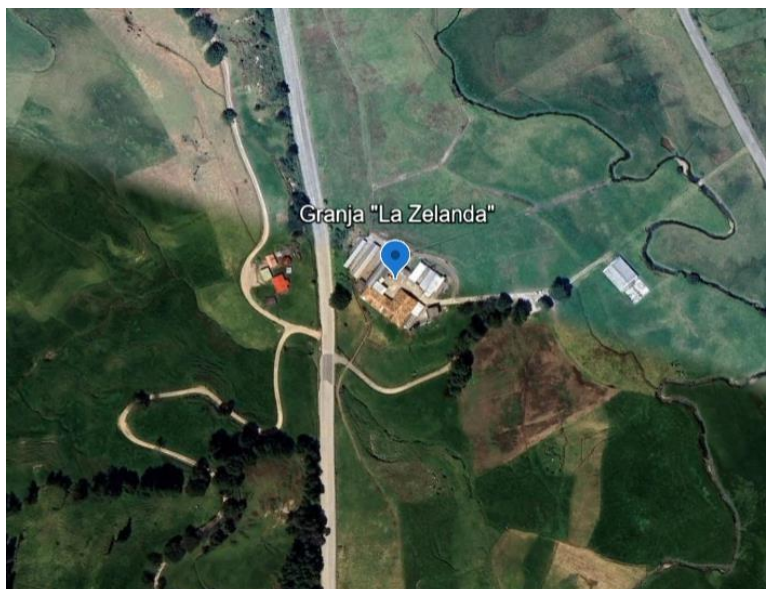
#### 4.1.4. Materiales de laboratorio

- Pipetas automáticas
- Puntas de pipetas automáticas
- Placas Petri cuadriculadas
- Placas Petri 90 mm,30 mm
- Estéreo microscopio (SMZ 745, Nikon, Japón)
- Jeringas
- Platina de térmica
- Filtro celular (100  $\mu$ m)

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Área de estudio

El estudio de campo se llevó a cabo en una sola granja comercial "La Zelanda" (Latitud: - 3.0942718; Longitud: -79.0895315) ubicada en la parroquia Victoria del Portete a 2 685 m s.n.m. Presenta una temperatura promedio de entre 9 a 20 °C y una precipitación anual de 677mm.



**Figura 4.** Ubicación de la granja comercial "La Zelanda" fuente: <https://earth.google.com>.

El procesamiento, análisis y clasificación de los COC's colectados en cada sesión de la OPU se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca, ubicada en la granja "Irquis".



**Figura 5.** Ubicación de la granja experimental "Irquis" fuente: <https://earth.google.com>.

#### 4.2.2. Unidad experimental

En el estudio se utilizaron ocho vacas multíparas de genotipo Holstein mestizo con una edad entre 4 - 6 años, peso promedio de 600 kg y una condición corporal de entre 2,50 a 3,00 según la escala del 1 al 5 descrita por Edmonson et al. (1989).

#### 4.2.3. Diseño experimental

La investigación fue de carácter experimental, donde se valoró el efecto de la hormona FSH - LH en proporciones similares sobre el número y tamaño folicular; así como la calidad y cantidad de COC's recuperados en cada una de las sesiones de la OPU. Para ello, ocho vacas se asignaron al azar a uno de los siguientes grupos experimentales:

T0= Testigo

T1= Administración de 250 UI de FSH, vía epidural

Las variables dependientes valoradas fueron:

- Número y tamaño de folículos > 3 mm presentes el día de la OPU.
- Número y calidad de los COC's recuperados en cada sesión de la OPU.

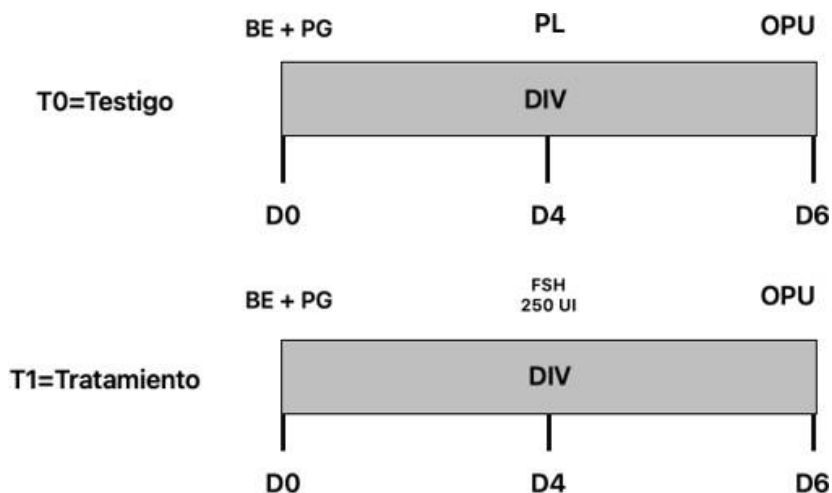
#### 4.2.4. Metodología

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

El día cero del protocolo los animales recibieron 2 mg de benzoato de estradiol vía IM más 25 mg de prostaglandina (IM), y un dispositivo intravaginal de 0,50 g de progesterona (DIV). Al día 4 se aplicó solución fisiológica vía epidural como placebo. El día 6 se retiró el DIV y se realizó el recuento de los folículos antrales (RFA) y la OPU. (*Fig. 1*).

##### *Protocolo del tratamiento uno (T1)*

Los animales de este tratamiento recibieron el día cero 2 mg de benzoato de estradiol (IM) más 25 mg de prostaglandina (IM), y un dispositivo intravaginal de 0,50 g de progesterona (DIV). En el día 4 se administró 250 UI de FSH-LH (Pluset®). El RFA y la valoración de su tamaño fue realizado el día 6 del protocolo previo a la OPU.



**Figura 6.** Tratamientos utilizados en el experimento. T0= protocolo testigo. T1= protocolo alternativo vía epidural. BE= benzoato de estradiol PG= prostaglandina. PL= placebo. D0= día cero. D4= día 4. D6= día 6. DIV= dispositivo intravaginal. FSH= FSH-LH 250 UI. OPU= la aspiración ecoguiada.

#### 4.2.5. Valoración del número y tamaño de folículos

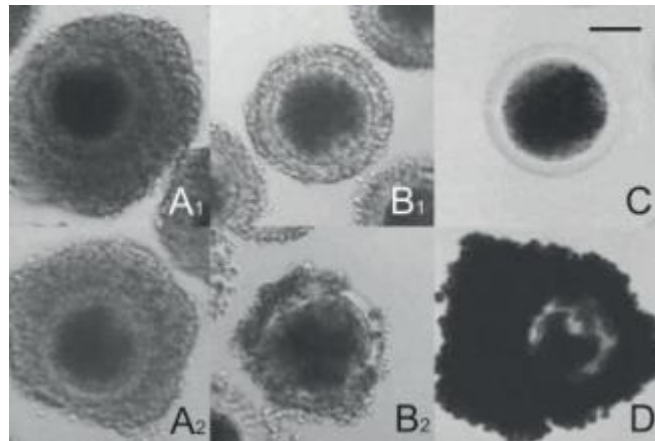
La determinación del número de folículos se realizó previo a cada sesión de la OPU (día 6) mediante ultrasonografía transrectal utilizando un ecógrafo en modo B en tiempo real acoplado a una sonda lineal de 7,5 MHz (Aloka ProSound2®, Japon), para lo cual se utilizó la metodología descrita por Ayala et al. (2020). Brevemente, en el ovario derecho se realizó un barrido latero-medial, dorso ventral y luego se aplicó el mismo procedimiento en el ovario izquierdo. Se determinó el tamaño medio de cada grupo de folículos antrales > 3mm, y para el análisis estadístico se organizó en tres grupos: a) folículos entre >3 y 5 mm (grupo 1); b) folículos >5 y <8 mm (grupo 2) y c) folículos mayores a >8 mm.

#### 4.2.6. La aspiración folicular transvaginal ecoguiada (OPU)

Los animales se colocaron en la manga de acuerdo con las normas de bioseguridad, tanto del operador como del animal. El área perianal y vulvar de la vaca fue lavada con una solución de yodo con agua. Luego se aplicó por vía epidural una mezcla de lidocaína al 2% (Roxicaina®) y xilacina al 2% (Dormi-xyl® 2%). Los ovarios se examinaron mediante ecografía. Luego se continuó con la aspiración transvaginal de los folículos utilizando un escáner de ultrasonido portátil (Aloka Prosound 2®, Japón), equipado con un transductor sectorial de 5 mega Hertz (MHz), ensamblado en un soporte de sonda. Para la punción se utilizaron agujas hipodérmicas desechables (marca Nipro), de tamaño 18G 1 x ½ y de 21G 1 x ½, 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 entre 70 mm de mercurio (mm/Hg).

#### 4.2.7. Valoración de la calidad de COC's colectados en la OPU

Luego de cada sesión los tubos cónicos con capacidad de 50 ml se llevaron al laboratorio para su procesamiento, en primera instancia se realizó un lavado mediante un filtro EmCon (Zona™ Agtech, EUA) y posteriormente el contenido fue transferido a una placa Petri de 90 mm. La búsqueda y clasificación de los COC's se realizó en un estereoscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), en base a los criterios previamente descritos (De Loos et al., 1989). Brevemente, COC's de calidad A: apariencia compacta, con múltiples capas (más de 4 capas) de células del 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 denudados, 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).



**Figura 7.** Clasificación de COC's (Held, 2014).

#### 4.3. Análisis estadísticos

Los datos se procesaron en Excel y luego fueron analizados en el programa estadístico SPSS® versión 25. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Los datos que no presentaron normalidad fueron transformados mediante Log10, y luego aplicados a la prueba de T de Student para el análisis de las variables cuantitativas. El análisis de la relación porcentual de recuperación y calidad de COC's fue evaluada mediante la prueba de Chi cuadrado. Se consideró una diferencia estadística entre tratamientos cuando el valor de p-value fue  $<0,05$ . Los resultados fueron exhibidos en gráficos.

## 5. Resultados y discusión

### Resultados poblacionales del recuento folicular, cantidad y calidad de complejos cúmulo-ovocito

Se realizaron dos sesiones de la OPU a ocho animales distribuidos de forma equitativa y aleatoria en los dos tratamientos (T0= testigo y T1= tratamiento al cual se administró 250 UI de FSH/LH vía epidural), llegando a observar un total 295 folículos en las dos sesiones de la OPU realizadas. De este total, el 53,2% perteneció a T0 y el 46,8% a T1.

Al agrupar el total de folículos visualizados en los dos tratamientos según su tamaño (grupo 1: >3 hasta 5 mm); (grupo 2: >5 hasta 8 mm); (grupo 3: >8 mm), se pudo determinar que los animales evaluados presentaron un 40% de folículos pequeños, los cuales fueron ubicados dentro del grupo 1, seguido de un 18% de folículos medianos establecidos dentro del grupo 2, y los folículos con tamaño superior a 8 mm llegaron a representar el 41%, situándose en el grupo 3.

Luego de las dos sesiones de la OPU se definió un porcentaje de recuperación general de 66,1% (195 COC's), sin considerar los tratamientos, estos resultados concuerdan con Ongaratto et al. (2020) quienes evidenciaron una recuperación del 67% en vacas Angus multiparas no lactantes. Sin embargo, nuestros hallazgos contrastan con los resultados reportados por Morro et al. (2018), quienes al realizar recuperación de COC's en una vaca Parda Alpina y una Holstein reportan un 56,6% de efectividad, resultado que concuerda con lo descrito por Alvarado et al. (2016) en su trabajo en vacas Holstein (56,2%). La variabilidad de estos porcentajes puede tener relación con el factor individual del animal, raza, presión de vacío utilizada durante la OPU, diámetro de aguja, tamaño folicular, frecuencia de las maniobras de aspiración o la experiencia del técnico (Alvarado et al., 2016; Ciftci & Dinc, 2023; Ongaratto et al., 2020; Ruiz, 2010).

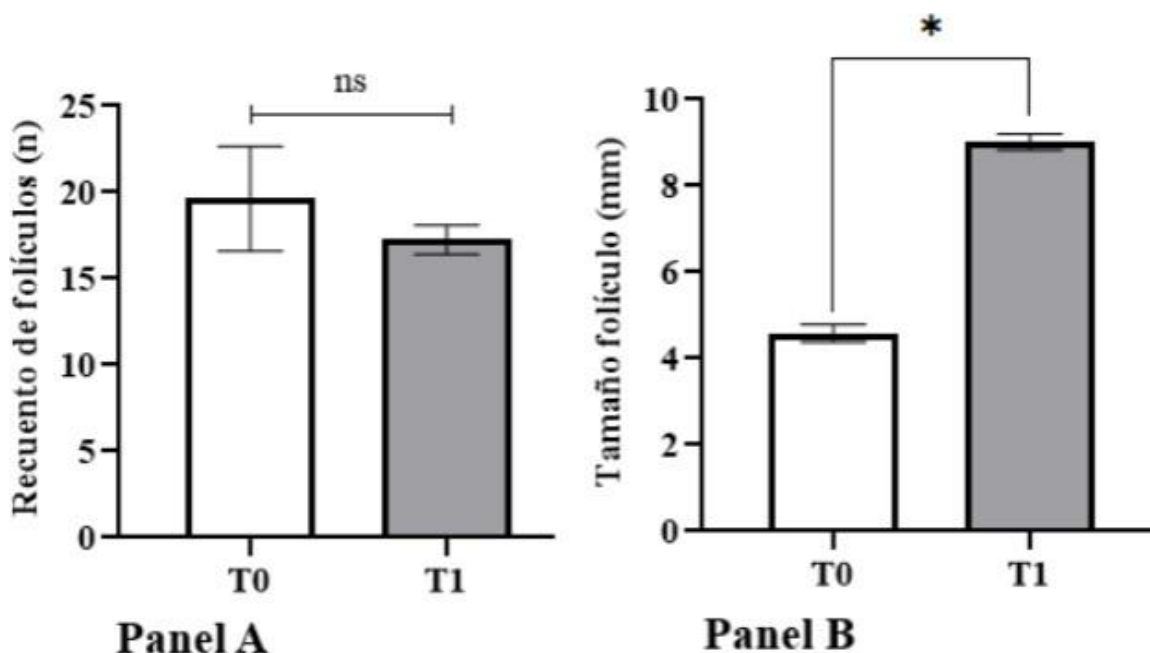
Al clasificar estos COC's se determinó que el 13,6% fueron considerados de tipo A, el 48,2% de tipo B, de tipo C un 23% y de tipo D un 15,2%, al agrupar en aptos y no aptos para la producción de embriones *in vitro* (PIVE) se estableció que el 61,8% fueron idóneos para ingresar a este proceso. A diferencia del estudio reportado por Ayala et al. (2020) se obtuvieron un 21,17% de COC's tipo A, 29,01% tipo B, 29,80% tipo C y 16,47% tipo D, considerándose un 50,19% aptos (A y B) para la PIVE, valor que es inferior al establecido en el presente trabajo.

## 5.1. Resultados del objetivo 1

### 5.1.1. Recuento y tamaño de folículos antrales

Se ha descrito que la población folicular en un animal es repetible y heredable, ligada a su característica individual (Burns et al., 2005). Partiendo de este principio fisiológico nos permitimos mencionar que los resultados obtenidos en cuanto al número de folículos antrales observados el día de la OPU, tanto en T0 ( $19,6 \pm 3,02$  folículos) como en T1 ( $17,3 \pm 0,83$  folículos), fueron similares ( $p= 0,462$ ; Fig. 8; Panel A), estos datos concuerdan con estudios anteriormente realizados en novillas Holstein donde se observó valores similares entre el tratamiento ( $23,10 \pm 4,40$ ) y el testigo ( $21,50 \pm 3,56$ ; Ciftci & Dinc, 2023).

Sin embargo, los animales que recibieron 250 UI de FSH/LH (T1) mostraron un folículo dos veces más grande ( $9,0 \pm 0,18$  mm) que los observados en los animales de T0 ( $4,6 \pm 0,20$  mm), con diferencia entre tratamientos ( $p < 0,0001$ ; Fig. 8; Panel B), esto concuerda con Ayala et al. (2020) en donde el tamaño folicular medio el día de la OPU en el grupo tratamiento (500 UI FSH/LH vía IM) duplica el tamaño de los folículos con respecto al grupo control, el cual no recibió estimulación hormonal, esto demuestra una respuesta positiva a la estimulación ovárica.



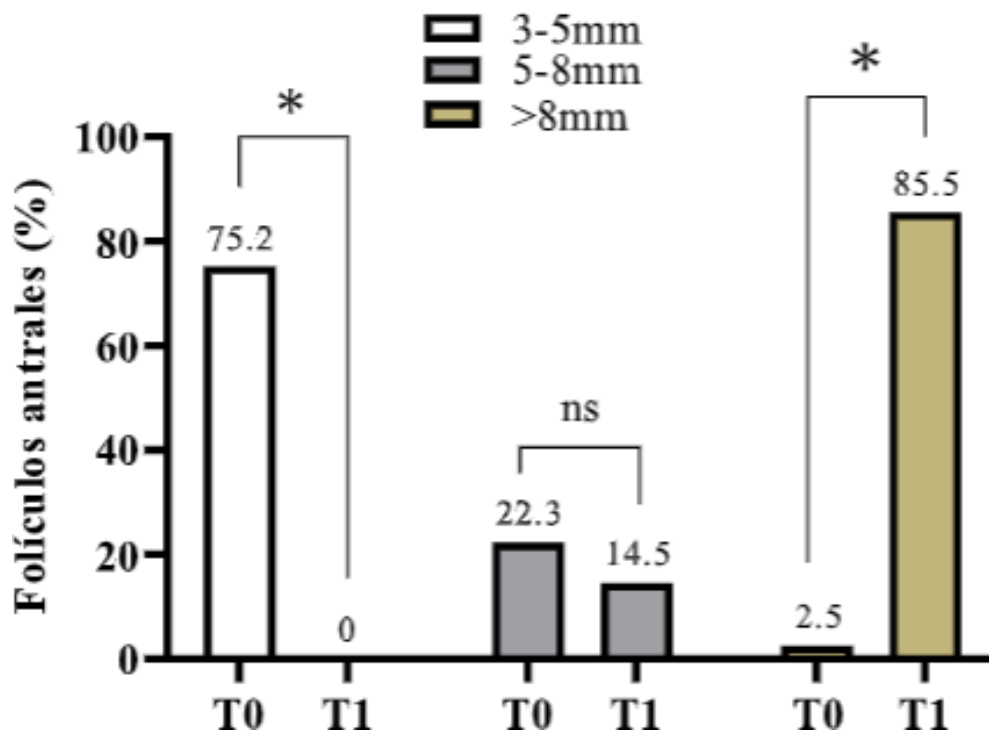
**Figura 8.** Media y error estándar del número de los folículos observados el día de la OPU en T0 y T1 (Panel A). Tamaño de los folículos visualizados el día de la OPU en los dos tratamientos (Panel B). Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. \*= diferencia entre tratamientos.

### 5.1.2. Clasificación de los folículos antrales en grupos según su tamaño

Los folículos registrados de los animales de T0 y T1 fueron clasificados en tres grupos de acuerdo con su tamaño (grupo 1: 3-5 mm; grupo 2: 5-8 mm; grupo 3: >8 mm). En T0 el día de la OPU mostraron un 75,2% de folículos con tamaños menores a 5 mm (grupo 1), además, de un 22,3% de su población folicular tenían tamaños que fluctuaban entre 5-8 mm y no presentaron folículos con tamaños sobre los 8 mm. Esta clasificación fue definida por el proceso fisiológico que se produce al utilizar  $P_4 + E_2$  como factor de reinicio de onda folicular, el cual produce su efecto en 4 días a partir de su aplicación (Mapletoft & Bó, 2012). En base a este principio y considerando que los folículos al entrar en la fase de reclutamiento tienen un tamaño entre 4 y 5 mm (Filipiak et al., 2016), se colocaron en el primer grupo folículos < 5 mm, mientras que en el segundo grupo se ubicaron folículos entre 5-8 mm, correspondientes a la fase de selección, y en el tercer grupo se dispusieron los folículos > 8 mm, tamaño que corresponde a la fase de dominancia (Morotti et al., 2018). A su vez, estudios realizados como el de Aguila et al. (2020) recomiendan aspirar folículos con un tamaño entre 6-10 mm, esta

aseveración fue corroborada por Estrella et al. (2017) quienes durante las sesiones de la OPU visualizaron folículos entre 4 y 8 mm obteniendo mayor número y calidad de COC's. Por lo tanto, existe evidencia científica que demuestra una relación directa entre el tamaño del folículo y la calidad de los COC's.

Por el contrario, los animales que recibieron 250 UI de FSH/LH 48h antes de la OPU, de su total de población folicular mostraron un 85,5% con un tamaño superior a 8 mm, y apenas el 14,5% presentaban entre 5-8 mm, sin evidencia de folículos pequeños con tamaños entre 3-5 mm (Fig. 9). Estos resultados son similares a los obtenidos por Vieira et al. (2014), los cuales al haber realizado estimulación ovárica a base de FSH en dosis de 200 mg IM, obtuvieron una mayor visualización de folículos medianos (55,1%) y grandes (36,2%), demostrando de esta manera que el uso de la FSH permite el crecimiento de los folículos a corto plazo. Esta información fue corroborada por Sakaguchi et al. (2018) al utilizar FSH/LH como factor de estimulación ovárica, usando una diferente vía de administración (vía epidural), con el propósito de ralentizar la vida media de esta hormona. Farías et al. (2023) describen que al aplicar esta hormona vía epidural permite una liberación paulatina y constante comparada con la administración IM, manteniendo altos niveles de FSH durante las primeras 50 horas post aplicación. A pesar de ello, el crecimiento excesivo que obtuvimos compromete la cantidad de los COC's recuperados, ya que reduce su tasa de recuperación al momento de la aspiración (Pytel et al., 2024).

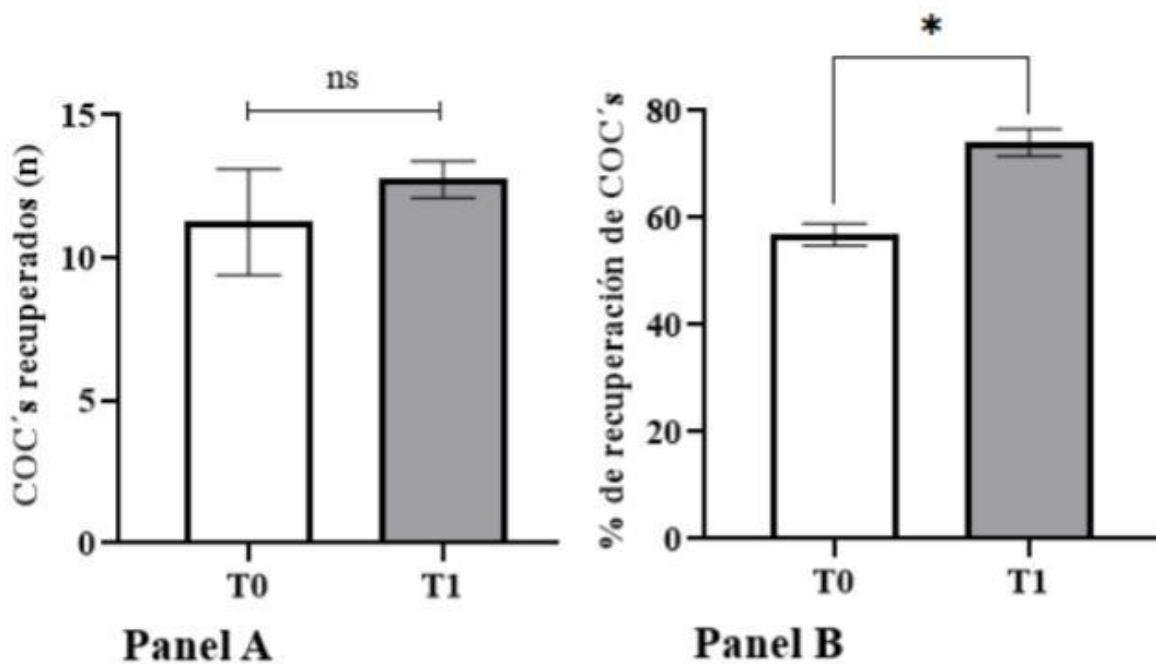


**Figura 9.** Porcentaje de folículos presentes en cada grupo (grupo 1: 3-5 mm; grupo 2: 5-8 mm; grupo 3: >8 mm), comparados entre tratamientos T0 y T1. Prueba de Chi cuadrado al 5%.

## 5.2. Resultados del objetivo 2

### 5.2.1. Recuento de COC's recuperados

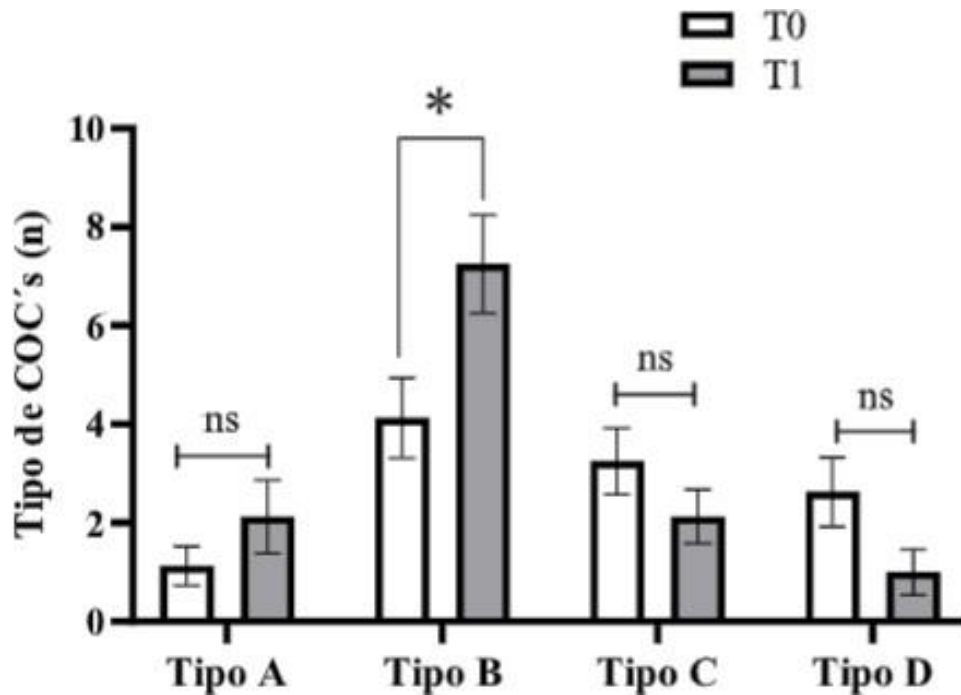
La cantidad de COC's entre T0 y T1 ( $93 \pm 1,85$  COC's y  $102 \pm 0,64$  COC's respectivamente) resultaron semejantes ( $p= 0,459$ ; Fig. 10; Panel A). Sin embargo, en cuanto al porcentaje de recuperación, se estableció diferencia estadística entre los grupos estudiados, determinando un porcentaje de recuperación de  $59,2\% \pm 2,04$  en T0 y de  $73,9\% \pm 2,55$  en T1, con una diferencia de  $14,7\% \pm 3,27$  entre grupos ( $p<0,0001$ ; Fig. 10; Panel B). Resultados similares reporta Supliguicha (2024), quien evidencia que la administración vía epidural de 250 UI de FSH en vaquillas Holstein aumentó en un 17,6% la tasa de recuperación de COC's, comprobando que el porcentaje de recuperación de ovocitos incrementa en bovinos sometidos a un protocolo de estimulación ovárica con FSH en comparación con grupos sin dicha estimulación (Morera et al., 2022).



**Figura 10.** Media y error estándar del número de complejos cúmulo ovocitos (COC's) recuperados mediante la aspiración ecoguiada en T0 y en T1 (Panel A). Porcentaje de recuperación de COC's mediante OPU en los dos tratamientos (Panel B). Prueba de T de Student al 5%. ns = no hay diferencia entre tratamientos. \* = diferencia entre tratamientos.

### 5.2.2. Clasificación de los COC's recuperados en grupos según su calidad

Al categorizar los COC's recuperados según su calidad; tipo A, B, C, y D, los resultados obtenidos en T0 y en T1 fueron de tipo A ( $1,1 \pm 0,3$ ;  $2,1 \pm 0,7$ ) tipo B ( $4,1 \pm 0,8$ ;  $7,2 \pm 0,9$ ) tipo C ( $3,2 \pm 0,6$ ;  $2,1 \pm 0,5$ ) y tipo D ( $2,6 \pm 0,7$ ;  $1,0 \pm 0,4$ ) respectivamente; por lo que, se evidenció diferencia entre tratamientos en los de tipo B ( $p = 0,029$ ), mientras que, en los de tipo A, C y D, los resultados fueron similares ( $p = 0,255$ ;  $p = 0,217$ ;  $p = 0,075$ ) de forma correspondiente (Fig. 11).

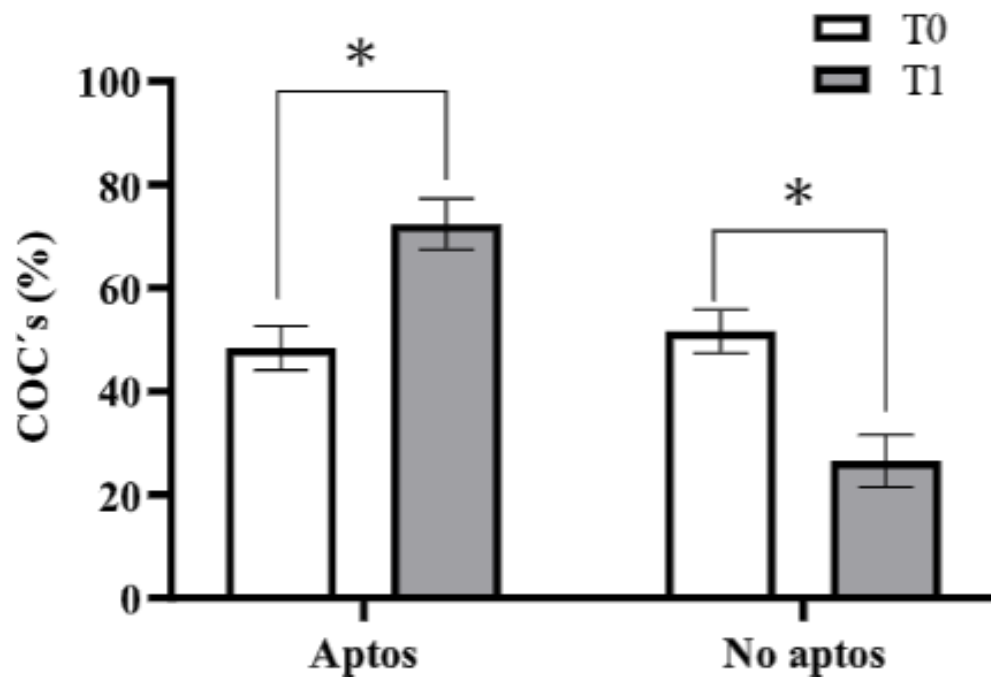


**Figura 11.** Media y error estándar del número de COC's clasificados en cada uno de sus tipos: A, B, C y D, comparados en T0 con T1 obtenidos en la OPU. Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. \*= diferencia entre tratamientos.

### 5.2.3. Clasificación de los COC's recuperados en aptos y no aptos

La clasificación de los COC's según su calidad (A, B, C y D) permitió reunir en dos grupos, aptos (Tipo A y B) y no aptos (Tipo C y D). Se registró que el porcentaje de COC's aptos de T1 ( $72,4 \pm 4,9$ ) fue mayor a los obtenidos en T0 ( $48,3 \pm 4,2$ ), a diferencia de los no aptos, en los cuales el resultado en T0 ( $51,6 \pm 4,2$ ) fue superior a T1 ( $26,5 \pm 5,0$ ) (Fig. 12).

El porcentaje de COC's aptos fueron mayores a los de Samaniego et al. (2017), en el cual obtuvieron 65,3% de tipo A y B usando 500 UI de FSH/LH, y de igual forma fueron superiores a los recuperados por Restrepo et al. (2011) ya que al haber usado en menor proporción la dosis de LH (16%) con respecto a la FSH (84%) se obtuvieron en mayor proporción COC's de menor calidad (Tipo C en un 60%), estos resultados demuestran indirectamente que la utilización en dosis bajas de LH produce un desarrollo asincrónico entre el folículo y el ovocito, lo cual se corregiría al usar en proporciones similares de FSH/LH según lo describe Ondiz & Ruíz (2011).



**Figura 12.** Porcentaje de COC's aptos y no aptos obtenidos en T0 y T1. Prueba de T de Student al 5%. ns= no hay diferencia entre tratamientos. \*= diferencia entre tratamientos.

## 6. Conclusiones

La estimulación ovárica con 250 UI de FSH/LH vía epidural 48h antes de la OPU, no alteró el número de folículos antrales presentes el día de la aspiración ecoguiada, sin embargo, esta acción hormonal provocó un crecimiento del folículo a un tamaño superior a 8 mm considerado como deseable para la recuperación de COC's aptos para la PIVE, esto fue evidenciado al obtener mayor recuperación de COC's al utilizar estimulación ovárica, lo cual permitió obtener 1,5 veces más COC's aptos para PIVE. Por lo tanto, la vía epidural puede ser utilizada de forma confiable para la administración de FSH/LH, con resultados alentadores comparables a los obtenidos a vías convencionales en dosis altas y consecutivas.

## 7. Recomendaciones

- Debido a las limitaciones logísticas y presupuestarias, se considera interesante volver a realizar el estudio, pero con la terminación en PIVE.
- A pesar de los resultados alentadores obtenidos, se sugiere implementar nuevas investigaciones con diferentes dosis y tiempos de crecimiento folicular.
- Considerando la altura de las ganaderías en las cuales se realizó el presente trabajo, sería pertinente evaluar diferentes presiones para la OPU, con el fin de estandarizar una presión para la aspiración de folículos mayores a 8 mm en estas condiciones ambientales.

## 8. Referencias

- Abdullah, P. (2000). *Synchronization of follicular development oestrus and ovulation using oestradiol benzoate and progesterone in dairy cattle* (Master's thesis, Massey University). Massey University Repository. [https://www.academia.edu/70216863/Synchronization\\_of\\_follicular\\_development\\_oestrus\\_and\\_ovulation\\_using\\_oestradiol\\_benzoate\\_and\\_progesterone\\_in\\_dairy\\_cattle\\_a\\_thesis\\_presented\\_in\\_partial\\_fulfillment\\_of\\_the\\_requirements\\_for\\_the\\_degree\\_of\\_Master\\_of\\_Philosophy\\_Veterinary\\_Clinical\\_Science\\_at\\_Massey\\_University](https://www.academia.edu/70216863/Synchronization_of_follicular_development_oestrus_and_ovulation_using_oestradiol_benzoate_and_progesterone_in_dairy_cattle_a_thesis_presented_in_partial_fulfillment_of_the_requirements_for_the_degree_of_Master_of_Philosophy_Veterinary_Clinical_Science_at_Massey_University)
- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Aldana, B., & Pinilla, L. (2021). *Técnicas de biotecnología para obtención de embriones bovinos* (Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia). Repositorio institucional UCC. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/718e44ac-dc4b-4ce3-8d0a-ca1de409d4ff/content>
- Alvarado, A., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillán, V. (2016). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein de descarte. *Anales científicos*, 77(1), 63-68. <https://doi.org/10.21704/ac.v77i1.545>
- Arega, H. (2019). Review on Growth and Development of Multiple Ovulation and Embryo Transfer Technology in Cattle. *World Scientific News*, 127(3), 191-211. [https://www.researchgate.net/publication/341701113\\_Review\\_on\\_Growth\\_and\\_Development\\_of\\_Multiple\\_Ovulation\\_and\\_Embryo\\_Transfer\\_Technology\\_in\\_Cattle](https://www.researchgate.net/publication/341701113_Review_on_Growth_and_Development_of_Multiple_Ovulation_and_Embryo_Transfer_Technology_in_Cattle)
- Aréchiga, C., Cortés, Z., Hernández, P., Flores, G., Rochín, F., & Ruiz, E. (2019). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico veterinario*, 9. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Atuesta, J., & Gonella, Á. (2011). Hormonal control of the estrous cycle in cattle and sheep. *Spei Domus*, 7(14), 15–25. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/598>
- Ayala, L., Samaniego, J., Argudo, D., Perea, M., Perea, F., Rodas, E., & Nieto, P. (2020). The time interval between ovarian stimulation with FSH/LH and ovum-pick up affects the quantity, quality and developmental competence of oocytes retrieved from Ecuadorian

- creole heifers. *Revistas de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1). <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/17571>
- Ayala, L., Nieto, P., Rodas, E., Sarmiento, S., & Dután, J. (2020). Control de la emergencia de la onda folicular mediante la aplicación de benzoato de estradiol, GnRH y ablación folicular en el metaestro tardío en vaquillas de trópico alto. *Revistas de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.17009>
- Baracaldo, M., Martinez, M., Adams, G., & Mapletoft, R. (2000). Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, 53, 1239-1250. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00268-5)
- Baruselli, P., de Abreu, L., Chechin, B., dos Santos, A., Mattos, L., Almeida, E., Albertini, S., Sousa, J., & Rodrigues, C. (2023). Use of new recombinant proteins for ovarian stimulation in ruminants. *Animal Reproduction*, 20(2). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0092>
- Baruselli, P., Sales, J., Crepaldi, G., Marques, M., Ferreira, R., de Sá, M., & Vieira, L. (2012). Uso de eCG asociada al control de la dinámica folicular: IATF, TETF y SPO. *Taurus*, 62, 32-42. <https://www.revistataurus.com.ar/sistema/uploads/1129/entradas/06-revisiones-bibliograficas-62.pdf>
- Bergfelt, D., Lighfoot, K., & Adams, G. (1994). Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. *Theriogenology*, 41(1). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90113-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90113-W)
- Bertolini, M., & Bertolini, L. (2009). Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Rev.med.vet.zoot*, (56), 184-194. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/10160052.pdf>
- Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J., Hernández, J., Hernández Cerón, J., Páramo, R., Porras, A., Rangel, L., Salgado, B., Valencia, J., & Zarco, L. (2023). *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (2.ª ed). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad de México. [https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia\\_Reproductiva.pdf](https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Reproductiva.pdf)
- Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 9(3), 362-369. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a605af7783717068b46f3/pdf/animreprod-9-3-362.pdf>

- Bols, P., & Stout, T. (2018). Recuperación de ovocitos guiada por ecografía transvaginal (OPU: Ovum Pick-Up) en vacas y yeguas. En H. Niemann & C. Wrenzycki (Eds.), *Animal biotechnology 1: Reproductive biotechnologies* (pp. 209–233). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10)
- Brogliatti, G., & Adams, G. (1996). Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45(6), 1163-76. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00072-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00072-6)
- Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L., Knight, P. G., & Ireland, J. J. (2005). Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of reproduction*, 73(1), 54-62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
- Callesen, H., Liboriussen, T., & Greve, T. (1996). Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42, 215-226. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432096015138>
- Campo, C. (1985). Ciclo estral en bovinos y efecto de algunas hormonas sobre el cuerpo lúteo. *Ciclo estral en bovinos y efecto de algunas hormonas sobre el cuerpo lúteo* (3.ª ed.). Uruguayas de Buiatría. <http://dspace.fvet.edu.uy:8080/xmlui/handle/123456789/1079>
- Carvajal, A., Martínez, E., & Tapia, M. (2020). *El ciclo estral en la hembra bovina y su importancia productiva*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28255.28329>
- Carvalho, C., Costa, A., Costa, F., Ruiz, J., de Andrade, J., de Souza, A., & Siqueira, E. (2021). Improvement in early antral follicle development and gene expression modulation prior to follicle aspiration in bovine cumulus-oocyte complexes by equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 172, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.003>
- Castillo, J. (2023). *Criterios de clasificación morfológica de ovocitos bovinos provenientes de la planta de beneficio de García Rovira* (Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander). Repositorio de la Universidad Industrial de Santander. <https://noesis.uis.edu.co/server/api/core/bitstreams/1a3888b9-907a-4494-866f-f287881bd0ee/content>
- Cavalieri, J., Hepworth, G., & Macmillan, K. (2004). Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronisation of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5–9 days and duration of the oestrous cycle and

- concentrations of progesterone following ovulation. *Animal Reproduction Science*, 81(4), 177-193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00156-8)
- Čech, S., Havlicek, V., Lopatářová, M., Vyskočil, M., & Dolezel, R. (2002). Effects of superstimulation with FSH on follicular population and recovery rate of oocytes in the growing phase of the first and second follicular wave. *Veterinární Medicína*, 47(1), 33-37. <https://doi.org/10.17221/5800-VETMED>
- Ciftci, M., & Dinc, D. (2023). The effect of different FSH administration before ovum pick up on superstimulation response and oocyte yield. *Reproduction in domestic animals*, 58(8), 1055–1062. <https://doi.org/10.1111/rda.14394>
- Chaubal, S., Molina, J., Ohlrichsb, C., Ferré, L., Faberb, D., Bolsc, P., Reisen, J., Tiana, X., & Yang, X. (2006). Comparación de diferentes protocolos de recogida de óvulos transvaginales para optimizar la recuperación de ovocitos y la producción de embriones durante un período de 10 semanas en vacas. *Theriogenology*, 65(8), 1631-1648. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243385/>
- Colazo, M., & Mapletoft, R. (2014). Fisiología del Ciclo Estral Bovino. *Revista Ciencias Veterinarias*, 16(2), 31–46. <https://doi.org/10.19137/cienvet20141623>
- De Roover, R., Feugang, J., Bols, P., Genicot, G., & Hanzen, C. (2008). Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Sven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(5), 536-542. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
- Ding, L., Tian, H., Jun, R., Chen, J., Sha, H., Chen, J., & Cheng, G. (2008). Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 75(12), 1710-1715. <https://doi.org/10.1002/mrd.20922>
- Dogan, H., & Yenilmez, K. (2024). Factors influencing ovum pick-up technique results in cattle. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 8(1), 13-23. <https://doi.org/10.30704/http-www-ijvs-net.1403722>
- Dután, J. (2013). *Eficacia de la prostaglandina y benzoato de estradiol para sincronización de celo en vacas* (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://restdspace.ucuenca.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c45903e8-a30e-472b-9d07-5480649b869e/content>

- Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J., & Aréchiga, C. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos. *Scielo*, 32(2).  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442007000200006&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442007000200006&script=sci_arttext)
- Estrella, C., Suconota, G., & Ayala, L. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana*, (8), 101-103.  
<https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1499>
- Faizah, H., Richard, F., Meena, P., Stanley, K., Amriana, H., Alhassany, A., Yadav, S., Marie, L., Crouch, B., & Saipul, B. (2018). Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) In Dairy Cattle in Gatton. *Malaysian journal of veterinary research*, 9(2), 109-116.  
<https://agris.fao.org/search/en/providers/122640/records/647473a42d3f560f80ab925c>
- Farías, M., Zambrano, J., Jácome, A., Dután, J., Garay, G., & Ayala, L. (2023). Effect of Follicle-stimulating hormone administered epidural on ovarian response and hormone profile in Holstein cows. *Revista Científica de La Facultad de Veterinaria*, 33(2).  
<https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33253>
- Franco, J., & Uribe, L. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 41-56.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1657-95502012000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502012000100006)
- Fernández, A. (2003). *Dinámica folicular: funcionamiento y regulación*. Producción Animal: Laboratorio de Especialidades Veterinarias. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/23-ondas\\_foliculares.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.pdf)
- Ferreira, E. (2016). *La importancia de la progesterona*. Producción animal: Laboratorio de Especialidades Veterinarias. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/249-importancia\\_progesterona.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/249-importancia_progesterona.pdf)
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle. *Veterinaria (Montevideo)*, 52, 14-22. <https://revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/106/52>
- Fonseca, F., Britt, J., McDaniel, B., Wilk, J., & Rakes, A. (1983). Effect of controlled calving season on dairy herd performance. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1128-1147.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81915-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81915-7)

- Gutiérrez, J. (2008). *Hormonas de la reproducción bovina*. En C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury & E. Soto Belloso (Eds.), *Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito* (Cap. XLII, pp. 515–530). Fundación GIRARZ. <https://www.scribd.com/document/121460823/Hormonas-de-La-Reproduccion-Bovina>
- Guzmán, M. (2018). *Importancia de los quistes ováricos en la ganadería de leche bovina* (Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia). Repositorio Institucional Universidad Cooperativa de Colombia. <https://hdl.handle.net/20.500.12494/6224>
- Hasler, J. (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. *Theriogenology*, 81(1), 152-169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hassanein, E., Szelényi, Z., & Scenzi, O. (2024). Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH) and its agonists in Bovine Reproduction I: Structure, Biosynthesis, Physiological Effects, and its role in estrous Synchronization. *Animals*, 14(10), 1473. <https://doi.org/10.3390/ani14101473>
- Held, E. (2014). *Sperm Notes:Ovum Pick-Up y producción in vitro de embriones bovinos*. Minitüb GmbH.[https://www.minitube.com/userdata/filegallery/original/111\\_spermnotes\\_bovine\\_en\\_140729.pdf](https://www.minitube.com/userdata/filegallery/original/111_spermnotes_bovine_en_140729.pdf)
- Hernández, B., Cervantes, P., & Montiel, F. (2008). *Caracterización del gen receptor de FSH en vacas Bos taurus, B. indicus e híbridas, empleando marcadores moleculares RFLP's*. En *Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano 2008* (pp. 317–328). INIFAP, Universidad Veracruzana, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo, Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván, Instituto Tecnológico de Boca del Río, Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.scribd.com/document/740457437/Caracterizacion-Del-Gen-Receptor-FSH-en-Vacas>
- Hernández, J. (2016). *Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia\\_Clinica.pdf](https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf)
- Hernández, R., Sánchez, A., Ramírez, R., & Morales, J. (2010). Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: el papel de la hipófisis y los esteroides

- sexuales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 13(2), 103-112. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2010000200004&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2010000200004&script=sci_arttext)
- Islam, R. (2011). Synchronization of estrus in cattle: a review. *Veterinary world*, 4(3), 136-141. <https://www.veterinaryworld.org/Vol.4/March%20-%202011/Synchronization%20of%20Estrus%20in%20Cattle.pdf>
- Jiménez, A. (2016). *El ciclo estral bovino: regulación neuroendocrina*. Producción animal: Laboratorio de especialidades veterinarias — Argentina. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/246-El\\_Ciclo\\_Estral.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/246-El_Ciclo_Estral.pdf)
- Kimura K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *The Journal of reproduction and development*, 62(5), 423–429. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-066>
- Lamb, G., Dahlen, C., Larson, J., Marquezini, G., & Stevenson, J. (2010). Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 88, 181-192. [https://www.researchgate.net/publication/26840531\\_Control\\_of\\_the\\_estrous\\_cycle\\_to\\_improve\\_fertility\\_for\\_fixed-time\\_artificial\\_insemination\\_in\\_beef\\_cattle\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/26840531_Control_of_the_estrous_cycle_to_improve_fertility_for_fixed-time_artificial_insemination_in_beef_cattle_A_review)
- Ledur, F. (2013). *Control del desarrollo folicular para la obtención de COCs por aspiración guiada por ultrasonografía* (Tesis de maestría, Instituto de Reproducción Animal Córdoba). IRAC-Biogen. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/CONTROL-DEL-DESARROLLO-FOLICULAR-PARA-LA-OBTENCION-DE-COCS-POR-ASPIRACION-GUIADA-POR-ULTRASONOGRAFIA-Felipe-Ledur-Ongaratto.pdf>
- Loayza, H. (2017). *Diseño de estrategias para el manejo reproductivo e implementación de biotecnologías reproductivas para el hato lechero de la Estación Agropecuaria UTPL* (Tesis de pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja) Repositorio Institucional UTPL. <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/20825/1/Loayza%20Arias%20Hugo%20Renán.pdf>
- Looney, C., Boutte, B., Archbald, L., & Godke, R. (1981). Comparison of once daily and twice FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology*, 15 (1), 13-22. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80014-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80014-3)

- Lucy, M. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End?. *Journal Dairy Science*, 84, 1277-1293. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70158-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0)
- López, A. (2017). *Factores asociados a la obtención de ovocitos para FIV (fertilización in vitro) por medio de la técnica de OPU (Ovum pick-up) en ganado Bos Taurus* (Tesis de pregrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Repositorio Institucional Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/42591>
- Lopez, H., Sartori, R., & Wiltbank, M. (2005). Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, 72(4), 788-95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15525815/>
- López, M. (2012). *Conocimientos generales: Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora Fisiología de la pubertad y del climaterio* (Notas de seminario, Servicio de Obstetricia y Ginecología). [https://www.chospab.es/area\\_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2012-2013/sesion20120620.pdf](https://www.chospab.es/area_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2012-2013/sesion20120620.pdf)
- Macedo, R., Gondim, F., Fernández, M., Cavalcanti, M., Lopes, F., & Oliveira, M. (2011). Maduración nuclear in vitro y muerte celular por apoptosis en oocitos caprinos en periodos secos y lluviosos. *Ciencia Animal Brasileira*, 12(4). <https://doi.org/10.5216/cab.v12i4.9187>
- Mapletoft, R., & Bó, G. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278–283. <https://doi.org/10.1071/RD11919>
- Mapletoft, W., Bennett, K., & Adams, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproducción Nutrición Desarrollo*, 42, 601-611. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>
- Martínez, Á. (2023). *Parámetros moleculares de competencia ovocitaria en las células del cúmulo humanas y bovinas* (Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid). Repositorio Institucional Universidad Complutense de Madrid. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/115086>
- Matamoros, R., & Salinas, P. (2017). *Fundamentos de Fisiología y Endocrinología Reproductiva en los Animales Domésticos* (1.<sup>a</sup> ed.).

[https://www.academia.edu/42069596/Fundamentos de Fisiología y Endocrinología Reproductiva en Animales Domésticos](https://www.academia.edu/42069596/Fundamentos_de_Fisiología_y_Endocrinología_Reproductiva_en_Animales_Domésticos)

- Merton, J., De Roos, P., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., Vos, L., & Dieleman, S. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651-674. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3)
- Mogollón, E., & Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de fsh. *Spei Domus*, 9(18), 37-47. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/download/545/518/1121>
- Moreno, D. (2018). *Estado actual, proyecciones y perspectivas de la fertilización in vitro (FIV) en la ganadería bovina en Colombia* (Monografía de especialización, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)). Repositorio Institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21321>
- Morera, A., Velasco, E., Heras, S., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (FOLLTROPIN®) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 36(1), 1-17. <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/538651>
- Morgan, K., Sellar, R., Pawson, A., & Millar, R. (2006). Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) — II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology*, 147, 5041-5051. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0222>
- Morotti, F., Moretti, R., Gomes, G., Silva, K., Ramos, P., & Marcondes, M. (2018). Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 188, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001>
- Morro, L., & Sena, L., & Ruiz, S. (2018). Rendimiento de opu en vacas secas con estimulación ovárica de fsh (pluset). *Anales de Veterinaria de Murcia*, 32, 93-94. [https://www.researchgate.net/publication/328449717\\_Rendimiento de OPU en vacas secas con estimulacion ovarica de FSH](https://www.researchgate.net/publication/328449717_Rendimiento_de_OPU_en_vacas_secas_con_estimulacion_ovarica_de_FSH)
- Motta, P., Ramos, N., González, C., & Castro, E. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet.Zootec*, 5, 88–99. [https://www.researchgate.net/publication/311487357\\_Dinamica\\_folicular\\_en\\_la\\_vida\\_re](https://www.researchgate.net/publication/311487357_Dinamica_folicular_en_la_vida_re)

[productiva de la hembra bovina Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock](#)

- Munar, C. (2024). La transferencia de embriones en rodeos de cría. *Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial (CABIA)*. <https://cabia.org.ar/transferencia-de-embriones>
- Nava, H., & Hernández, H. (2005). Aspiración folicular transvaginal. En *Manual de Ganadería Doble Propósito* (págs. 611–614). Astro Data. [https://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros\\_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo3-s8.pdf](https://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo3-s8.pdf)
- Ongaratto, F., Cedeño, A., Rodríguez, P., Tríbulo, A., & Bó, G. (2020). Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. *Animal reproduction science*, 214, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>
- Pieterse, M., Kappen, K., Kruij, T., & Taverne, M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4), 751-762. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90310-X)
- Puerta, L. (2006). *Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación in vitro (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hato ganadero colombiano* (Tesis de pregrado, Universidad de la Salle). Repositorio Institucional Ciencia Unisalle. <https://hdl.handle.net/20.500.14625/23714>
- Pérez, M. (2004). Relación neuroendócrina del ciclo estral en la hembra bovina. *Respuestas*, 9, 10–21. <https://doi.org/10.22463/0122820x.700>
- Pérez, M., Rodríguez, I., España, F., Dorado, M., Hidalgo, M., Corral, S., & Sanz, J. (2004). Dinámica folicular ovárica en vacas repetidoras: estudio ecográfico y perfil de progesterona ovarian follicular dynamics in repeat breeder cow: ultrasonography and progesterone level. *Archivos de Zootecnia*, 53, 35–46. <http://hdl.handle.net/10396/2794>
- Pytel, A., Galeńska, K., Gajewski, Z., & Papis, K. (2024). Factors defining developmental competence of bovine oocytes collected for in vitro embryo production. *Biology of Reproduction*, 111(1), 1-10. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioae065>

- Qi, M., Yao, Y., Ma, H., Wang, J., Zhao, X., Liu, L., & Sun, F. (2013). Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering*, 18(2). <https://www.omicsonline.org/open-access/mir-is-associated-with-expression-gastric-carcinoma-of-xenografted-model-1662-100X.1000118.pdf>
- Quijano, L., Artunduaga, J., & López, R. (2015). Evaluación de dos protocolos de inseminación artificial a término fijo (IATF) con dos inductores de ovulación (benzoato de estradiol y cipionato de estradiol) en vacas raza criollo caqueteño en el departamento del Caquetá. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(9), 1-11. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63641785003.pdf>
- Quispe, E. (2016). *Hormonas esteroides para la sincronización de la onda folicular en vacas de allpachaka-ayacucho 3550 m.s.n.m* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga). Repositorio Institucional UNSCH. [https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/2800/1/TESIS%20MV160\\_Qui.pdf](https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/2800/1/TESIS%20MV160_Qui.pdf)
- Restrepo, G., Gomez, J., & Vasquez, N. (2011). Evaluation of the ovarian superstimulation and quality of bovine oocytes obtained by ovum pick up. *Revista politécnica*, (13), 16-21. <https://revistapolitecnica.edu.ec/index.php/revista/article/view/1234>
- Ribas, B., Missio, D., Roman, I., Neto, N., Claro, I., dos Santos, D., & Leivas, F. (2018). Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.006>
- Rippe, C. (2009). El ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*. [https://www.academia.edu/11580285/Ciclo\\_Estral](https://www.academia.edu/11580285/Ciclo_Estral)
- Robson, C., Aguilar, D., López, S., Calvi, M., Cerlser, R., Flores, F., & Gómez, M. (2004). *Inseminación artificial en bovinos*. Ediciones INTA. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/188-Inseminacion\\_2004.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/188-Inseminacion_2004.pdf)
- Rodrigues, E. (1991). *O ciclo estral de bovinos e métodos de controle*. Embrapa-CNPGC. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/321570>
- Romero, J. (2019). *Producción de embriones in vitro con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas* (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/32174>

- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Asprón, M., Ríos, A., Pérez, S., & De La Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Rev.mex.de.cienc.pecuarias*, 12(3). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Ruiz, S., & Ondiz, A. (2011). Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU), producción in vitro de embriones (PIV) y semen sexado en la reproducción bovina. En C. González-Stagnaro, E. Soto Belloso & N. Madrid (Eds.), *Innovación y tecnología en la ganadería doble propósito*. Fundación Grupo de Investigadores de la Reproducción Animal en la Región Zuliana. <https://www.studocu.com/co/document/universidad-del-tolima/salud-integral-reproductiva-y-neonatal/de-ondiz-aruiz-s-transferencia-de-embriones/31706576>
- Ruiz, S. (2010). Ovum pick up (OPU) en bovinos: aplicaciones en biotecnología de la reproducción. *Cría y salud*, 31, 58-64. [https://www.researchgate.net/publication/260359949\\_Ovum\\_Pick\\_Up\\_OPU\\_en\\_bovinos\\_Aplicaciones\\_en\\_Biotecnologia\\_de\\_la\\_Reproduccion](https://www.researchgate.net/publication/260359949_Ovum_Pick_Up_OPU_en_bovinos_Aplicaciones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion)
- Ruiz, S. (2014). *OPU (Ovum Pick Up) en bovinos*. Universidad de Murcia. [https://www.researchgate.net/publication/277307597\\_OPU\\_Ovum\\_Pick\\_Up\\_en\\_bovinos](https://www.researchgate.net/publication/277307597_OPU_Ovum_Pick_Up_en_bovinos)
- Ruíz, S., Romero, 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, 81-84. <https://doi.org/10.1111/rda.12179>
- Saavedra, O., Ramírez, I., García, J., Ceballos, G., Méndez, E. (2012). Colesterol: función biológica e implicaciones médicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(2). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952012000200002&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952012000200002&script=sci_arttext)
- 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. *The Journal of reproduction and development*, 64(5), 451–455. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-007>

- Sakaguchi, K., Suda, T., Ninpetch, N., Kawano, K., Yanagawa, Y., Katagiri, S., Yoshioka, K., & Nagano, M. (2022). Plasma profile of follicle-stimulating hormone and sex steroid hormones after a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae in Holstein dry cows. *Animal science journal*, 93(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13696>
- Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 31(3). <https://revistaveterinaria.org.pe/articulo/tecnicas-fertilizacion-bovinos.pdf>
- Samaniego, J. (2017). *Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas* (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/items/fe567f8d-f3c9-4475-9cfc-74d70f98f40f>
- Samaniego, J., Ayala, L., Nieto, P., Rodas, R., Vázquez, J., Murillo, Y., & Perea, F. (2017). Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo. *Maskana*, (8), 77-80. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>
- Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Hadelar, K. G., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 106(1–2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.007>
- Sintex. (2005). *Fisiología reproductiva del bovino*. Producción animal: Laboratorio de especialidades veterinarias — Argentina. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/71-fisiologia\\_reproductiva\\_del\\_bovino.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/71-fisiologia_reproductiva_del_bovino.pdf)
- Slade, C., Varella, R., & Capobiango, C. (2014). *Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica* (1.ª ed.). Embrapa Gado de Leite. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1015853/1/BiotecnicasparaProducaoemBovinos.Documentos175.pdf>
- Solís, A., Guerra, R., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman.

*Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10), 1-16. [https://revistaveterinaria.org/archivo/13-10/solis\\_et\\_al.pdf](https://revistaveterinaria.org/archivo/13-10/solis_et_al.pdf)

Supliguicha, J. (2024). *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* (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/items/0c7b01b7-d8d8-478c-b193-4eaac402e1c1>

Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., & Sasamoto, S. (1995). Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 43(7), 1259–1268. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00097-r](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00097-r)

Telésforo, A. (2011). *Origen y migración de las neuronas GnRH en el bovino (Bos Taurus)* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de la Plata). Repositorio de la Universidad Nacional de la Plata. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/124135/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/124135/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Tovío, N., & Duica, A. (2012). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Spei Domus*, 8. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/95>

Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R., & Bó, G. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77(8), 1679–1685. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.013>

Ugalde, J. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 33-34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193030122009>

Urrego, R., & Restrepo, G. (2006). Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(2), 64-78. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428499006>

van Wagtenonk, A., Mullaart, E., de Roos, A., Merton, J., den Dass, J., Kemp, B., & de Ruigh, L. (2000). Effects of different reproduction techniques: AI, MOET OR IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, 53, 575-597. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00259-9)

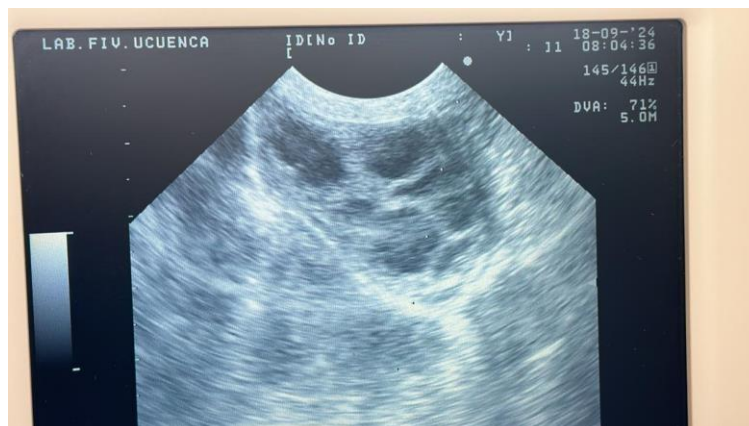
- Viana, J. (2024). 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 42(4). [https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2023.pdf](https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2023.pdf)
- Vieira, L., Rodrigues, C., Castro, A., Guerreiro, B., Silveira, R., Freitas, B., Bragança, G., Marques, N., Sá, M., Bó, G., Mapletoft, R., & Baruselli, P. (2016). Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*, 85(5), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.036>
- Vieira, L., Rodrigues, C., Castro, A., Guerreiro, B., Silveira, C., Moreira, R., Sá, M., Bó, G., Mapletoft, R., & Baruselli, P. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318-24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>
- Watanabe, Y., de Souza, A., Mingoti, R., Ferreira, R., Batista, O., Dayan, A., & Baruselli, P. (2017). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction*, 14(3), 635-644. <https://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR1008>
- Williams, J., & Trujillo, M. (2022). *Inducción de la pubertad en vaconas Brangus con dispositivos intravaginales de progesterona y benzoato de estradiol* (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López). Repositorio ESPAM. [https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1883/1/TIC\\_MV09D.pdf](https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1883/1/TIC_MV09D.pdf)
- Wrenzycki, C. (2018). In vitro production of (farm) animal embryos. En H. Niemann & C. Wrenzycki (Eds.), *Animal biotechnology 1: Reproductive biotechnologies*. Springer. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_12)

## 9. Anexos



**Anexo A:** Selección de donadoras.

**Fuente:** Autores



**Anexo B:** Recuento de folículos antrales.

**Fuente:** Autores



**Anexo C:** *Preparación del material para la OPU.*

**Fuente:** *Autores*



**Anexo D:** *Preparación del medio de recolección.*

**Fuente:** *Autores*



**Anexo E:** *Insensibilización del tren posterior mediante anestesia epidural.*

**Fuente:** *Autores*



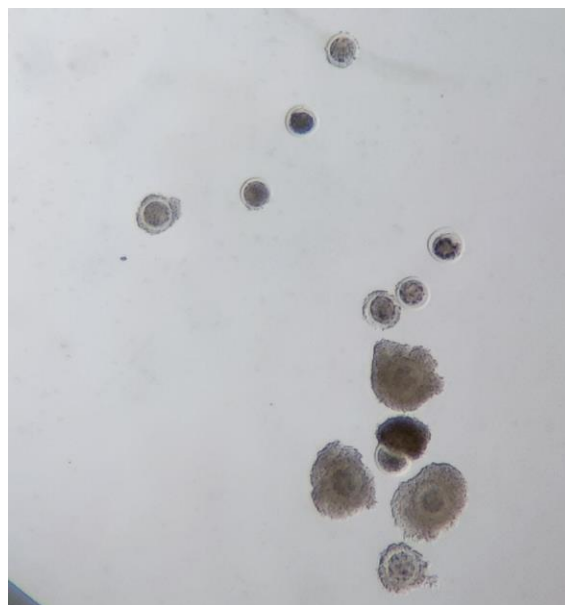
**Anexo F:** *Aspiración folicular.*

**Fuente:** *Autores*



**Anexo G:** *Proceso de recolección de estructuras.*

**Fuente:** *Autores*



**Anexo H:** *Recuento y clasificación de COC's recolectados.*

**Fuente:** *Autores*