



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**REEMPLAZO PARCIAL DE LA HORMONA FOLÍCULO
ESTIMULANTE PORCINA (FSH-p) POR GONADOTROFINA
CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA SUPEROVULACIÓN DE
VACAS EN PRODUCCIÓN**

TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO

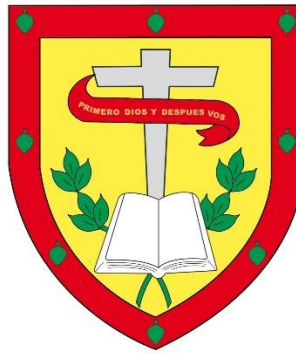
AUTOR: LUIS MIGUEL SANCHEZ SANCHEZ.

DIRECTOR: MVZ. DANIEL ARGUDO GARZÓN, MGS.

CUENCA-ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**REEMPLAZO PARCIAL DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE
PORCINA (FSH-p) POR GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA
(eCG) EN LA SUPEROVULACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN**

TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO

AUTOR: LUIS MIGUEL SANCHEZ SANCHEZ

DIRECTOR: MVZ. DANIEL ARGUDO GARZÓN, MGS.

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARACIÓN

Yo, Luis Miguel Sánchez Sánchez, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento



Luis Miguel Sánchez Sánchez

CI: 0105566384

CERTIFICACIÓN

De mis consideraciones:

El presente trabajo de titulación denominada “Reemplazo parcial de la Hormona Folículo Estimulante porcina (FSH-p) por Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) en la superovulación de vacas en producción” fue desarrollado por Luis Miguel Sánchez Sánchez, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico fue desarrollado siguiendo los parámetros de método científico, y se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que esta expedito para su presentación.



MV. Daniel Argudo Garzón. Mgs.
DIRECTOR

DEDICATORIA

La presente investigación lo dedico de manera muy especial a mis padres Roció Sánchez y Raúl Sánchez, quienes en primera instancia me dieron la vida y en el transcurso del tiempo me supieron brindar su apoyo incondicional en los estudios, la vida cotidiana y con sus palabras de aliento, en cada obstáculo que se presentaba en mi camino, de manera especial a mi querida esposa Rosa Cajamarca que nunca me dejó de apoyarme siendo una de los pilares más indispensables para continuar con mis metas propuestas. De igual manera a mis hijos Cisne Sánchez y Anderson Sánchez, para ellos como muestra de ejemplo para que nunca dejen de creer en la perseverancia de las cosas que se presentan en la vida, se la dedico esta investigación con amor infinito y como muestra de agradecimiento.

Luis Sánchez

AGRADECIMIENTO

Ante todo, agradezco a Dios por brindarme salud y vida, por darme la oportunidad de alcanzar una nueva meta; con sentimiento de gratitud expreso mi agradecimiento a la Universidad Católica de Cuenca y a todo su equipo de trabajo, en particular a los docentes por su paciencia de impartir sus conocimientos que me brindaron durante mi preparación profesional. De manera especial quiero agradecer al Dr. Daniel Argudo, Dr. Carlos Soria, Dr. José Moreno, que, como director y colaboradores de la presente investigación, con sus conocimientos capacidades y experiencias, me supieron ayudar en la presente investigación.

Luis Sánchez

INDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN	3
CERTIFICACIÓN	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO	6
INDICE DE CONTENIDOS	7
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE ILUSTRACIONES	10
RESUMEN	7
ABSTRACT	11
CAPITULO 1	12
1.1 INTRODUCCIÓN	12
1.2 Planteamiento del problema.....	14
1.3 Hipótesis.....	16
1.4 Antecedentes.....	17
1.5 Objetivos.....	19
1.6 Justificación.....	21
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO	21
2.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la vaca.....	21
2.1.1. Metaestro.....	23
2.1.2. Diestro.....	23
2.1.3. Proestro.....	23
2.1.4. Estro.....	24
2.1.5. Control neuroendocrino del ciclo estral.....	24
2.1.6. Dinámica folicular.....	25

2.1.7. Otras hormonas importantes para el control reproductivo de la vaca.....	26
2.2 BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS.....	26
2.2.1. Inseminacion artificial.....	27
2.2.2. Sincronización del celo y la ovulación.....	28
2.2.3. Multiovulación y transferencia de embriones.....	29
2.2.3.1. Protocolos de multiovulación.....	29
2.2.3.2. Protocolos de superovulación con FSH combinados con eCG.....	31
2.2.4. Evaluación de embriones.....	32
2.2.4.1. Excelente.....	33
2.2.4.2. Bueno.....	32
2.2.4.2. Regular.....	32
2.2.4.2. Malo.....	32
CAPITULO 3.....	32
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	33
3.1. Area de la investigación	33
3.2. Materiales utilizados.....	33
3.3. Animales y manejo.....	33
3.4. Seleccione vacas donantes.....	34
3.5. Grupos experimentales	34
3.6. Tratamientos superovulatorios	34
3.7. Colecta de embiones.....	34
3.8. Variables de estudio y análisis estadístico	36
CAPITULO 4.....	37
RESULTADOS	36
CAPÍTULO 5.....	40
DISCUSIÓN.....	39
CAPITULO 6.....	43
CONCLUSIONES	42
CAPITULO 7.....	43
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor de la vaca	21
Figura 2. Ovario cortado a la mitad con la médula y la corteza	22
Figura 3. Ovario cortado a la mitad con un cuerpo lúteo y folículo.....	23
Figura 4. Tratamientos superovulatorios	31
Figura 5. Comparación de la proporción de embriones	39
Figura 6. Comparación de la proporción de embriones de calidad 1 y 2	39
Figura 7. Evaluación reproductiva y selección de donadoras	30
Figura 8. Lavado de embriones	31
Figura 9. Lavado de embriones	31
Figura 10. Búsqueda, identificación y selección de embriones	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales usados en la investigación.....	33
Tabla 2. Protocolos de sincronización/superovulación (P36LH60).....	35
Tabla 3. Respuesta superovulatoria de los tratamientos.....	35
Tabla 4. Número de folículos anovulatorios promedio por vaca	37
Tabla 5. Estructuras recuperadas, embriones transferibles.....	38

RESUMEN

La producción de leche es de suma importancia para la economía nacional. Mediante la superovulación y transferencia de embriones es posible obtener animales genéticamente mejorados, y por lo tanto mejorar la productividad de las finas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de sustituir las cuatro últimas dosis de FSH en el protocolo de superovulación por dos dosis de eCG en vacas lecheras. Para ellos 8 vacas Holstein fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la onda folicular y de la ovulación, y de estimulación ovárica. Las vacas se asignaron aleatoriamente a uno de los dos tratamientos de superovulación siguientes: FSH, 8 dosis decreciente de FSH por 4 días; FSH+eCG, las cuatro últimas dosis de FSH en el protocolo convencional se sustituyeron por una dosis de eCG de 600 UI. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza del programa estadístico SPSS. La respuesta ovulatoria fue similar entre tratamientos ($10,25 \pm 1,31$ y $10,00 \pm 1,29$ para FSH y FSH+eCG respectivamente). Las vacas tratadas con FSH ($6,00 \pm 0,58$) tuvieron mayor número ($P < 0,05$) de folículos anovulatorios que las FSH+eCG ($3,25 \pm 0,63$). El número de estructuras recuperadas, embriones transferibles, embriones degenerados y ovocitos sin fecundar fueron similares entre tratamientos. En las vacas tratadas con FSH+eCG se recuperaron más mórulas (45.6 vs 20.1% respectivamente) y blastocistos expandidos (6.8 vs 0.0% respectivamente) y menos blastocistos regulares (40.7 vs 6.6% respectivamente) que el tratamiento con FSH, aunque las diferencias no fueron significativas. Las vacas tratadas con FSH produjeron menos blastocistos de calidad 1 y más de calidad 2 que las tratadas con FSH+eCG. En conclusión, la sustitución de las cuatro últimas dosis de FSH en el protocolo de superovulación convencional por una dosis de eCG no mejoro la respuesta superovulatoria ni la producción de embriones transferibles.

Palabras clave: multiovulación, transferencia de embriones, FSH, eCG, vacas lecheras.

ABSTRACT

Milk production is of great importance to the national economy. Through superovulation and embryo transfer it is possible to obtain genetically improved animals, and therefore improve the productivity of dairy farms. The objective of the present study was to evaluate the effect of substituting the last four doses of FSH in the superovulation protocol for two doses of eCG in dairy cows. Eight Holstein cows were subjected to a protocol of follicular wave and ovulation synchronization, and ovarian stimulation. Cows were randomly assigned to one of the following two superovulation treatments: FSH, 8 decreasing doses of FSH for 4 days; FSH + eCG, the last four doses of FSH in the conventional protocol were replaced by a 600 IU dose of eCG. The data were analyzed by analysis of variance of the SPSS statistical program. The ovulatory response was similar between treatments (10.25 ± 1.31 and 10.00 ± 1.29 for FSH and FSH + eCG respectively). The cows treated with FSH (6.00 ± 0.58) had a higher number ($P > 0.05$) of anovulatory follicles than the FSH + eCG (3.25 ± 0.63). The number of recovered structures, transferable embryos, degenerated embryos and unfertilized oocytes were similar between treatments. In cows treated with FSH + eCG, more morulae (45.6 vs 20.1% respectively) and expanded blastocysts (6.8 vs 0.0% respectively) and fewer regular blastocysts (40.7 vs 6.6% respectively) were recovered than FSH treatment, although differences were not significant. Cows treated with FSH produced fewer quality 1 and more quality 2 blastocysts than FSH + eCG treated cows. In conclusion, substituting the last four doses of FSH in the conventional superovulation protocol for one dose of eCG did not improve the superovulatory response or the production of transferable embryos.

Keywords: multiovulation, embryo transfer, FSH, eCG, dairy cows.

CAPITULO 1

1.1. Introducción

El mejoramiento genético del ganado bovino es uno de los factores que permiten mejorar la producción y calidad de carne o leche (Zumba, 2012). Una forma de valorar la productividad bovina es a través de la meta mundialmente aceptada de una cría y una lactancia por vaca año. Para cumplirse esta meta es necesario que la vaca inicie la gestación alrededor de los 90 días luego de parto (Perea et al., 2002). Sin embargo, en el país la productividad bovina está limitada ya que esta meta es difícil de lograr debido a los diversos factores que afectan el desempeño reproductivo de los rebaños, y que es muy complejo controlar (González et al., 1988). Sin embargo, en la actualidad se cuenta con nuevos enfoques y estrategias para el control reproductivo y el mejoramiento genético que incluye numerosas biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, los protocolos hormonales para la sincronización del celo, la superovulación y transferencia de embriones, fecundación in vitro y la criopreservación de embriones y gametos (Palma, 2001).

Los protocolos hormonales para sincronización del celo y la ovulación, y para la estimulación ovárica o superovulación (SOV) tienen como objetivo principal mejorar la eficiencia reproductiva y la calidad genética de los rebaños bovinos (Córdova, 2011). Otras de las tecnologías de importancia aplicada en las últimas décadas son la transferencia de embriones (TE), la producción de embriones in vitro y el sexado de embriones (Bonilla, Mejía, Gómez, Torres, & Uribe, 2018). Para elevar la calidad genética de los bovinos por muchos años se ha utilizado la inseminación artificial (IA); sin embargo, esta biotecnología ha permitido la mejora genética de los rebaños solo por la vía paterna. No obstante, la SOV y la TE permite incrementar varias veces el número de crías que una hembra genéticamente superior puede producir en su vida útil, lo cual acelera el progreso genético y reduce el intervalo generacional (FAO, 2010).

La superovulación es la biotecnología reproductiva que permite inducir numerosas ovulaciones al mismo tiempo mediante la utilización de hormonas. Una vez que las vacas son detectadas en celo o no, en caso que se utilicen protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), se aplica la IA para obtener numerosos embriones que, de tener la calidad adecuada, pueden ser transferidos a hembras receptoras (Maldonado & Bolívar, 2008). Para maximizar la respuesta superovulatoria y garantizar el crecimiento sincronizado de numerosos

folículos, los tratamientos SOV son combinados con protocolos de sincronización de la ovulación mediante una combinación de hormonas (Bo & Mapletoft, 2014).

La superovulación tradicional consiste inducir múltiples ovulaciones, mediante la administración de gonadotrofinas como la gonadotrofina coriónica equina (eCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Cabodevila & Torquati, 2001), que se obtiene como extracto de pituitaria de porcinos, ovinos y equinos. Aunque por muchos años se utilizó la eCG para la estimulación ovárica, en la actualidad la hormona más usada en programas de transferencia de embriones es la FSH. Debido a la vida corta de la FSH (5 a 12 horas), esta hormona se aplica en dosis decrecientes dos veces al día, durante cuatro días, comenzando entre los días 8 y 12 del ciclo astral (Mikkola & Taponen, 2017). Por tanto, los protocolos más comunes requieren seis a ocho aplicaciones de FSH con intervalos de 12 horas. Con este estímulo gonadotrópico se desarrollan varios folículos que pueden alcanzar la ovulación, lo que permite obtener varios embriones en cada colecta si la respuesta superovulatoria es exitosa (Lamp, 2009).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la superovulación con el reemplazo de las últimas cuatro dosis de FSH (Folltropin) por una sola dosis de eCG (Novormon), para determinar su efecto en la respuesta superovulatoria, y en la cantidad y calidad de embriones recuperados.

1.2. Planteamiento del problema

En las explotaciones bovinas ecuatorianas, el mejoramiento genético juega un papel muy importante, y tiene como propósito incrementar la producción de leche y de carne para abastecer la demanda de estos productos y sus derivados (Hadgu y Fesseha, 2020). Por otra parte, la eficiencia reproductiva de los rebaños bovinos es deficiente por lo cual la productividad de las fincas es baja. Una forma de evaluar el desempeño reproductivo de un rebaño es considerar la meta mundialmente reconocida de una lactancia y una cría al año (Perea et al., 2002). Sin embargo, debido a factores genéticos y ambientales esta meta es difícil de lograr, más aún en condiciones tropicales (González et al., 1988).

Bajo condiciones de manejo reproductivo tradicional, es decir, monta natural, o manejo mejorado, IA, las hembras bovinas pueden tener en el mejor de los casos, una sola cría al año. De esta manera la mejora genética del rebaño se logra únicamente por la vía del toro, el cual a través de la IA puede producir cientos de crías al año. Sin embargo, desde hace varias décadas la superovulación y transferencia de embriones se ha estado aplicando y ha permitido multiplicar varias veces el número de crías que una vaca puede tener a lo largo de su vida productiva (Mapletoft, 2013). Esto permite incrementar la intensidad de selección y reducir el intervalo generacional del rebaño (Hasler, 2014).

La SOV consiste en la estimulación ovárica mediante hormonas gonadotrópicas, que estimulan el crecimiento de múltiples folículos en ambos ovarios que luego ovulan, y de los cuales se puede obtener varios embriones transferibles, si las vacas son inseminadas en el momento adecuado (Mapletoft, 2013). Luego de la IA, entre los días 6 y 8, se lleva a cabo la recuperación no quirúrgica de los embriones, que luego de su evaluación son transferidos los de calidad óptima a hembras receptoras (González, 2001).

Los primeros tratamientos de superovulación consistieron en la aplicación de una sola dosis de eCG entre el final de la fase luteal (diestro) y comienzo de la folicular (proestro), es decir, aproximadamente en el día 16-17 del ciclo estral (Bo & Mapletoft, 2014). Sin embargo, debido a que la eCG tiene una vida media muy larga (alrededor de 40 horas), y permanece en circulación varios días, causa una estimulación ovárica prolongada que deriva en fallas de la ovulación, concentraciones hormonales alteradas y embriones de baja calidad (Bo & Mapletoft, 2014).

Debido a estos inconvenientes, durante muchos años se han utilizado extractos de glándula hipófisis que contenían cantidades variables de FSH y LH (hormona luteinizante), motivo por el cual se comenzaron a purificar extractos con menor

cantidad de LH, que producían una respuesta superovulatoria más uniforme y efectiva (Amsrong et al., 1986). No obstante, debido a que la FSH tiene una vida media de actividad biológica muy corta (menor a 5 horas) (Laster, 1972), es necesario aplicar al menos dos dosis diarias para lograr una respuesta superovulatoria adecuada. En la actualidad se utiliza una dosis total de 400 mg que se aplican en dosis decrecientes diarias durante 4 días consecutivos, y produce una respuesta superovulatoria satisfactoria en vacas y vaquillas lecheras (Mikkola & Taponen, 2017).

Sin embargo, los protocolos de estimulación ovárica con dosis decreciente de FSH por cuatro días, implica que las vacas o vaquillas donantes deben ser movilizadas dos veces al día durante 4 días. Esto puede originar y ser una causa de la repuesta variable de la SOV (Bo & Mapletoft, 2014). Esto ha impulsado la iniciativa de probar alternativas para reducir este problema. En tal sentido, se ha diluido la FSH con sustancias retardantes que prolongan el periodo de liberación de la hormona con lo cual ha sido posible aplicar una sola dosis de FSH con una respuesta comparable al esquema tradicional de cuatro días en dosis decrecientes (Tribulo et al., 2011). Asimismo, la administración de una sola dosis de FSH epidural ha tuvo una respuesta similar al protocolo tradicional antes mencionado (Sakaguchi et al., 2018).

1.3. Hipótesis

Ho: El remplazo de las últimas cuatro dosis de FSH por una sola dosis de eCG produce una respuesta superovulatoria y una cantidad y calidad de embriones transferibles similares al protocolo tradicional de ocho dosis de FSH, en menor tiempo de duración del tratamiento.

1.4. Antecedentes

En los últimos años, se ha utilizado intensamente la transferencia de embriones bovinos, tanto en animales de carne como de leche. La transferencia embrionaria empezó a aplicarse en los años 1970, sin embargo, la historia se remonta desde mucho tiempo atrás (Brito, 1999). La primera transferencia de embriones la realizó Walter Heape en conejas en el año de 1890 y el primer embrión en bovinos se obtuvo en 1930 (Hasler, 2014). Luego en la década de los años 30 del siglo pasado, se comenzaron a realizar trabajos de transferencia de embriones en animales como ovejas y cabras, mientras que en los años 30 y 40 se investigó sobre la colección y transferencia de embriones en bovinos. Luego de muchos intentos nació en Wisconsin el primer ternero en 1951 producto del trabajo de Willett y colegas (Betteridge, 2000). Este hecho constituyó un precedente para que la aplicación de los programas de multiovlación y transferencia embrionaria (MOET; Smith, 1988) tuviera un gran auge, luego que numerosas compañías comerciales se establecieran en USA, Canadá y Europa, a inicios de 1970. La posibilidad de mejoramiento genético de los rebaños bovinos a nivel mundial, de control de enfermedades y de importar y exportar embriones entre países, convirtió a los programas MOET en una actividad muy exitosa (Mapletoft, 2013). Como consecuencia, en 1974 se funda la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) (Hasler, 2014).

Como se indicó anteriormente, en los primeros años se utilizó la hormona eCG para estimulación ovárica en los programas MOET (Bo & Mapletoft, 2014). Luego se incluyó la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2 α}) en los protocolos de superovulatorio lo cual permitió comenzar el tratamiento en cualquier momento del ciclo estral (Elsden, 1974). No transcurrieron muchos años cuando se disponía en el mercado de extractos purificados de FSH de glándula hipófisis de porcinos, para los cuales era necesario aplicar varias dosis para obtener una respuesta superovulatoria satisfactoria (Mikkola & Taponen, 2017).

La súper ovulación consiste en el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro, por medio de la aplicación de diferentes hormonas con función estimulante de los folículos, aunque un pequeño estímulo de LH también es necesario, muchas veces provisto por la LH producida por el animal tratado (Bo & Mapletoft, 2014). Con el fin de evitar el estrés causado por la movilización de las hembras donantes cuando se aplican protocolos SOV con 2 dosis diarias decreciente de FSH por cuatro días, se han probado modalidades de una sola aplicación, como la de liberación lenta (Tribulo et al., 2011) o la que se administra por vía epidural (Sakaguchi et al., 2018), con resultados similares a los obtenidos con el protocolo tradicional.

En una investigación llevada a cabo por Mattos et al. (2011), se intentó comprobar la efectividad

De un protocolo de SOV reemplazando las dos últimas dosis de la hormona folículo estimulante porcina (FSHp) por la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG). Se utilizaron donantes Red Sindhi, que en total sumaban 19 vacas primíparas y vaquillas nulíparas, con una condición corporal entre 3.0 y 3.5 (escala 1 al 5). Las vacas fueron superovuladas con dos protocolos diferentes, con un intervalo de 42 días entre tratamientos SOV. Estas fueron tratadas con una dosis de 2 mg d benzoato de estradiol intramuscular y un dispositivo liberador de progesterona (DIB), intravaginal el día de inicio del protocolo (día 0). Cuatro días después, los animales con el protocolo tradicional fueron tratados con 100 mg de FSH-p, que se administraron dos veces al día en ocho dosis decrecientes durante 4 días (protocolo 1; FSHp), mientras que en las hembras en las que se utilizó el protocolo a ser validado, las dos últimas dosis de FSH-p (día 7) fueron sustituidas por una dosis de 150 UI de eCG (protocolo 2; FSHp/eCG). Se demostró una respuesta SOV superior en las vacas del tratadas con el protocolo 2 que con el 1, con una mejor respuesta superovulatoria y mayor numero de embriones transferibles (Mattos et al., 2011).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

- Cuantificar la respuesta superovulatoria con el reemplazo parcial de FSHp por eCG frente al protocolo tradicional de superovulación.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la respuesta superovulatoria con el uso de eCG sustituyendo las últimas cuatro dosis de FSH en el protocolo de superovulación, frente al protocolo tradicional de FSH.
- Determinar el número de estructuras totales obtenida (ovocitos/embriones), embriones transferibles, embriones degenerados y ovocitos sin fecundar, cuando se reemplaza las últimas cuatro dosis de FSH por una de eCG.
- Comparar la calidad de los embriones transferibles obtenidos con los dos tratamientos

1.6. Justificación

El mejoramiento genético mediante la inseminación artificial tradicional tiene como desventaja que el incremento de la calidad genética y productiva de los rebaños se logra por la vía del macho, desaprovechándose el germoplasma de las hembras genéticamente superiores, de las cuales solo se puede obtener una cría al año, cuando su eficiencia reproductiva es excelente. No obstante, el advenimiento de la MOET abrió la posibilidad de que estas hembras pudieran aumentar varias veces el número de crías durante su vida productiva (Mapletoft, 2013), e incrementar la intensidad de selección y reducir el intervalo generacional de los rebaños (Hasler, 2014).

Por las razones antes mencionadas, mediante la SOV el mejoramiento genético es más acelerado por lo que se puede cumplir las metas de producción en menos tiempo. Los diferentes protocolos hormonales para lograr ovulación múltiple y la transferencia de embriones (TE), en general, permiten obtener numerosos embriones que en normalmente resultan de la combinación de gametos de animales superiores, y su impacto en los rebaños se traduce en niveles crecientes de producción (Mantilla, 2012)

De manera que una hembra de alto valor genético podrá incluirse en numerosos programas SOV durante el año, pudiéndose multiplicar su capacidad reproductiva varias veces, usándose como receptoras vacas y vaquillas de menor valor económico, que hace más eficiente el sistema de producción (Calva-Rodríguez, 2001).

Por consiguiente, el presente estudio tiene gran importancia por la posibilidad de validar un protocolo SOV que iguale o mejore los resultados que se obtienen con los protocolos de SOV que usan inyecciones repetidas de FSH durante 4 días, lo cual podría afectar la efectividad del tratamiento SOV cuando las vacas o vaquilla donadoras se estresan debido al manejo intensivo al cual son sometidas. Así, un protocolo de estimulación ovárica que implique menor movilización de los animales y menor costo pudiera representar un beneficio para los ganaderos de la región y el país.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la vaca

El tracto reproductivo de la vaca está conformado por los ovarios, oviductos, útero, cérvix (o cuello uterino), vagina y genitales externos (Figura 1). Estos órganos se encuentran localizados, total o parcialmente, dentro de la cavidad pélvica en función de la edad del animal y el número de partos. Además, cumplen funciones que garantizan el propósito de la reproducción, la perpetuación de la especie (Senger, 2012).

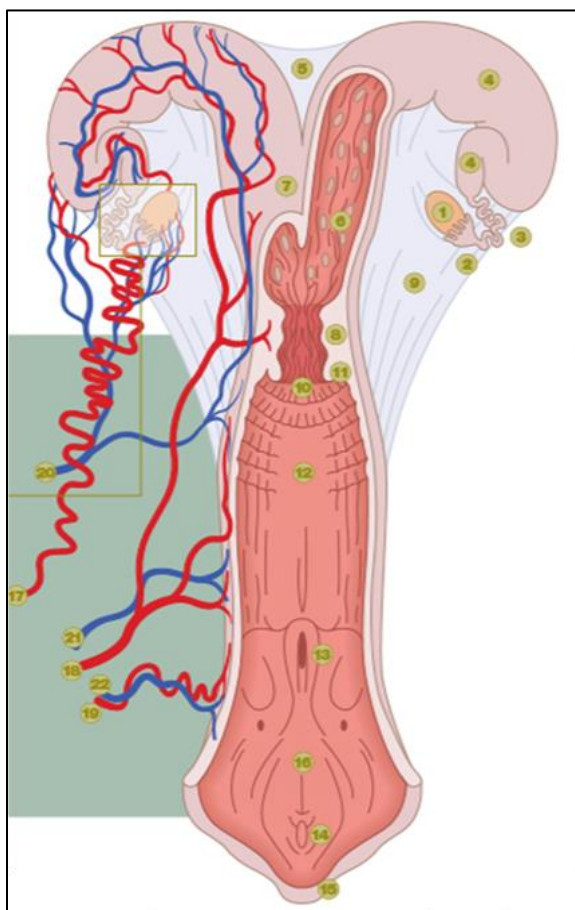


Figura 1. Aparato reproductor de la vaca donde se aprecian el ovario (1), oviducto (3), cuerno uterino (4), ligamento intercornual (5), cuerpo del útero (7), cuello o cérvix (8), vagina (12). Fuente: Fernandez-Sanchez, 2008.

Aunque todos los componentes de aparato reproductor son importantes, algunos tienen funciones más relevantes que otros. Por ejemplo, los ovarios o gónadas femeninas cumplen dos funciones fundamentales: 1) producen hormonas esteroideas y 2) contienen los gametos femeninos. Los gametos femeninos u ovocitos

se encuentran dentro de una estructura ovárica conocida como folículo. Los folículos se encuentran localizados en la corteza ovárica (Figura 2), y algunos de ellos producen cantidades importante de estradiol (E2). El cuerpo lúteo (CL), la otra estructura funcional del ovario (Figura 2), se forma a partir de un folículo ovulado, y luego que se desarrolla por completo, produce grandes cantidades de progesterona (P4) que son necesarias para mantener la gestación. La figura 3 muestra un CL y un folículo de gran tamaño, presuntivamente dominante (Senger, 2012).



Figura 2. Ovario cortado a la mitad que muestra la médula (1), la corteza (2), los folículos antrales (3) y el cuerpo lúteo (4). Fuente: Fernandez-Sanchez, 2008.

El oviducto es un delgado conducto que comunican el cuerno uterino con el ovario, aunque no hace contacto con él. El extremo distal del mismo, que se encuentra cercano al ovario, tiene forma de un embudo y recoge al ovocito luego de la ruptura del estigma del folículo ovulatorio. Además, el oviducto es importante porque en su parte media ocurre la fecundación. El útero es el compartimiento que recibe al embrión, aproximadamente el día 6-7 luego del celo, y es donde se desarrolla la gestación. El endometrio uterino produce una hormona, la prostaglandina 2α ($PGF2\alpha$) que es responsable de desencadenar la luteólisis al final de la fase luteal (Hafez y Hafez, 2013).

En la vaca, el ciclo estral tiene una duración de 21 días y se extiende desde un celo u estro al siguiente. De acuerdo a las condiciones endocrina predominantes, a las estructuras presentes en los ovarios y a las características del endometrio, el ciclo estral (CE) se divide en cuatro fases: metaestro, diestro, proestro y estro (Hafez y Hafez, 2013).

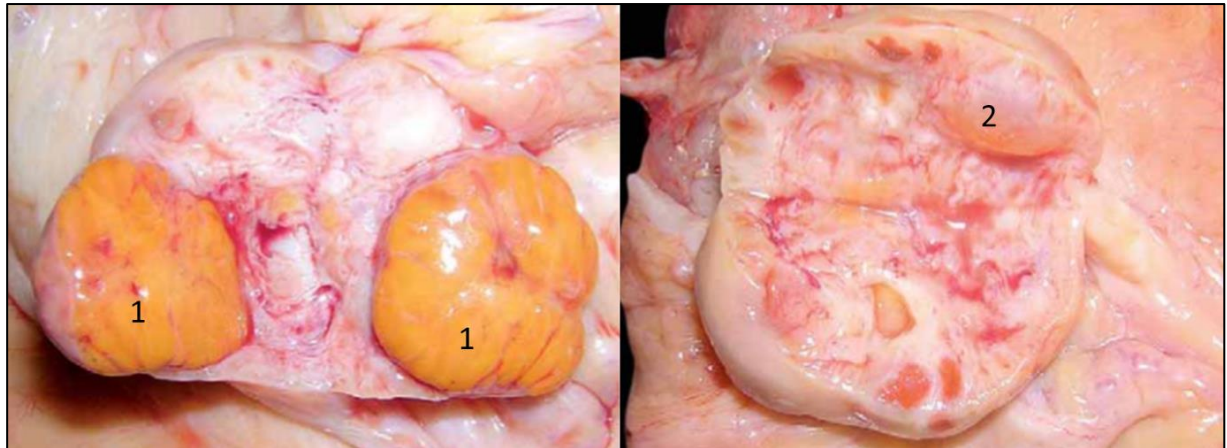


Figura 3. Ovarios cortados a la mitad que muestran un cuerpo lúteo (1) y un folículo dominante (2). Fuente: Fernandez-Sanchez, 2008.

2.1.1. Metaestro

Esta es la primera fase del CE; inicia cuando ha terminado la receptividad sexual y concluye cuando el CL está plenamente funcional. Al comienzo del metaestro ocurre la ovulación del CE anterior, y las concentraciones de E2 y P4 son relativamente bajas. Se extiende entre 3 y 5 días y al inicio del mismo ocurre la ovulación del CE anterior. Durante el metaestro se forma el cuerpo hemorrágico y la luteinización de las células de la granulosa y de la teca del folículo ovulado. Por lo tanto, se desarrolla un CL que comienza a producir P4. En esta fase también se produce el inicio del crecimiento de la primera onda folicular (Hafez y Hafez, 2013).

2.1.2. Diestro

Se caracteriza por ser la fase más larga, que varía entre 10 y 14 días. Su duración depende del tiempo en que permanezca funcional del CL. Entre los días 10 a 12 produce los niveles mayores de P4. Durante este periodo, las elevadas concentraciones de P4 suprimen las contracciones y tonicidad del miometrio, y promueve la secreción de las glándulas endometriales que crean un ambiente uterino adecuado para estimular el crecimiento del embrión y posterior placentación. En caso que se inicie una gestación la vaca entra en un anestro fisiológico que interrumpe la ciclicidad ovárica. Al final del diestro las concentraciones crecientes de $\text{PGF2}\alpha$ secretadas por el endometrio uterino que llegan por vía circulatoria, a través de un

mecanismo de contracorriente, al ovario que tiene el CL desencadenan el proceso de luteólisis o regresión del CL. Por lo tanto, durante esta etapa es posible iniciar programas de sincronización con administración $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena que causa la luteólisis y la aparición del celo pocos días después (Hafez y Hafez, 2013).

2.1.3. Proestro

Es la penúltima etapa del CE, comienza cuando las concentraciones de P4 disminuyen como resultado de la regresión del CL y termina al comienzo del estro. Durante el proestro tiene lugar la transición endocrina de una etapa de predominancia de P4 a otra de predominancia de E2. Esta última es producida por los folículos presentes en los ovarios, una vez que la P4 disminuye abruptamente a pocas horas de iniciarse a luteólisis. Como resultado del desbloqueo del hipotálamo y de la hipófisis debido a la disminución de la P4, se incrementa el patrón de secreción de LH que estimula el crecimiento de los folículos dominantes, que responden a este estímulo incrementando la secreción de E2. A su vez, el E2 estimula mayor secreción de LH y este estímulo recíproco continúa hasta que se produce, ya iniciado el estro, la descarga ovulatoria de LH/FSH que desencadena la ovulación pocas horas después. Al final de esta etapa ocurre el inicio de la receptibilidad sexual (Hafez y Hafez, 2013).

2.1.4. Estro

Durante el estro tiene lugar la receptividad sexual con lo cual la hembra acepta la monta y el apareamiento. El fin de mismo da lugar al próximo CE. Tiene una duración promedio de 15 h con un rango entre 5 a 24 h, y durante el mismo ocurre el pico de LH/FSH entre 2 y 6 horas después de iniciarse. El estradiol es la hormona dominante durante esta etapa, provocando turgencia del útero, edemas vulvar y producción del moco cervical. Además de estos cambios morfológicos y funcionales, ocurren cambios en el comportamiento que se caracterizan por inquietud, mugidos frecuentes, disminución del apetito y aumento en la frecuencia de las micciones. Finalmente, la vaca en celo acepta la monta de un macho o de otra vaca (Hafez y Hafez, 2013).

2.1.5. Control neuroendocrino del ciclo estral

La ciclicidad reproductiva de la vaca está regulada por el eje reproductivo que está conformado por el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios (HHO) y el útero. Estos componentes interactúan a través de mecanismos neuroendocrinos, endocrinos y paracrinos, y pueden ser afectados por variados factores ambientales, fisiológicos y patológicos (Senger, 2013).

El hipotálamo está ubicado en la base del cerebro limitado anteriormente por el quiasma óptico y posteriormente por los cuerpos mamilares. Está constituido por varios grupos de neuronas que de acuerdo a la localización y función que cumplen conforman los núcleos hipotalámicos. Los núcleos del hipotálamo que regulan la

reproducción se denominan centro cíclico y centro tónico. Ambos producen la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El centro tónico regula la secreción basal de GnRH, mientras que el centro cíclico regula la secreción preovulatoria de ella. Esta hormona liberada en los extremos terminales de las neuronas que producen este neuropéptido hipotalámico y a través de sistema porta hipofisiario llega a la glándula hipófisis donde estimula la secreción de las gonadotropinas LH y FSH (Senger, 2013).

La hipófisis se encuentra localizada por debajo del hipotálamo, en la base del cerebro, en una fosa ósea denominada silla turca. En la hipófisis anterior se encuentran conglomerados de células especializadas que producen varias hormonas hipofisiarias, uno de ellos, se denominan células gonadotrópicas y sintetizan y liberan las hormonas LH y FSH, glicoproteínas de peso molecular de 28.500 y 34.000 respectivamente. Su vida media es de 0.5 y 2 horas respectivamente. Estas hormonas son liberadas a la circulación en respuesta al estímulo de la GnRH que, según el patrón de secreción predominante, induce la secreción de LH (centro tónico) o de LH/FSH (centro cíclico). Ambas hormonas gonadotrópicas actúan en los folículos y cooperan para que estos produzcan estradiol. La LH a través de su receptor en las células de la teca interna del folículo estimula la producción de androstenediona, y la FSH a través de su receptor estimula la aromatización de la androstenediona en estradiol. A su vez ambas hormonas estimulan la ovulación luego de la descarga preovulatoria. La LH, además, es responsable de la luteinización del folículo ovulado, y de la formación y mantenimiento de la función del cuerpo lúteo (Senger, 2013).

A través de la retroalimentación endocrina las hormonas gonadales contribuyen a regular la función del eje HHO. Así, por ejemplo, la P4 producida en el diestro por el CL actúa a nivel hipotalámico suprimiendo la actividad del centro tónico y, por lo tanto, reduciendo la amplitud y la frecuencia de los pulsos de LH (mecanismo de retroalimentación negativa o inhibitorio). Asimismo, luego de la luteólisis y de la desaparición del bloque que ejercía la P4 sobre la GnRH, el E2 (producido por el folículo dominante) a través de un mecanismo de retroalimentación positiva (o estimulador), promueve la secreción GnRH y por lo tanto de LH, que luego de un periodo de estimulación recíproca (entre E2 y LH), desencadena la descarga de LH/FSH que estimula la ovulación pocas horas después (Senger, 2013).

Finalmente, el útero contribuye a la regulación del CE a través de la secreción endometrial de $\text{PGF}2\alpha$, que desde el día 15-16 del CE incrementa su concentración circulante hasta que sobrepasa la capacidad de los factores luteotrópicos de proteger el CL, por lo cual se inicia el proceso de luteólisis. Como consecuencia, pocos días después la vaca entra en celo y se inicia un nuevo CE (Senger, 2013).

2.1.6. Dinámica Folicular

En los bovinos el crecimiento folicular es un proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos que conduce a que, en condiciones endocrinas apropiadas, se

desarrolle un folículo ovulatorio y ocurra la ovulación en cada CE (Perea & Cruz, 2001). El desarrollo folicular ocurre en ondas de varios folículos en ambos ovarios, y en cada onda un grupo de folículos crece hasta que uno de ellos se hace dominante, mientras que los restantes, más pequeños, regresionan o se atresian. Para su estudio, este proceso ha sido descrito en tres etapas diferentes: reclutamiento, selección y dominancia folicular. Durante el reclutamiento una cohorte o grupo de folículos comienza a crecer bajo el estímulo de la FSH. En la selección el folículo metabólicamente mejor preparado para crecer en ausencia de FSH, es seleccionado y experimenta una tasa de crecimiento mayor que los demás folículos de su cohorte. En la dominancia, el folículo seleccionado se hace morfológica y funcionalmente dominante, impide la emergencia de una nueva onda folicular y suprime el crecimiento de los demás folículos de su cohorte, los cuales se atresian. Esto ocurre debido a las altas concentraciones de estradiol e inhibina que producen los folículos dominantes. Normalmente, en la vaca ocurren 2 o 3 ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estrual, aunque pueden desarrollarse de 1 a 4 ondas foliculares (Perea & Cruz, 2001).

2.1.7. Otras hormonas importantes para el control reproductivo de la vaca

Además de las hormonas antes mencionadas, propias de la vaca, que son secretadas durante el CE, otras hormonas de otras especies son usadas para el control del CE de la vaca. Entre ellas están las gonadotropinas placentarias, obtenidas de las yeguas preñadas (eCG), y la de la mujer gestante, la gonadotropina coriónica humana (hCG). Estas hormonas actúan sobre las células gonadales de las hembras gestantes estimulando la producción y secreción de hormonas esteroideas (Gutiérrez, 2008). Estas hormonas tienen un peso molecular mayor (eCG: 68.000; y hCG: 36.700) y una vida media mayor (eCG: 26 horas y hCG: 11 horas) que las gonadotropinas endógenas de la vaca. Mientras que la eCG tiene una actividad principalmente FSH, en menor proporción también tiene acción LH. La hCG tiene acción biológica LH, y estructuralmente es muy parecida a esta gonadotropina (Gutiérrez, 2008).

2.2. Biotecnologías reproductivas implicadas en la multiovulación y el trasplante de embriones

Según la FAO (2003), biotecnología es “cualquier aplicación tecnológica que utilice productos biológicos, sistemas organismos vivos o derivados de los mismos, para fabricar o modificar productos o procesos para un uso específico”. En general, las biotecnologías se han convertido en un medio sostenible para mejorar la producción ganadera al influir directamente en la salud, la nutrición, la reproducción, la cría y la genética de los animales (Kahi and Rewe, 2008).

Aunque hay muchas biotecnologías aplicadas a la producción animal, la reproductivas son todas aquellas aplicadas para aumentar la eficiencia reproductiva y calidad genética de los rebaños. Estas biotecnologías se han ido desarrollando a

través del tiempo, y según el momento de su aparición se han denominado biotecnología de primera, segunda, tercera generación, etc. (Palma, 2001a). La inseminación artificial (IA) es la primera biotecnología que comenzó a aplicarse a principios del siglo pasado. Se consideran como biotécnicas de segunda generación al control hormonal de la ovulación y a la multiovulación y trasplante de embriones que aparecieron en la década de 1970. Posteriormente, en la década de 1980, surgen el sexado de embriones y espermatozoides (1983) y cuatro años después la producción in vitro de embriones (1987). En la década de los 90 del siglo pasado se implementó el uso de la clonación con células somáticas, y en la década siguiente (2000) la transgénesis (Palma, 2001a).

El sexado de semen es el proceso de separar los espermatozoides en dos subpoblaciones: las conformadas por espermatozoides que portan el cromosoma X y las que portan el cromosoma Y. Si estas subpoblaciones se utilizan en la IA, los primeros producen crías hembras y los segundos crías machos con aproximadamente 90% de confiabilidad (Holden & Butler, 2018). Esta biotécnica permite incrementar las crías hembra en los sistemas de producción de leche, y las crías macho en los sistemas de producción de carne.

La criopreservación es otra biotecnología aplicada a la reproducción asistida que ha avanzado considerablemente debido a la necesidad de criopreservar gametos, embriones y tejidos reproductivos (de ovarios o testículos). Como resultado, se ha logrado un aumento significativo en la disponibilidad de espermatozoides fértiles, ovocitos viables y embriones transferibles (Huango et al., 2018). La combinación de algunas de estas biotecnologías, como por ejemplo la IA, sincronización de la ovulación, MOET, criopreservación de espermatozoides y embriones, y el sexado de semen ha permitido mejorar sustancialmente la calidad genética del ganado, maximizar la descendencia de vacas de alto mérito genético, y mejorar la eficiencia reproductiva (Holden & Butler, 2018; Hadgu & Fosseha, 2020). A continuación, se describen las biotecnologías más importantes implicadas en la multiovulación y el trasplante de embriones.

2.2.1. Inseminación artificial

Como se indicó previamente, la IA es la biotecnología reproductiva más antigua. En 1987, Walter Harper reportó haber usado la IA in conejas, perras y yeguas. En los primeros años del siglo 20, Ilya Ivanoff logró la primera IA exitosa en bovinos (Lonergan, 2018). A partir de ese momento la IA se fue extendiendo por Europa y otros países del mundo. En las primeras décadas luego de comenzar a usarse, se utilizaba semen fresco, lo cual limitaba su difusión debido al corto tiempo de viabilidad de los espermatozoides. En la segunda mitad de siglo pasado se desarrolló la congelación de espermatozoides y facilitó la difusión de esta biotecnología y de genética de alta calidad por todo el mundo (Lonergan, 2018).

En los bovinos, la inseminación consiste en depositar el semen fresco o descongelado en el cuerpo del útero. También se puede depositar en uno (IA unicornual) o en ambos cuernos (IA bicornual). Con el último método se obtiene tasa de concepción considerablemente mayor que en el cuerpo del útero (Soto et al., 2002).

La IA ha sido fundamental para incrementar la calidad genética de los rebaños y para aumentar la productividad y beneficio económico de las operaciones comerciales bovinas (Ferraz et al., 2012). Asimismo, la IA aplicada a protocolos de sincronización de la ovulación hizo posible inseminar en un momento predeterminado sin necesidad de detectar el celo (IA a tiempo fijo; IATF). La combinación de estas dos biotecnologías reproductivas ha tenido un gran impacto en la mejora de la eficiencia reproductiva de los bovinos (Cardoso Consentini et al., 2021).

2.2.2. Sincronización del celo y la ovulación

Son métodos de manipulación del CE que consisten en la administración exógena de una o más hormonas. El método más simple de sincronización del celo es la inyección de PGF2 en vacas cíclicas. El principio se basa en inducir la luteólisis anticipada con el fin de acortar el CE. Dependiendo del momento del CE en que se aplica la hormona, las vacas mostrarán signos de celo en un periodo entre 12 a 72 horas, o no tendrán celo en ese lapso si la PGF2 se administra los primeros 4 días después del ciclo (Bacaluba, 2006).

Otro método consiste en prolongar el CE mediante la aplicación de P4 o progestágenos que puede administrarse en el alimento, en implantes subcutáneos o dispositivos intravaginales. Este método se basa en la prolongación del diestro mediante la supresión de la secreción de LH en un patrón apropiado para estimular la maduración del folículo dominante y la ovulación. La combinación de la P4 exógena con otras hormonas como la PGF2 (para inducir la luteólisis), el E2, eCG, GnRH o hCG, en diversas combinaciones, momentos de aplicación y dosis, permiten la sincronización de la ovulación, lo cual ha hecho posible la IATF, como se indicó anteriormente (Bacaluba, 2006).

Un método adicional de sincronización del celo y la ovulación es el OVSYNH, que combina la aplicación de dos dosis de GnRH, una el día de inicio del protocolo y la otra el día 9, con PGF2 el día 7.

2.2.3. Multiovlación y transferencia de embriones (MOET)

Como se indicó previamente, los bovinos son animales poliestruales continuos y monoovulares, por lo cual experimentan una ovulación en cada CE, lo que significa que, en el mejor de los casos, las vacas pueden producir una sola cría al año. Esto tiene importantes implicaciones desde el punto de vista del mejoramiento genético, ya que mientras que los toros pueden dejar cientos de crías por año mediante la IA, las vacas de alto comportamiento productivo y desempeño reproductivo tienen limitada

su capacidad de diseminar su superioridad genética en el/los rebaños (Hartmann & Pereira, 2017).

Con el advenimiento de la multiovulación o superovulación y la transferencia de embriones en la década de 1970 fue posible incrementar muchas veces el número de crías que una hembra puede producir durante su vida productiva y, por lo tanto, la influencia de su genética en los rebaños (Hasler, 2014). El uso de estas biotécnicas implica, por un lado, que las vacas donadoras de embriones son sometidas a un protocolo de superovulación mediante gonadotropinas (tal como FSH o eCG) que se combina con otro que sincroniza la ovulación (a base de progestágenos, estradiol, PGF 2α , eCG, GnRH o LH) con el fin de estimular el crecimiento de varios folículos en ambos ovarios y la ovulación múltiple. Mediante la IA a celo detectado o la IATF (generalmente se efectúan dos IA con un intervalo de 12 horas), se pretende obtener numerosos embriones de calidad transferible (Bo & Mapletoft, 2014).

En segundo lugar, el día 7 u 8 de la IA se practica un lavado uterino, mediante la técnica no quirúrgica basada en un circuito cerrado con flujo discontinuo (Palma, 2003b), con el fin de recuperar el mayor número posible de estructuras (blastocistos, mórulas, embriones degenerados, ovocitos no fecundados). Una vez identificados y categorizados, los embriones de mejor calidad son transferidos a hembras receptoras, previamente sincronizadas para que estén en el día 7 u 8 del CE, según sea el caso (Hartmann & Pereira, 2017). Esto garantiza un ambiente uterino apropiado en la vaca receptora para recibir un embrión producido por la donadora y, por lo tanto, gran probabilidad de una gestación exitosa (Hartmann & Pereira, 2017).

2.2.3.1. Protocolos de multiovulación

Cuando comenzó a practicarse la multiovulación y transferencia embrionaria (MOET), termino propuesto por Smith (1988), a principios de la década de 1970, los tratamientos SOV consistían en la administración de eCG en el periodo de transición entre la fase luteal y folicular (Bo & Mapletoft, 2014), es decir, aproximadamente en el día 16 del CE. Luego que se comenzó a utilizar rutinariamente la PGF 2α como agente luteolítico, esta hormona se incorporó a los protocolos de SOV (Elsden, 1974), lo cual hizo posible iniciar el tratamiento de estimulación ovárica independientemente del día del CE en que se encontraba la vaca donadora. En este periodo de la evolución de los programas MOET en que se usó la eCG para la estimulación ovárica, los resultados más satisfactorios se consiguieron cuando esta gonadotropina se aplicaba entre los días 8 y 12 de CE (Phillipo & Rowson, 1975).

Posteriormente, se demostró la efectividad de los extractos de glándula hipófisis, que tenían actividad FSH y en menor proporción LH. Con estos preparados se lograron mejores tasas de ovulación y considerablemente mayor número de embriones transferibles por vaca donadora que con el uso de eCG (Monniaux et al., 1983). Bo & Mapletoft (2014) indican, en su detallada revisión bibliográfica, que las investigaciones comprobaron que la eCG por tener una actividad biológica bastante

más larga (~ 45 horas; Herrera et al., 2016) que la FSH (~ 5 horas; Laster, 1972), causaba una estimulación ovárica prolongada, fallas en la ovulación, concentraciones anormales de hormonas y embriones de deficiente calidad (Bo & Mapletoft, 2014).

Por algunos años se utilizaron extractos hipofisarios con FSH y LH que contenían cantidades variables de estas hormonas, y causaban gran variación en la respuesta SOV (Murphy et al., 1984). Esto condujo a desarrollar métodos de purificación que permitieron obtener extractos hipofisarios con contenido más uniforme de FSH y bajo de LH, y resultados más satisfactorios (Amstrong et al., 1986). Posteriormente, la síntesis de gonadotropinas recombinantes hizo posible disponer de productos con contenido conocido de FSH y con otras posibilidades de administración (Carvalho et al., 2014).

Luego se probaron productos que combinaron extractos purificados de FSH o FSH recombinante, con sustancias que permitían la liberación lenta de la(s) hormona(s) y se obtuvieron resultados satisfactorios (Tribulo et al., 2011; Carvalho et al., 2014; Sanderson & Martínez, 2020). Esto con el fin de reducir el número de veces que las hembras donadoras son movilizadas e inyectadas durante un protocolo SOV convencional, que implica la administración de 8 dosis decrecientes de FSH, debido a la corta vida media de la FSH. La administración subcutánea de una sola dosis de FSH (400 mg) diluida al 2% en un compuesto retardante (hyaluronan) resultó en una respuesta SOV y en un número de embriones transferibles similar al del tratamiento convencional (8 dosis decrecientes de FSH en cuatro días) (Tribulo et al., 2011). Otra estrategia para reducir el número de inyecciones y movilizaciones de animales fue la administración de una sola dosis de FSH por vía epidural, que produjo una respuesta SOV y una cantidad similar de blastocistos que el tratamiento tradicional (Sakaguchi et al., 2018).

Bo & Mapletoft (2014) indican que se puede aplicar exitosamente la IATF en vacas estimuladas para ovulación múltiple, pero que de acuerdo a la raza de la donadora el periodo óptimo entre el retiro del DIV y la administración de GnRH o LH para inducir la ovulación, varía como sigue (Figura 4): 1) donantes *Bos taurus* de carne: retirar los dispositivos de P4 con la penúltima administración de FSH, administrar GnRH o LH 24 horas después, e inseminar a las 12 y 24 horas posteriores a la administración de GnRH; 2) donantes de *Bos indicus*: retirar el DIV de P4 con la última administración de FSH, administrar GnRH o LH 24 horas después, e inseminar a las 12 y 24 de la aplicación de GnRH; y 3) donantes *Bos taurus* lecheras: retirar el DIV de P4 con la última administración de FSH, administrar GnRH o LH 24 horas después, e inseminar a las 12 y 24 horas después de la GnRH (Bo & Mapletoft, 2014).

Finalmente, hay que tener en cuenta que varios factores pueden variar la respuesta SOV. Entre ellos se destacan la temperatura ambiental durante el tratamiento, la nutrición y condición corporal, edad de la hembra, raza de la donadora, y a factores inherentes a el protocolo SOV usado (Hartmann & Pereira, 2017).

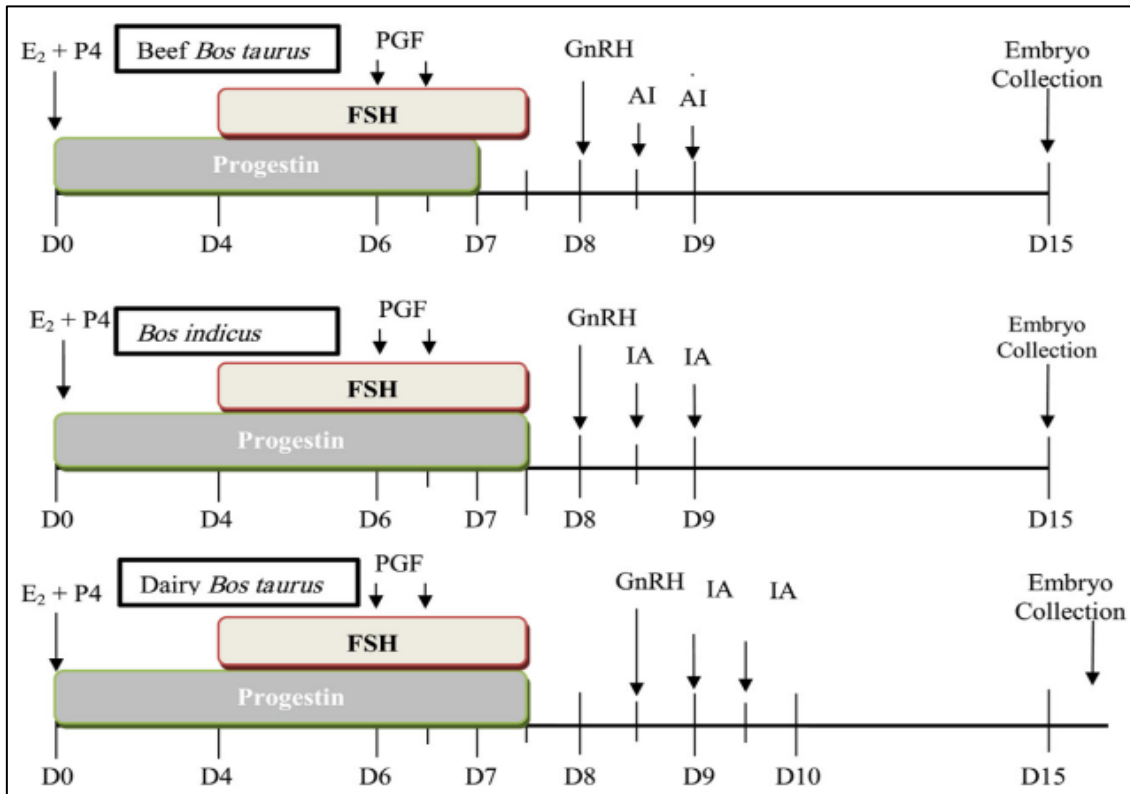


Figura 4. Tratamientos SOV recomendados para vacas *Bos taurus* de carne, *Bos indicus* y vacas *Bos taurus* de leche. Día (D); E₂, 2,5 a 5 mg de estradiol-17-β o 2 a 2,5 mg de benzoato de estradiol; P₄, 50 o 10,0 mg de progesterona; PGF, PGF_{2a}.

2.2.3.2. Protocolos de superovulación con FSH combinados con eCG

Una variante en el tratamiento de sincronización/superovulación ha sido la sustitución de las dos últimas dosis de FSH por dos de eCG. Estos estudios se llevaron a cabo en Brasil en vacas cebuinas para probar la inclusión de dos dosis de eCG en la respuesta SOV (Barros et al., 2007; Mattos et al., 2011; Sartoti et al., 2008; Oliveira et al., 2014). Todos los estudios utilizaron un protocolo de sincronización denominado P-36, en el que el DIV se mantiene durante un período de 36 h después de la aplicación de PGF_{2a}, y se induce la ovulación con LH a las 12 horas después de la remoción del DIV. Con este esquema, la ovulación ocurre entre 24 y 36 horas posteriores al tratamiento con LH y la IATF se aplica 12 y 24 horas después (Nogueira & Barros, 2003). Asimismo, en todos los estudios mencionados las dos últimas dosis de FSH se sustituyeron por dos de 150 o 200 UI de eCG.

Los resultados de estas investigaciones fueron contradictorias, aunque el protocolo descrito fue aplicado en vacas de diferente raza y/o número de partos. Por un lado, su aplicación en vacas Nelore (Barros et al., 2007) y Sindhi (Mattos et al., 2011) resultó en una mejor respuesta SOV (mayor número de folículos > 6 mm: 33.8

± 3.9 y 23.8 ± 2.6 para FSH/eCG y FSH respectivamente, o de CL en los ovarios: 16.8 ± 2.9 y 10.8 ± 2.1 para FSH/eCG y FSH respectivamente) y de embriones viables/transferibles por vaca donadora (5.8 ± 1.3 y 2.6 ± 0.7 para FSH/eCG y FSH respectivamente) (Mattos et al., 2011). En otros dos casos, la incorporación de eCG no representó un beneficio, dado que las respuestas SOV y la cantidad de embriones transferibles recuperados fue muy similar al tratamiento convencional (Sartoti et al., 2008; Oliveira et al., 2014).

2.2.4. Evaluación de embriones

Las principales características morfológicas consideradas en la calidad embrionaria son: número de células, tamaño, forma, número y porcentaje de fragmentación. Estos factores han sido combinados de diferentes maneras en las clasificaciones embrionarias para intentar predecir la viabilidad del embrión. Esta clasificación consta de 4 categorías.

2.2.4.1. Excelente

Masa embrionaria esférica y simétrica, con células uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad, las irregularidades deben ser relativamente menores, al menos el 85 por ciento del material celular debería ser una masa celular intacta y viable la zona pelúcida deberá presentar superficies lisas, sin superficies cóncavas, plana o delgadas que pueden causar adhesión de los embriones al material utilizado durante las manipulaciones.

2.2.4.2. Bueno

Presenta irregularidades moderadas, en cuanto al aspecto forma y tamaño, color y densidad de las células, al menos el 50 por ciento del material celular deberá encontrarse intacto que correspondería a una masa embrionaria viable.

2.2.4.3. Regular

Presenta irregularidades mayores en forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25 por ciento del material celular deberá encontrarse intacto que correspondería con una masa embrionaria viable.

2.2.4.4. Malo

Se encuentra muerto o degenerado, embrión, ovocito y embriones de una célula degenerados no viables.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Área de la investigación

La investigación se llevó a cabo en la hacienda la Dolorosa, localizada en la parroquia Tarqui a 30 minutos de la ciudad de Cuenca. La hacienda cuenta con una extensión de 10 Ha y se encuentra a 1630 msnm, donde predomina una temperatura media de 16°C.

3.2. Materiales utilizados

En esta investigación se usó material biológico, productos químicos, instrumentos, equipos y material descartable. En la Tabla 1 se indican con detalle todos los materiales que serán usados.

Tabla 1. Materiales usados en la investigación

Materiales		
Biológicos:	<i>Instrumentos</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vacas ▪ Semen congelado 	Pinza hemostática larga con punta recta 5.5"	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Papel de ordeño ▪ Guantes ginecológicos ▪ Guantes de látex ▪ Camisa protectora ▪ Corta pajuelas
Químicos:	<i>Desechables:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Jabón ▪ Alcohol 70% ▪ Solución fisiológica ▪ Nitrógeno líquido ▪ Medio de lavado uterino ▪ Anestésico epidural ▪ Medio de congelación de embriones 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Jeringa de insulina ▪ Jeringa 5 ml ▪ Filtro de jeringas ▪ Aguas 18G x 1.5". ▪ Cajas Petri 100 mm ▪ Cajas de búsqueda ▪ Sonda Foley ▪ Catéter de dos vías ▪ Filtro colector 	Oficina:
Laboratorio:	Equipo de inseminación:	Campo:
<i>Equipos:</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Termo nitrógeno líquido ▪ Pajuelas de semen ▪ Tapones de pajuelas ▪ Pistola de inseminación ▪ Pinza 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cuaderno ▪ Bolígrafos ▪ Marcadores ▪ Calculadora ▪ Papel bond ▪ Cámara digital ▪ Computadora ▪ Overol ▪ Botas de caucho ▪ Gafas protectoras ▪ Gorra ▪ Sogas

3.3. Animales y manejo

Se utilizaron vacas de raza Holstein, clínicamente sanas, condición corporal ≥ 2.5 (escala del 1 al 5), las cuales fueron seleccionadas como donadoras de embriones. Las vacas fueron alimentadas a base de pastoreo en potreros de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y raigrás (*Lolium perenne*). Fueron suplementadas con 2 kg/día de balanceado comercial y 4 kg de silo de maíz (*Zea mays*). Tuvieron acceso a un suplemento mineral y agua ad libitum. El programa sanitario se basó en la

prevención de las principales enfermedades virales y bacterianas que afectan el ganado de la región. La desparasitación se realizó con albendazol.

3.4. Selección de vacas donantes

Se seleccionaron 8 vacas Holstein cíclicas, múltiparas (3 a 5 partos), con un periodo abierto de 90 a 150 días, con una producción de leche ≥ 15 kg/día. La ciclicidad se determinó por ecografía mediante la detección de un cuerpo lúteo en los ovarios. Durante la evaluación ecográfica se descartó la presencia de patologías reproductivas que pudieran interferir con el protocolo superovulatorio posterior.

3.5. Grupos experimentales

Las vacas seleccionadas se asignaron aleatoriamente a unos de los siguientes tratamientos:

1. **Tratamiento 1 (FSHp; n=4):** se consideró el tratamiento testigo o control, y consistió en la aplicación de un protocolo SOV convencional de 300 mg de FSHp en 8 dosis decrecientes.
2. **Tratamiento 2 (FSHp+eCG; n=4):** consistió en la aplicación de 200 mg de FSHp en 4 dosis decrecientes y la sustitución de las 4 últimas dosis por una única dosis de 800 UI de eCG.

3.6. Tratamiento superovulatorio

Las vacas se sometieron a un tratamiento de sincronización de la ovulación combinado con el de estimulación ovárica. Para este último se utilizó FSHp y eCG tal como se indicó anteriormente. Para tal fin las vacas fueron sujetadas y se les administró las diferentes hormonas en una secuencia indicada en la Tabla 2.

3.7. Colecta de embriones

Los embriones se colectaron el día 7 luego de la IA. Para ellos las vacas se inmovilizaron y fueron tratadas con una dosis de anestésico epidural (Lidocaina 2%). Inmediatamente se removieron las heces del recto y se lavó la región vulvar y perianal. Se realizó una revisión ginecológica mediante ultrasonido para cuantificar el número de cuerpos lúteos.

Luego se introdujo una sonda tipo Foley a través del cérvix con un balón de 30 cc, que se fijó a 3-5 cm por delante de la bifurcación de los cuernos uterinos. El extremo posterior de la sonda Foley estaba conectada a un catéter flexible de dos vías por donde se infundió la solución para el lavado uterino, por una vía, y se extrajo el

contenido líquido del interior del útero, por la otra (vía de retorno). La vía de retorno estaba conectada a un filtro donde se retuvieron los embriones. Cada filtro se lavó con un medio de mantenimiento de embriones y el contenido se depositó en una placa Petri de 100 mm. La placa Petri se colocó en un estereoscopio provisto con platina térmica y se realizó la búsqueda, identificación y selección de embriones. Para ellos se usó el criterio indicado por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS). El método que se aplicó fue el no quirúrgico basado en un circuito cerrado con flujo discontinuo.

Tabla 2. Protocolos de sincronización/superoovulación (P36LH60) usado en la investigación

Día	Hora	Procedimiento	
0	AM	Inserción del dispositivo intravaginal (DIV) (DIB; Syntex; Argentina; 1 gr de P4) + 2 mg de benzoato de estradiol (Grafoléon NF; Lab. Life, Quito, Ecuador)	
4	AM	60 mg de FSH (Folltropin-V, Lab. Vetoquinol, Francia)	
	PM	60 mg de FSH	
5	AM	40 mg de FSH	
	PM	40 mg de FSH	
		Tratamiento FSH	Tratamiento FSH + eCG
6	AM	500 mcg de Cloprostenol (Estrumate; MSD Salud Animal; 250 mcg/mL)	600 UI de eCG (Novormón ; Zoetis; Argentina; 200 UI/ml) + 500 mcg de Cloprostenol
	PM	30 mg de FSH + 500 mcg de Cloprostenol	500 mcg de Cloprostenol
7	AM	20 mg de FSH	
	PM	20 mg de FSH + retiro del DIV	Retiro del DIV
8	PM	0.25 mg de GnRH (Fertagyl; MSD Salud Animal; Ecuador; 0.1 mg/mL de Gonadorelina).	
9	AM	IATF (12 horas de la GnRH)	
	PM	IATF (24 horas de la GnRH)	
16	AM	Lavado uterino para recuperación de embriones. Evaluación y selección de blastocistos para transferencia y/o congelación	

AM: 6:00 horas; PM: 18:00 horas

3.8. Variables de estudio y análisis estadístico

La variable independiente fue el tratamiento. Como variables dependientes se incluyeron: respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos), la proporción y número de folículos anovulatorios, estructuras recuperadas, embriones transferibles, embriones degenerados, ovocitos sin fecundar, mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos regulares y blastocistos expandidos. Además, se incluirá la proporción de embriones de calidad 1 y 2.

Los datos serán analizados mediante el análisis de varianza (ADEVA) con un nivel de significancia de 5% ($P < 0.005$). Para presentar los resultados se utilizaron la Media y el Error Estándar. Todas las pruebas estadísticas fueron desarrolladas en el paquete estadístico SPSS versión 23.

CAPITULO 4

RESULTADOS

Como se observa en la Tabla 3 la respuesta ovulatoria fue similar entre tratamientos. El promedio total de CL en ambos tratamientos fue $10,13 \pm 0,85$, en el ovario derecho fue $5,50 \pm 0,63$ y en el izquierdo fue $4,63 \pm 0,63$ ($P > 0,05$). De acuerdo al tratamiento, el promedio de CL en el grupo FSH+eCG fue de $10,25 \pm 1,31$ y en el FSH fue de $10,00 \pm 1,29$ ($P > 0,05$). De acuerdo al ovario (derecho o izquierdo) tampoco hubo diferencias estadísticas (Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta superovulatoria de los tratamientos evaluada por el número de cuerpos lúteos por vaca

Tratamiento	N	Cuerpos Lúteos Totales	Cuerpos Lúteos Ovario Derecho	Cuerpos Lúteos Ovario Izquierdo
FSH	4	$10,25 \pm 1,31^a$	$5,57 \pm 0,48^a$	$4,50 \pm 1,19^a$
FSH + eCG	4	$10,00 \pm 1,29^a$	$5,25 \pm 1,25^a$	$4,75 \pm 0,63^a$
Promedio	8	$10,13 \pm 0,85$	$5,50 \pm 0,63$	$4,63 \pm 0,63$

N: número de vacas superovuladas. Los datos mostrados son la media \pm error estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), según ADEVA.

En cuanto al número de folículos anovulatorios (Tabla 4) se encontró mayor cantidad en el tratamiento superovulación convencional (FSH), con una media de $6,00 \pm 0,58$, que en el tratamiento de FSH+eCG en el que se obtuvo una media de $3,25 \pm 0,63$ por vaca. Es decir, en el tratamiento en el que se reemplazó parcialmente la FSH por eCG se obtuvo un número significativamente menor ($p < 0,05$) de folículos sin ovular. Esto se debió específicamente a que en el ovario izquierdo de los animales tratados se evidenció más folículos anovulatorios en el tratamiento de FSH que en el de FSH + eCG, y ésta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 4. Número de folículos anovulatorios promedio por vaca

Tratamiento	N	Folículos Anovulatorios Totales	Folículos Anovulatorios Ovario Derecho	Folículos Anovulatorios Ovario Izquierdo
FSH	4	$6,00 \pm 0,58^a$	$3,00 \pm 0,71^a$	$3,00 \pm 0,41^a$
FSH + eCG	4	$3,25 \pm 0,63^b$	$1,75 \pm 0,48^a$	$1,50 \pm 0,29^b$
Promedio	8	$4,63 \pm 0,65$	$2,38 \pm 0,46$	$2,25 \pm 0,37$

N: número de vacas superovuladas. Los datos mostrados son la media \pm error estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), según ADEVA.

Con respecto a las estructuras recuperadas (Tabla 5), se observó una media de $6,50 \pm 2,90$ en las vacas tratadas con FSH+eCG y de $5,25 \pm 2,32$ en las tratadas con FSH ($P=0,748$). Asimismo, la tasa de recuperación fue estadísticamente similar entre tratamientos ($P=0,942$). Según se observa en la Tabla 5, el número promedio y el porcentaje de embriones transferibles fue similar entre los grupos experimentales ($P > 0,05$). El número y porcentaje de embriones degenerados y de ovocitos no fecundados tampoco varío entre tratamientos.

Tabla 5 Estructuras recuperadas, embriones transferibles, embriones degenerados y ovocitos sin fecundar promedio por vaca

	FSH	FSH + eCG	Valor p
N	4	4	
Estructuras Recuperadas	$6,50 \pm 2,90$	$5,25 \pm 2,32$	0,748
% de Recuperación	$59,09 \pm 21,29$	$56,62 \pm 25,06$	0,942
Embriones Transferibles	$6,00 \pm 2,66$	$5,00 \pm 2,12$	0,778
% de Embriones Transferibles	$95,09 \pm 3,04$	$97,73 \pm 2,27$	0,513
Embriones Degenerados	$0,25 \pm 0,25$	$0,25 \pm 0,25$	1,000
% de Embriones Degenerados	$1,79 \pm 1,79$	$2,27 \pm 2,27$	0,872
Ovocitos sin fecundar	$0,25 \pm 0,25$	$0,00 \pm 0,00$	0,356
% de Ovocitos sin Fecundar	$3,13 \pm 3,13$	$0,00 \pm 0,00$	0,356

N: número de vacas superovuladas. estructuras recuperadas: embriones y ovocitos sin fecundar por vaca. % de Recuperación: estructuras recuperadas/cuerpos lúteos \times 100. Los datos mostrados son promedios \pm error estándar.

La Figura 5 muestra el porcentaje de embriones según el estado de desarrollo de los embriones recuperados con los tratamientos superovulatorios. Como se observa, se recuperó un número considerablemente mayor de mórulas (25,5 puntos porcentuales más) en el grupo FSH+eCG (45,62%) que en el grupo FSH (20,1%). La proporción de blastocistos tempranos fue similar entre tratamientos, mientras que el grupo de vacas tratadas con FSH (69,64%) produjeron casi 30 puntos porcentuales más blastocistos regulares que las tratadas con FSH+eCG (40,75%). Por el contrario, se obtuvieron más blastocistos expandidos con FSH+eCG (6,8%) que con FSH (0%).

La Figura 6 muestra el porcentaje de los embriones recuperados de calidad 1 y 2 de acuerdo al tratamiento superovulatorio. Se encontró el tratamiento FSH+eCG produjo alrededor de 9 puntos porcentuales más embriones de calidad 1 que el tratamiento FSH ($P > 0,05$). En relación a los embriones de calidad 2, las vacas tratadas con FSH produjeron 9% y las tratadas con FSH+eCG 0% ($P > 0,05$).

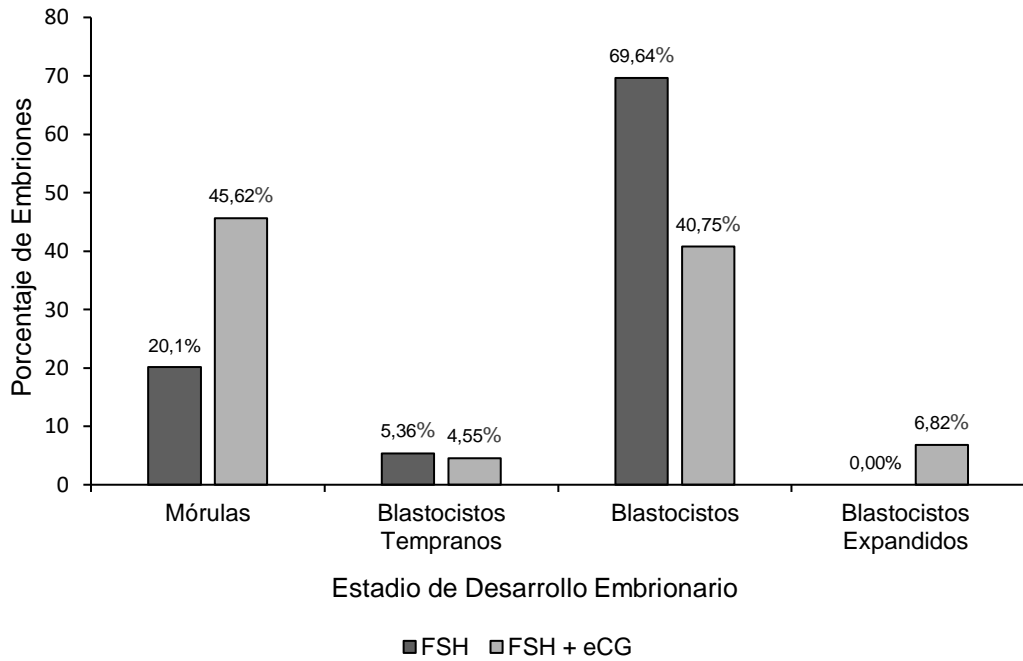


Figura 5. Comparación de la proporción de embriones recuperados en diferentes estadios de desarrollo de acuerdo al tratamiento superovulatorio

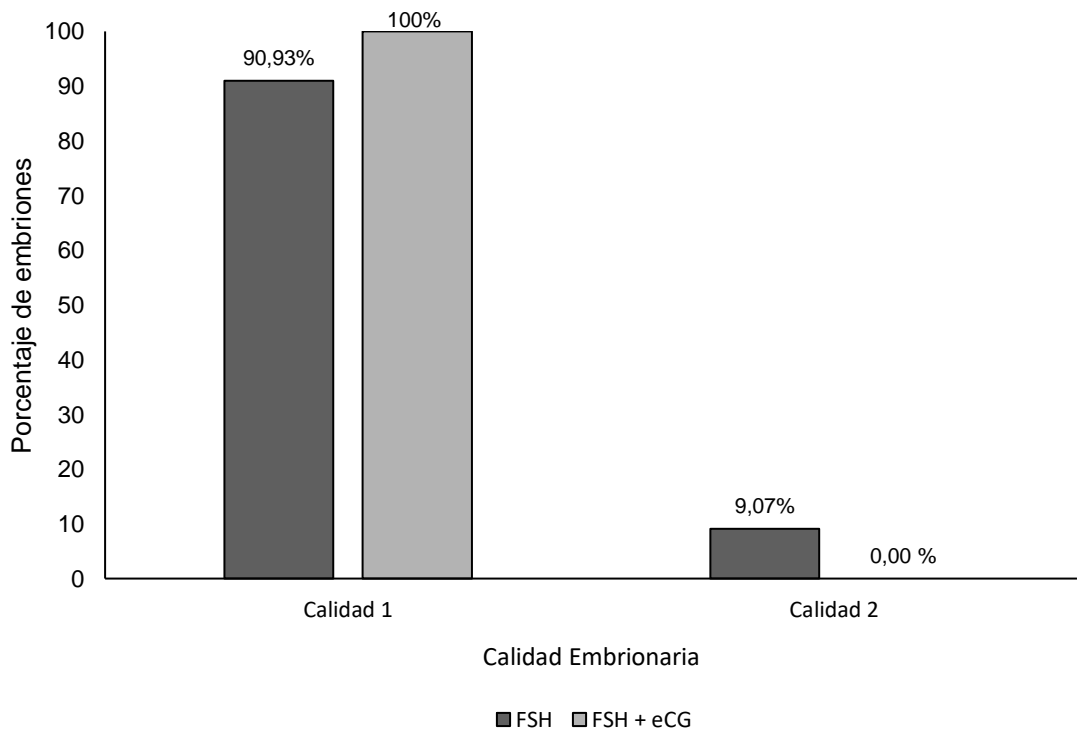


Figura 6. Comparación de la proporción de embriones recuperados de calidad 1 y 2 de acuerdo al tratamiento superovulatorio

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Esta investigación fue realizada con el propósito de validar un protocolo de superovulación que sustituyera 100 mg de FSH (aplicados en las últimas cuatro dosis del protocolo SOV convencional) por una de eCG (600 UI) y así disminuir el número de veces que las donantes de embriones deben ser movilizadas para completar un tratamiento superovulatorio convencional. La tasa ovulatoria y la producción y calidad de los embriones producidos constituyó la forma de evaluar la respuesta de cada tratamiento. Por lo tanto, este estudio tuvo implicaciones de manejo, económicas y biológicas.

En el primer caso, la movilización repetida de animales puede causar estrés y como consecuencia, podría reducir la respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria. Está bien documentado que las situaciones de estrés, entre ellas las que implican la movilización y el manejo de animales, pueden afectar diferentes aspectos de la reproducción (Fernández-Novo et al., 2020). Por ejemplo, vaquillas y vacas calmadas (no estresadas) al momento de la IA lograron tasas de concepción mayores que las alteradas (estresadas) (Kasimanickam et al. 2014; Cooke et al. 2017). Marcedo et al. (2011), observaron una reducción significativa en la proporción de embriones transferibles en vacas donadoras que estaban estresadas. Asimismo, tasas de concepción más bajas se observaron luego de la transferencia en vacas receptoras estresadas en comparación con las no mostraron signos de estrés (Kasimanickam et al. 2018; Kasimanickam et al. 2019). Reducir el número de dosis de FSH, y por lo tanto la movilización e inyección de fármacos en los animales, podría ser una alternativa para mejorar la respuesta superovulatoria e incrementar el número de embriones transferibles.

En el segundo caso, la reducción de las cuatro últimas dosis de FSH, equivalente a 100 mg de Follitropin, y su sustitución por una dosis de 600 UI de eCG (Novormon) redujo el costo del tratamiento en 54 US\$ (datos no mostrados). Aunque la producción promedio de embriones transferibles fue estadísticamente similar entre tratamientos (24 y 20 embriones totales para FSH y FSH+eCG respectivamente), el valor económico de cada embrión (estimado únicamente en base a las diferencias en el valor de la FSH y eCG) fue ligeramente menor en las vacas tratadas con FSH+eCG (6,7 US\$/embrión) que en las tratadas con 8 dosis decrecientes de FSH (7.8 US\$/embrión). Esto significa que, en sucesivos programas de SOV y en un número mayor de vacas donadoras, se podría obtener un ahorro considerable y un costo menor por embrión, lo cual justificaría usar el protocolo SOV de FSH + eCG.

Desde el punto de vista biológico, la respuesta de los tratamientos fue similar, con ligeras variantes en cuanto al número de embriones transferibles, que fue un

embrión superior en las vacas tratadas con FSH que con FSH-eCG, a la proporción de blastocistos regulares, que también fue superior en FSH que en FSH+eCG, y de blastocistos expandidos y de grado 1 que fue mayor en FSH+eCG que en FSH. En un estudio en vacas Nelore (Barros et al., 2007), en el que se aplicó un protocolo convencional (P-36/LH48) similar al de este estudio, con algunas variantes, las dos últimas dosis de FSH (Folltropin) fueron sustituidas por dos dosis de 200 UI de eCG (Novormon) (P-36/LH48/eCG) y se practicó IATF a las 12 y 24 horas después de una dosis de LH (Lutropin) el día 9 de iniciado el protocolo. Se determinó que el número de folículos con un diámetro > 6 mm en el momento de la administración de LH ($15,25 \pm 2,06$ y $21,05 \pm 2,76$; $P < 0,01$), la tasa de ovulación observada hasta 48 horas después de la administración de LH ($77,7 \pm 5,6$ y $83,9 \pm 2,6$; $P > 0,05$), el número total de ovocitos y embriones recuperados ($6,65 \pm 1,18$ y $10,0 \pm 1,48$; $P < 0,03$), el número de embriones recuperados ($6,05 \pm 1,24$ y $8,35 \pm 1,30$; $P > 0,05$) y el número de embriones viables ($5,10 \pm 1,10$ y $7,30 \pm 1,20$; $P > 0,05$) fue mayor en P-36/LH48/eCG que en P-36/LH48.

Otra investigación que se llevó a cabo en vacas nulíparas y primíparas de razas Sindhi, se sustituyeron las dos últimas dosis de FSH por dos de eCG (150 UI cada una) como se indicó en el estudio de Barros et al. (2007). En este caso la administración de FSH inicio en el día 4 (inserción del DIV día 0) y se prolongó hasta el día 7 en el protocolo convencional, mientras que las dos dosis de eCG se inyectaron el día 7, y en ambos tratamientos la ovulación se indujo con GnRH (0.2 mg) (Mattos et al., 2011). El grupo de vacas tratadas con FSH/eCG tuvo una mayor respuesta SOV ($33,8 \pm 3,9$ vs $23,8 \pm 2,6$ folículos; $P = 0,03$) y mayor número de CL ($16,8 \pm 2,9$ vs $10,8 \pm 2,1$ CL; $P = 0,10$) que las tratadas con FSH. Aunque el número total de ovocitos no fecundados y embriones no difirió entre grupos ($8,2 \pm 1,8$ vs $5,9 \pm 1,4$ para los grupos FSH/eCG y FSH, respectivamente; $P = 0,25$), el número ($5,8 \pm 1,3$ vs $2,6 \pm 0,7$; $P = 0,02$) y el porcentaje ($75,6 \pm 5,7$ vs $53,2 \pm 9,7\%$; $P = 0,05$) de embriones transferibles fue mayor en las vacas superestimuladas con FSH/eCG (Mattos et al., 2011).

En vaquillas Nelore, se probó un protocolo convencional de SOV (grupo control) y otro en el que las dos últimas dosis de FSH (Folltropin) se remplazaron por dos de 150 UI de eCG (Foligon) (Sartoti et al., 2008). Los resultados mostraron que no hubo diferencias entre los grupos de vaquillas tratadas con FSH y FSH+eCG con respecto a la respuesta SOV ($23,2 \pm 1,9$ frente a $22,3 \pm 1,6$ folículos ≥ 6 mm, $P = 0,56$) o al número de CL ($15,2 \pm 1,1$ frente a $17,5 \pm 1,4$, $P = 0,21$). Asimismo, tampoco se observó diferencias en el número total de embriones y ovocitos ($9,6 \pm 0,9$ v. $9,5 \pm 1,0$, $P = 0,91$), embriones viables ($4,9 \pm 0,7$ v. $3,7 \pm 0,5$, $P = 0,17$) o embriones degenerados ($3,0 \pm 0,6$ v. $4,3 \pm 0,7$, $P = 0,10$) recuperado. Contrariamente a los resultados observados por Barros et al. (2007) en vacas Nelore, en el presente estudio no observó mejora en la producción de embriones cuando se reemplazaron las dos últimas dosis de FSH por eCG en vaquillas Nelore (Sartoti et al., 2008).

Finalmente, un cuarto estudio en vacas Nelore se probaron cuatro protocolos

SOV, 1 con 8 dosis decrecientes de FSH (P-36; control) y tres con 6 dosis decrecientes de FSH y el reemplazo de las dos últimas dosis de FSH por dos dosis de 200 UI de eCG (P-36/eCG) o dos dosis de 1 (P-36/LH2) o 2 mg de LH (P-36/LH4) (Oliveira et al., 2014). Al igual que en el estudio de (Sartoti et al., 2008) no hubo diferencia significativa en el número promedio de embriones viables entre los grupos P-36 ($3,3 \pm 0,7$), P-36/eCG ($4,5 \pm 0,5$), P-36/LH2 ($3,7 \pm 0,8$) y P-36/LH4 ($4,2 \pm 1,0$), concluyéndose que la sustitución de eCG por LH en el último día de la estimulación ovárica puede realizarse sin variación significativa en la producción de embriones viables (Oliveira et al., 2014).

Como se puede apreciar por los hallazgos de los estudios previamente citados, la sustitución de eCG por las dos últimas dosis de FSH ha mostrado resultados variables, en algunos casos ha mejorado la respuesta SOV y la recuperación de embriones transferibles (Barros et al., 2007; Mattos et al., 2011) y en otros casos no se observó favorable (Sartoti et al., 2008; Oliveira et al., 2014). La presente investigación tiene como variante que en vez de sustituirse las dos últimas dosis de FSH por dos de eCG, como se hizo en los estudios citados, se remplazaron cuatro dosis de FSH por una de eCG. Sin embargo, la respuesta superovulatoria no varío entre los dos grupos experimentales, por lo que la sustitución de las cuatro últimas dosis de FSH por una de eCG no constituyó una ventaja. Dado que el número de animales tratados por grupo fue solo de cuatro vacas, valdría la pena probar estos protocolos en un número de vacas mayor. Eso podría mostrar con mayor contundencia la efectividad de sustituir cuatro dosis de FSH por una de eCG, tal como se realizó en este estudio.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1. La sustitución de las cuatro últimas dosis de FSH en el protocolo convencional de superovulación por dos de eCG, no mejoró la respuesta superovulatoria, en términos del número de cuerpos lúteos. Asimismo, el número de folículos anovulatorios fue el doble en las vacas tratadas con FSH que con FSH+eCG.
2. El número de estructuras recuperadas, embriones transferibles, embriones degenerados y ovocitos sin fecundar fueron similares entre tratamientos.
3. Con el tratamiento FSH+eCG se recuperaron más mórulas y blastocistos expandidos y menos blastocistos regulares que el tratamiento FSH, aunque la diferencia fue no significativa.
4. Las vacas tratadas con FSH produjeron menos blastocistos de calidad 1 y más de calidad 2 que las tratadas con FSH+eCG.

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES

1. Dado que los resultados de esta investigación fueron similares, y que con un número reducido de animales no se pueden sacar conclusiones sólidas, se recomienda realizar una investigación similar con un número mayor de animales, preferiblemente no menos de 12 por grupo experimental.
2. En una investigación posterior sería interesante sustituir las cuatro últimas dosis de FSH por dos dosis de 200 UI eCG, o una sola dosis de 400 UI de eCG.
3. Para el futuro experimento es aconsejable mantener una dieta balanceada máxima con el fin de mejorar la capacidad de respuesta a los tratamientos planteados.
4. Es también importante que las donantes estén adaptadas al clima y al sistema de manejo del rebaño.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, D., & Opavsky, M. (1986). Biological characteristics of a pituitary FSH preparation with reduced LH activity. *Theriogenology*, 25: 135.
- Bacaluba, F. (2006). Métodos de sincronización de celos en bovinos. Sitio Argentino de Producción Animal. www.produccion-animal.com.ar.
- Barros, C.M., Barcelos, A.C.Z., Gouvêa, L.M., Meneghel, M., Barcelos, D.S., Barcelos, L.N., Trinca, L.A. (2008). Improvement of a superstimulatory protocol in nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reproduction, Fertility and Development* 20(1), 152.
- Betteridge, K.J. (2000). Reflections on the golden anniversary of the first embryo transfer to produce a calf. *Theriogenology*, 53(1), 3-10.
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81, 38-48.
- Bonilla, L., Mejía, A., Gómez, R., Torres, M., & Uribe, F. (2018). Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos in vitro a partir de semen sexado comparado con semen convencional en *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Perú*, 29(4), 77-85.
- Cabodevilla, J., Torquati, S. (2001). Superovulación de hembras bovinas. En: *Biotecnología de la Reproducción*. Palma G (Ed). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Cap. 6, 79-108.
- Calva-Rodríguez. (2001). La transferencia de embriones. Una técnica de mejoramiento animal en ganado de lidia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* (69), 129-134.
- Cardoso Consentini, C.E., Wiltbank, M., Sartori, R. (2021). Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. *Animals*, 11, 301. <https://doi.org/10.3390/ani11020301>.
- Carvalho, P.D., Hackbart, K.S., Bender, R.W., Baez, G.M., Dresch, A.R., Guenther, J.N., Souza, A.H., Fricke, P.M. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, 82(3); 481-489.
- Cooke, R.F.; Schubach, K.M.; Marques, R.S.; Peres, R.F.G.; Silva, L.G.T.; Carvalho, R.S.; Cipriano, R.S.; Bohnert, D.W.; Pires, A.V.; Vasconcelos, J.L.M. (2017). Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in beef cows. *Journal of Animal Science*, 95, 1.
- Córdova, A. (2011). Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. *Revista de Reproducción Animal*, 9(23), 34-58.

- Elsden, R.P., Lewis, S., Cumming, I.A., Lawson, R.A. (1974). Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F₂. *Journal of Reproduction and Fertility*, 36, 455-456.
- FAO. (2003). *Biología Agrícola para Países en Desarrollo*. Ruane, J., Zimmermann, M., (Eds). Roma. Disponible en <http://www.fao.org/3/Y2729S/y2729s00.htm#Contents>.
- FAO. (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*. Rischkowsky, B & Pilling, D (Eds). Roma. Disponible en <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s.pdf>.
- Fernández-Novo, A., Pérez-Garnelo, Villagrà Arantxa, Pérez-Villalobos, N., Astiz S. (2020). The effect of Stress on reproduction and reproductive technologies in Beef Cattle - A Review. *Animals*, 10, 2096.
- Ferraz, J.B.S., Eler, J.P., Rezende, F.M. (2012). Impact of using artificial insemination on the multiplication of high genetic merit beef cattle in Brazil. *Animal Reproduction*, 9(3), 133-138.
- González S., C., Soto, E., Goicochea, J., González, R., Soto, G. 1988. Identificación de los factores causales y control del anestro, principal problema reproductivo en la ganadería mestiza de doble propósito, (Premio Agropecuario Banco Consolidado, Caracas, Venezuela).
- González R. (2001). Procedimientos en los programas de trasplante de embriones en ganado bovino. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. 26, 389-410.
- Gutierrez, J.C. (2008). Hormonas de la reproducción bovina. En, *Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito*. C González-Stagnaro, N Madrid Bury, E Soto Belloso (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Cap. XLII: 516-530.
- Hadgu A, Fesseha H. (2020). Reproductive biotechnology options for improving livestock production: a Review. *Food Technology and Nutritional Science*, 6(1), 13-20.
- Hafez, E.S.E, Hafez, B. (2013). *Reproduction in Farm Animals*. Wiley-Blackwell; 7th ed. Baltimore Maryland, USA.
- Hartmann W., Pereira, J.F.S. (2017). Biotechnics applied to bovine female. In: Bergstein-Galan, T.G. (ed). *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*. AvidScience. Pp 155-180.
- Hasler, J.F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81, 152-169.
- Holden, S.A., Butler, S.T. (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal* (2018), 12:S1, s97-s103.

- Huango, Z., Gao, L., Hou, Y., Zhu, S., Fu, W. (2018). Cryopreservation of farm animal gametes and embryos: recent updates and progress. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018231>.
- Kahi, A.K., Rewe, T.O. (2008). Biotechnology in livestock production: Overview of possibilities for Africa. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4984-4991.
- Kasimanickam, R.; Asay, M.; Schroeder, S.; Kasimanickam, V.; Gay, J.; Kastelic, J.; Hall, J.; Whittier, W. Calm. (2014). Temperament improves reproductive performance of beef cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 1063-1067.
- Kasimanickam, V.; Abdel Aziz, R.; Williams, H.; Kasimanickam, R. (2018a). Predictors of beef calf temperament at weaning and its impact on temperament at breeding and reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 484-494.
- Kasimanickam, R.K.; Hall, J.B.; Estill, C.T.; Kastelic, J.P.; Joseph, C.; Abdel Aziz, R.L.; Nak, D. (2018). Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. *Theriogenology*, 107, 70-77.
- Kasimanickam, R.; Kasimanickam, V.; Gold, J.; Moore, D.; Kastelic, J.P.; Pyrdek, D.; Ratzburg, K. (2019b). Injectable or transdermal flunixin meglumine improves pregnancy rates in embryo transfer recipient beef cows without altering returns to estrus. *Theriogenology*, 140, 8-17.
- Laster, D. (1972). Disappearance of and uptake of I¹²⁵ FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30, 407-415.
- Lonergan, P. (2018). Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, 12:S1, s4-s18.
- Macedo, G.G.; Zúccari, C.E.S.N.; de Abreu, U.G.P.; Negrão, J.A.; da Costa e Silva, E.V. (2011). Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 43, 1175-1182
- Mantilla Cabrera, M. R. (2012). Fecundación in Vitro como Alternativa para el Mejoramiento Genético en Bovinos. *Bachelor's*, 15(23), 142-158.
- Mapletoft, R.J. (2013). History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, 10(3), 168-173.
- Mapletoft, R.J. (2013). History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, 10(3), 168-173.
- Mattos MC, Bastos, M.R., Guardieiro, MM, Carvalho, J.O., Franco, M.M., Mourão, G.B., Barros, C.M., Sartori, R. (2011). Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Animal Reproduction Science*, 125(1-4), 119-123.

- Mikkola, M., Taponen, J. (2017). Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 88, 84-88.
- Mattos MC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Franco MM, Mourão GB, Barros CM, Sartori R. (2011). Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Animal Reproduction Science*, 125(1-4), 119-123.
- Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19, 55-82.
- Nogueira, M.F.G., Barros, C.M. (2003). Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Act Sci Vet*, 31:501. .
- Oliveira, A.C., Mattos, M.C., Bastos, M.R., Trinca, L.A., Razza, E.M., Satrapa, R.A., Sartori, R., Barros, C.M. (2014). Efficiency of superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in Nelore cows. *Theriogenology*, 82(5), 715-719.
- Palma G. (2001a). Biotecnología de la reproducción. En: Biotecnología de la Reproducción. Palma G (Ed). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Palma, G. (2001b). Producción in vitro de embriones. En: Biotecnología de la Reproducción. Palma G (Ed). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Perea G., F., Cruz A., R. (2001). Usos de la ultrasonografía en la evaluación reproductiva de la vaca. En: C. González-Stagnaro (Ed). *Reproducción Bovina*. Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Cap. XXIII: 357-372.
- Perea, G.F., Soto, B.E. and González, S.C. (2002). Días vacíos y producción de leche en vacas mestizas. En: C. González-Stagnaro, E. Soto-Belloso and L. Ramírez-Iglesia (eds), *Avances en la Ganadería de Doble Propósito*, (Fundación GIRARZ, Ediciones Astro Data S.A., Maracaibo, Venezuela), pp 401-416.
- Phillippo, M., Rowson, L.E.A. (1975). Prostaglandins and superovulation in the bovine. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 15, 233-240.
- Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 451-455.
- Sanderson, N., Martinez, M. (2020). A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. *Theriogenology*, 154, 66-72.

- Sartori, R., Guardieiro, M.M., Barros, C.M., Bastos, M.R., Machado, G.M., Leme, L.O., Rumpf, R. (2008). Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 21(1) 245-246.
- Senger, P. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conceptions, Inc. 3th ed. Redmond OR, USA.
- Smith, C. (1988). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 29, 203-212.
- Soto B., E.; Perea G., F.; De Ondiz S., A.; Palomares N., R.; González F., R.; Ramírez I., L. (2002). Resultados de la inseminación bicornual sobre la fertilidad al primer servicio en vacas de doble propósito. *Revista Científica FCV-LUZ*, XII(Supl. 2):442-444.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Alasino, R.V., Beltramo, D., Bianco, I., Mapletoft, R.J., Bó, G.A. (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal Reproduction Science*, 129(1-2), 7-13.

9. ANEXOS



Figura 7. Evaluación reproductiva y selección de donadoras

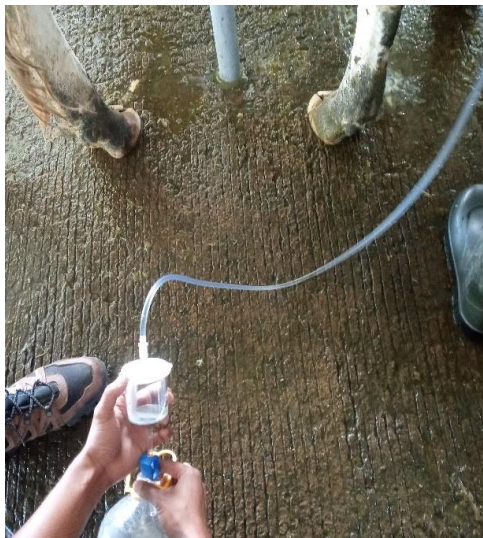
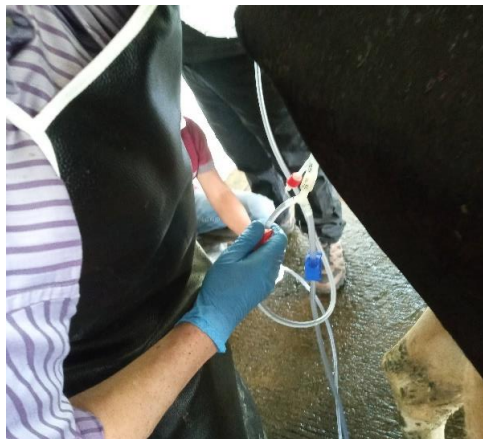


Figura 8. Lavado de embriones

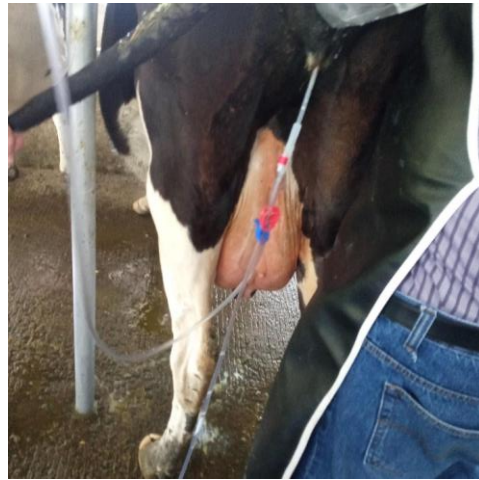


Figura 9. Lavado de embriones



Figura 10. Búsqueda, identificación y selección de embriones

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Luis Miguel Sánchez Sánchez portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105566384**. Declaro ser el autor de la obra: **“REEMPLAZO PARCIAL DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE PORCINA (FSH-p) POR GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA SUPEROVULACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **31 de agosto de 2021**



F:


Luis Miguel Sánchez Sánchez

C.I. 0105566384

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Luis Miguel Sánchez Sánchez portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105566384**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“REEMPLAZO PARCIAL DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE PORCINA (FSH-p) POR GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) EN LA SUPEROVULACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **31 de agosto de 2021**



F:

Nombres y Apellidos

C.I. 01010101010

Cuenca, 09 de septiembre de 2021

EL CENTRO DE IDIOMAS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, CERTIFICA QUE EL
DOCUMENTO QUE ANTECEDE FUE TRADUCIDO POR PERSONAL DEL CENTRO PARA LO CUAL
DOY FE Y SUSCRIBO


Janneth Adriana Suquinagua Alvarado
SECRETARIA



