



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**SINCRONIZACIÓN DE LA EMERGENCIA PARA LA
PUNCIÓN FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN EN
PRODUCCIÓN.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

AUTOR: DORIAN FERNANDO IDROVO CALLE

DIRECTOR: MV. DANIEL ARGUDO GARZÓN, MGS.

CUENCA – ECUADOR

2020

*Yo me gradué en los
50 años de La Cato!*



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**SINCRONIZACIÓN DE LA EMERGENCIA PARA LA
PUNCIÓN FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN EN
PRODUCCIÓN.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

AUTOR: DORIAN FERNANDO IDROVO CALLE.

DIRECTOR: MV. DANIEL ARGUDO GARZÓN, MGS.

CUENCA – ECUADOR

2020

*Yo me gradúe en los
50 años de La Cato!*

DECLARACIÓN

Yo, Dorian Fernando Idrovo Calle, 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.



Dorian Fernando Idrovo Calle

CERTIFICACIÓN

De mis consideraciones:

El presente trabajo de titulación denominada “Sincronización de la emergencia para la punción folicular en vacas holstein en producción” fue desarrollado por DORIAN FERNANDO IDROVO CALLE, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros de método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que esta expedito para su presentación.



MV. Daniel Argudo Garzón. Mgs.
DIRECTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quien ha sido mi guía me acompaña en este camino, Dios; a mis hijos, quienes son los inspiradores de mi existir y mi fortaleza; mi familia; mis padres; hermanos; tíos; a los que ya no están junto a mí, pero merecen mi dedicatoria mis abuelos Luis y Margarita; a todos ellos que confiaron en mí siempre y me han apoyado en todo lo que me he propuesto, mi gratitud eterna a ellos.

Dorian Fernando Idrovo Calle

AGRADECIMIENTO

En el transcurso de este cambiar he encontrado a muchas personas que me han brindado su apoyo y su amistad y los considero más que maestros amigos.

Muy agradecido con el Dr. Daniel Argudo tutor de este trabajo y el Dr. Carlos Soria quienes me han compartido su conocimiento para poder realizar este trabajo, a las personas que se han sumado con su ayuda, un profundo agradecimiento, por creer en mí.

A mis tíos, Walter, Dalia, Gina que me han brindado su apoyo en todo lo que me he propuesto en mi vida gracias por todo.

Dorian Fernando Idrovo Calle

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	11
ABSTRACT	12
CAPITULO 1	13
1.1 Introducción	13
1.2 Planteamiento del problema.....	14
1.3 Hipótesis.....	16
1.4 Antecedentes	17
1.5 Objetivos	18
1.6 Justificación	19
CAPITULO 2 MARCO TEÓRICO	20
2.1 CICLO ESTRAL DE LA VACA	20
2.2 SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL	23
2.3 REPRODUCCIÓN DE VACAS HOLSTEIN EN PRODUCCIÓN	26
2.4 DINÁMICA FOLICULAR	27
2.5 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i>	29
2.6 TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA (Ovum pick up, OPU)	30
2.7 CALIDAD DE OVOCITOS	32
CAPITULO 3	36
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	36
3.1 Ubicación de la zona de estudio	36
3.2 Universo, población y muestra	36

3.3 Materiales	37
3.3.1 Biológicos	37
3.3.2 Equipos	37
3.3.3 Químicos	37
3.3.4 Materiales de laboratorio	37
3.4 Procedimiento	38
CAPITULO 4	40
RESULTADOS	40
CAPÍTULO 5	45
DISCUSIÓN	45
CAPITULO 6	47
CONCLUSIONES	47
CAPITULO 7	48
RECOMENDACIONES	48
8. BIBLIOGRAFÍA	49
9. ANEXOS	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	21
Figura 2. Estructuras de los ovarios.....	22
Figura 3. Dinámica folicular.....	24
Figura 4. Esquema del protocolo Ovsynch	25
Figura 5. Esquema de protocolos Ovsynch modificados	25
Figura 6. Dinámica folicular.....	28
Figura 7. Aspiración folicular.....	32
Figura 8. Ovocito grado A.....	32
Figura 9. Ovocitos grado B.....	33
Figura 10. Ovocitos grado C	34
Figura 11. Ovocitos grado D	34
Figura 12. Ovocitos grado E	35
Figura 13. Área de estudio.....	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Etapas del ciclo estral	24
--	----

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Selección de vacas donadoras	55
Ilustración 2. Sincronización folicular	55
Ilustración 3. Aspiración folicular	56
Ilustración 4. Filtrado de los ovocitos	56
Ilustración 5. Folículos vistos mediante Eco	57
Ilustración 6. Ovocitos recuperados	57
Ilustración 7. Clasificación de ovocitos	58
Ilustración 8. Tinción azul tripan	58
Ilustración 9. Tinción Brillante de cresilo.....	59
Ilustración 10. Observación al microscopio con la tinción Azul Brillante de Cresilo	59
Ilustración 11. Maduración In Vitro.....	60
Ilustración 12. Embriones producidos	60
Ilustración 13. Observación de embriones producidos	61

RESUMEN

Las actividades de producción ganadera son las más realizadas a nivel mundial, mediante la transferencia de embriones se puede obtener animales genéticamente mejorados, lo cual ha permitido el incremento del desarrollo productivo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de las hormonas GnRH y Benzoato de estradiol por separado, adicionando un implante de progesterona 0.6 g y 500 µg de Cloprostenol en ambos protocolos, con la finalidad de sincronizar la onda folicular y recuperar la mayor cantidad de ovocitos de buena calidad mediante OPU en vacas Holstein en producción. Se evaluó 12 vacas con cuatro repeticiones, con descanso por un lapso de 7 días, los grupos fueron intercalados entre GnRH y BE, posterior al retiro del implante a los 5 días se realizó la ECO y se evaluó la cantidad y tamaño de folículos y si presentan cuerpo lúteo; se realizó la evaluación de la tasa de recuperación, la cantidad y la calidad de ovocitos mediante microscopía con las tinciones Azul brillante de cresilo y Azul tripan. Los resultados demostraron que la sincronización de la onda folicular con GnRH y BE no presentaron diferencia significativa previo a la punción folicular (OPU), por cuanto pudimos sincronizar de manera eficiente, en relación a la cantidad y calidad de ovocitos, así como en la producción de embriones no presentó diferencia entre los dos tratamientos utilizados.

Palabras clave: OPU, Emergencia Folicular, Producción de embriones inVitro, GnRH, BE

ABSTRACT

Livestock production activities are the most carried out worldwide, by means of embryo transfer, genetically improved animals can be obtained, which has allowed the increase in productive development. The objective of this study was to evaluate the use of the hormone's GnRH and estradiol benzoate separately, adding a progesterone implant 0.6 g and 500 µg of Cloprostenol in both protocols, in order to synchronize the follicular wave and recover the largest number of oocytes. of good quality by OPU in Holstein cows in production. Twelve cows were evaluated with four repetitions, with rest for a period of 7 days, the groups were interspersed between GnRH and BE, after the removal of the implant at 5 days the ECO was performed and the number and size of follicles were evaluated and if present corpus luteum; The evaluation of the recovery rate, the quantity and the quality of oocytes was carried out by microscopy with the Cresyl Brilliant Blue and Trypan Blue stains. The results showed that the synchronization of the follicular wave with GnRH and BE did not present a significant difference prior to follicular puncture (OPU), since we were able to synchronize efficiently, in relation to the quantity and quality of oocytes, as well as in the production of embryos did not show a difference between the two treatments used.

Keywords: OPU, Follicular Emergence, InVitro Embryo Production, GnRH, BE

CAPITULO 1

1.1 Introducción

La producción ganadera es una de las actividades más realizadas a nivel mundial, gracias a las nuevas biotecnologías y principalmente la transferencia de embriones que permite la obtención de animales genéticamente mejorados, se ha incrementado el desarrollo productivo de la ganadería bovina (Vázquez Borja, 2017).

En el año 2018 se produjo un total de 1,499,367 embriones, siendo la producción mayor en un 0,8% al año 2017, de los cuales 469,967 corresponde al 31.3% de embriones producidos por superovulación *in vivo* y 1,029,400 embriones producidos *in vitro* correspondiendo al 68.7% del total de la producción de embriones (Viana, 2019).

Los tratamientos superovulatorios permiten la obtención de un número de embriones superior que lo natural, sin embargo, la producción de embriones por ésta técnica es muy variable y costosa (Marcos Germán Colazo & Mapletoft, 2007), Una alternativa a esta problemática es la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, Ovum Pick-Up), con la cual se consigue producir embriones sin las complicaciones de la superovulación y a menor costo (Ruiz López, 2010).

No obstante, el éxito de la producción *in vitro* de embriones depende de varios factores, entre los principales tenemos la calidad de los ovocitos recuperados. Recientemente, trabajos realizados en Brasil mostraron que sincronizar la onda folicular mejora la eficiencia de la producción embriones *in vitro* mostrando ya que se consiguen ovocitos más homogéneos en cuanto su calidad (Cavaliere et al., 2018). En este trabajo se aplicará dos tratamientos hormonales para sincronizar la emergencia folicular, con la finalidad de obtener ovocitos en mayor cantidad y de mejor calidad para su posterior producción de embriones *in vitro*.

1.2 Planteamiento del problema

En la última década se ha incrementado notablemente la fertilización in vitro en ganado bovino mediante la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU). Esta técnica permite optimizar el material genético de los animales ya que se puede obtener hasta 100 embriones por año (Ruiz López, 2010), es así que, el número de embriones obtenidos in vitro y transferidos a los bovinos para el año 2018 fue de 1,499,367 a nivel mundial (Viana, 2019).

Esta técnica permite su aplicación en cualquier etapa del ciclo estral, en los tres primeros meses de gestación, en vaconas antes del servicio, se puede realizar por un lapso de seis meses hasta dos veces por semana, debido a que tiene un bajo nivel de invasión presenta menor riesgo en las hembras, además de su factible aplicación en campo (Alvarado Malca, Gamarra, Gallegos, & Samillán, 2016).

La fertilidad del ganado Holstein ha disminuido en los últimos 15 a 20 años a nivel mundial, por lo que las vacas repetidoras constituyen pérdidas en la explotación ganadera (Martinez, 2008). Estudios demuestran que el intervalo entre partos, la producción láctea y los días abiertos están estrechamente correlacionados. Esto involucra al balance energético negativo que coincide con los cambios de estado reproductivo, la pérdida de condición corporal, cambios metabólicos que tienen una relación directa en la regulación de nutrientes, hormonas reproductivas y hormonas ligadas al estrés (Galvis R., Múnera, & Marín, 2005).

Lo mencionado anteriormente, hace complejo el uso de biotecnologías reproductivas como OPU en este tipo de animales, una de las causas podría ser que alrededor del 85% de los folículos ováricos aspirados presentan un grado de atresia (Marcondes Seneda, Fonseca Zangirolamo, Zamparone, & Morotti, 2020). Por lo que la sincronización de la emergencia de la onda folicular permite obtener ovocitos de mejor calidad lo cual representa una alternativa viable en los sistemas de producción continua de embriones (Solís Corrales, Guerra, Sandoya, & De Armas, 2012).

Asimismo, se ha demostrado que la sincronización de la onda folicular antes de la aplicación de la OPU, optimiza las tasas de producción embrionaria y concepción posteriores a la transferencia para receptoras (Cavaliere et al., 2018). En el trabajo citado, los autores sincronizan la emergencia utilizando benzoato de estradiol, no obstante, en Europa y Estados Unidos se encuentra prohibido el uso de esta hormona.

Varios estudios indican que el estradiol presenta efectos genotóxicos, desarrollando entre otros, la proliferación de células cancerígenas a nivel mamario en dosis elevadas (Lozano & Arias, 2008); Esto genera la necesidad de investigar protocolos que reemplacen el uso de los estrógenos por los que no tengan prohibiciones, tal es el caso de la GnRH. Ésta hormona produce el reinicio de la onda folicular en similares términos que el benzoato de estradiol, lo cual podría permitir un reemplazo en el protocolo de sincronización de la emergencia (Prieto, Stahringer, & Vispo, 2016).

1.3 Hipótesis

Ho: Los métodos de sincronización de la emergencia folicular con el uso de benzoato de estradiol y GnRH previo a la punción folicular (OPU) en vacas Holstein en producción, permite obtener igual cantidad y calidad de ovocitos.

1.4 Antecedentes

La inseminación artificial (IA) es una de las tecnologías más usada a nivel mundial por los productores de ganado; sin embargo, la necesidad de explotar la genética materna ha permitido que las tecnologías evolucionen, por lo que se desarrolló la técnica de transferencia de embriones (ET) a inicios de los años setenta, la cual mediante la contribución de ambos sexos permite acelerar la ganancia genética (Marcos Germán Colazo & Mapletoft, 2007).

En Europa la técnica de superovulación inició a finales de la década de los noventa, obteniéndose así 17.855 donantes con un total de 119.342 embriones transferibles (Astiz, Romero-Aguirregomez, Poto, & Ruiz, 2012). Según la International Embryo Technology Society (IETS) con datos recogidos a nivel mundial, reportó para el año 2015 un total de 630.202 embriones producidos in vitro y transferidos, lo cual demuestra una mejora considerable en todos los pasos para realizar una transferencia de embriones exitosa (Velez et al., 2017).

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (Ovum pick up, OPU), a inicios de los ochenta fue desarrollada para humanos y hasta finales de la década se aplicó en bovinos en Holanda. Esta técnica permite su aplicación en varios estados fisiológicos de los animales, además de que mediante OPU los ovocitos recuperados ayuda a la mejor producción de embriones frente a otros protocolos de transferencia embrionaria (Ruiz, Zaraza, De Ondiz, & Rath, 2018).

Para realizar la sincronización de la onda folicular, la GnRH actúa desarrollando una oleada de folículos mediante la intervención de las hormonas FSH y P4 que dan lugar a la maduración de los ovocitos, permitiendo su ovulación debido al aumento de los picos de LH (Soria Parra et al., 2017). El benzoato de estradiol, se caracteriza por su acción en el control de ciclo sexual, que dependiendo del momento de su aplicación puede desencadenar la luteólisis si es aplicada a la mitad del ciclo, impide el crecimiento de un nuevo cuerpo lúteo si se administra luego de la ovulación y si es utilizada con progesterona suprime la onda folicular presente y reinicia una nueva onda folicular (Pesantez & Supliguicha, 2019).

La aplicación de la OPU en ganado vacuno se la realiza en cualquier día del ciclo estral, en donde los folículos visibles o antrales se puncionan. Se han realizado varios estudios en donde las aspiraciones foliculares fueron entre el día 3 y 4 después del estro, el día 5 después de la emergencia o en sus primeras etapas en donde los

folículos son más pequeños, dando como resultado mejor calidad en los ovocitos en estos primeros días gracias a la ausencia de estructuras con atresia. Debido a esto se han desarrollado estrategias de sincronización que permita obtener un mayor número de ovocitos mediante OPU para mejorar la eficiencia de la producción in vitro en bovinos (Cavalieri et al., 2018).

1.5 Objetivos

1.5.1. Objetivo General

- *Evaluar dos métodos de sincronización de la emergencia folicular previo a la punción folicular (OPU) en vacas Holstein en producción.*

1.5.2 Objetivos Específicos

1. *Medir la capacidad del benzoato de estradiol y GnRH para sincronizar la emergencia folicular.*
2. *Evaluar la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por OPU con los dos métodos de sincronización de la emergencia folicular.*

1.6 Justificación

La sincronización de la emergencia folicular permite incrementar el número de folículos aspirados y ovocitos obtenidos mediante OPU, así como la calidad de los mismo. En vacas Holstein en donde se presenta una baja cantidad de ovocitos y de menor calidad, la situación puede ser mejorada con el uso de protocolos efectivos de sincronización de la emergencia; se ha observado un incremento en la eficiencia de la obtención de ovocitos por OPU con una mayor producción de embriones (Bó et al., 2014).

La hormona GnRH es utilizada para la manipulación del desarrollo folicular, la misma que se basa en la ovulación del folículo dominante mediante la inducción de un pico de LH obteniendo como resultado la ovulación. La hormona esteroidea benzoato de estradiol optimiza los resultados reproductivos en los tratamientos cuando se usa en conjunto con implantes de progesterona, provocando así el inicio de una nueva onda folicular (Romero & Galarza, 2019).

En los tratamientos de superovulación el benzoato de estradiol en la sincronización de la emergencia presenta gran eficiencia, sin embargo, hay restricción de uso en algunos países. Por otra parte, la utilización de la GnRH para la misma sincronización de emergencia en asociación con progesterona, permite la superestimulación después de la ovulación durante la primera onda folicular, cuyos resultados no presentan un cambio significativo de los obtenidos con el benzoato de estradiol (Bó et al., 2014).

En el presente estudio se evaluará el uso de estas dos hormonas GnRH y Benzoato estradiol por separado, adicionando un implante de progesterona y prostaglandina en ambos protocolos, con la finalidad de sincronizar la onda folicular y recuperar la mayor cantidad de ovocitos de buena calidad mediante OPU.

CAPITULO 2 MARCO TEÓRICO

2.1 CICLO ESTRAL DE LA VACA

El ciclo estral se encuentra regulado por: eje hipotálamo – hipofisario, los ovarios, folículos y el útero, su fisiología se describe a continuación:

- a) Eje Hipotálamo – Hipofisario: El Hipotálamo se encuentra ubicado en la base del cerebro, produce la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH), se dirige al sistema hipofisario mediante capilares y continúa hacia las células de la hipófisis anterior en donde su función principal es la estimulación de la producción y secreción de las hormonas Folículoestimulante y Luteinizante (FSH) y (LH) respectivamente (Rippe, 2009).

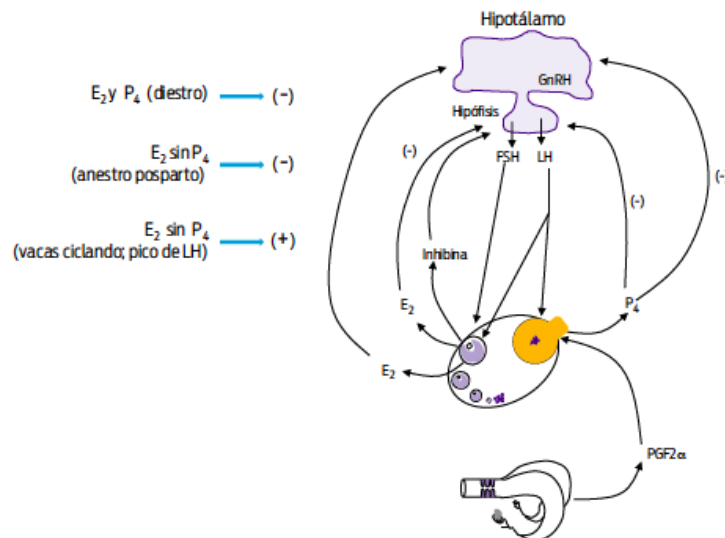
La hormona FSH es catalogada como iniciadora del crecimiento folicular, a su vez, en las células foliculares estimula los receptores de la LH; la FSH presenta alrededor de cada hora secreción pulsátil durante todo el ciclo estral y se observa un pico plasmático el cual se relaciona con el pico preovulatorio de LH, coincidiendo con el inicio del estro y luego de este pico se produce la ovulación de 24 a 30 horas después (Matamoros & Salinas, 2017).

- b) El hipotálamo se comunica con la hipófisis mediante el sistema denominado porta-hipotálamo-hipofisario; secreta la hormona GnRH mediante dos formas, por estímulos externos (bioestimulación, amamantamiento, fotoperiodo) o estímulos internos (hormonas sexuales, metabólicas, metabolitos), esta hormona posteriormente llega a la hipófisis mediante el sistema porta-hipotálamo-hipofisario y estimula la secreción de la LH y FSH (Hernández Cerón, 2016).

En la Hipófisis se producen varias hormonas incluyendo la FSH y LH, las cuales intervienen en el ciclo estral, en donde la función de la FSH es el del crecimiento y maduración folicular; y, la LH se encarga de la ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. En el hipotálamo también se produce la hormona oxitocina la cual se almacena en la adenohipófisis, esta ejerce su acción en los

procesos de: luteólisis en el ovario, en el parto, en la producción de leche (Rippe, 2009).

Figura 1. Relación entre el Hipotálamo-Hipófisis-Ovario



Fuente: (Hernández Cerón, 2016).

- c) Ovarios: aquí se producen funciones endócrinas (esteroidogénesis) y exocrinas (liberación de óvulos), son órganos pares constituidos por médula y corteza; y, se encuentran rodeados por epitelio germinal, la médula ovárica presenta folículos ováricos y cuerpos amarillos, los mismos que se pueden encontrar en diferentes etapas de desarrollo (Hafez & Hafez, 2000).

El óvulo liberado se dirige a la trompa de Falopio y a continuación al extremo superior del cuerpo uterino derecho o izquierdo según corresponda, si no se produce la fertilización, el óvulo morirá en un lapso de 10 horas (Gómez, 2008).

- d) Folículos: estas estructuras son esféricas, presentan una membrana semitransparente que las cubre y contienen líquido en su interior, su tamaño es variable y toman el nombre acorde a este, por ejemplo si su diámetro es de 10mm se denominará F10, pueden llegar a medir entre 2 y 2.5 cm como máximo; además, se clasifican en preantrales o primarios cuando su tamaño es menor a 4 mm, antrales o secundarios si su tamaño es entre 4 a 9 mm; y, de Graaf o terciarios los que presentan un tamaño mayor a 9 mm (Rangel, 2009).

- e) Útero: La Prostaglandina F₂α (PGF₂α), es la principal luteosina endógena secretada por el útero; es necesaria para producir la luteólisis perdiendo la capacidad de síntesis y secreción de progesterona; y, por la pérdida de las células que conforman el cuerpo lúteo (Atuesta & Gonella, 2011).

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula transitoria compuesta por células parénquimales esteroidogénicas, productora de progesterona; esta hormona tiene la función de regular el ciclo estral y suprimir la ovulación, en las vacas preñadas otorga condiciones apropiadas para el desarrollo embrión en el útero (Aréchiga-Flores et al., 2019).

Figura 2. Estructuras de los ovarios



Cuerpo lúteo izquierdo CL3.



Regresión del CL y folículos en desarrollo.



Folículo izquierdo maduro.



Cuerpo lúteo con cavidad.



Quiste folicular izquierdo.

Fuente:(Gómez, 2008).

2.2 SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral de las vacas está constituido por dos etapas: la primera etapa denominada folicular que está compuesta por el estro y metaestro; y la segunda etapa llamada lútea conformada por diestro y poestro, la duración del ciclo es de 21 días en

promedio, sin embargo, puede haber un rango de 17 a 24 días. Es regulado por las hormonas de Eje Hipotálamo – Hipofisario (Zambrano Neira & Neira Sanchez, 2020), a continuación se explican las etapas del ciclo estral:

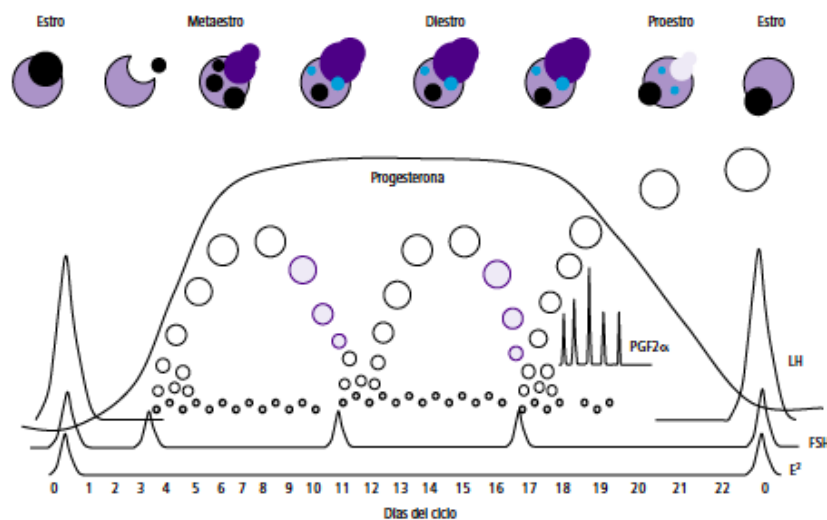
Tabla 1 Etapas del ciclo estral

Etapa	Día	Duración	Evento
Estro	0	10-12 horas	Maduración folicular, altos niveles de estrógeno y pico de LH
Metaestro	1-3	5-7 días	Oculación entre las 12 y 18 horas. Formación del cuerpo hemorrágico que no responde a PGF2 α
Diestro	5-18	10-15 días	Maduración del cuerpo lúteo – altos niveles de progesterona
Poestro	19-21	3 días	Regresión del cuerpo lúteo, maduración del foliculo e incremento de estrógenos

Fuente: (Shearer, 2003).

Los ciclos estrales pueden presentar entre dos a tres ondas de crecimiento folicular: emergencia, selección y atresia u ovulación del folículo dominante. La primera onda se presenta en el día 0, es decir, en el día de la ovulación; la segunda onda aparece para los animales con ciclos de dos ondas entre los días 9 a 10, y, para los animales con ciclos de tres ondas en los días 8 a 9; para los ciclos de tres ondas la tercera onda inicia en los días 15 a 16 (Colazo & Mapletoft, 2014).

Figura 3. Dinámica folicular



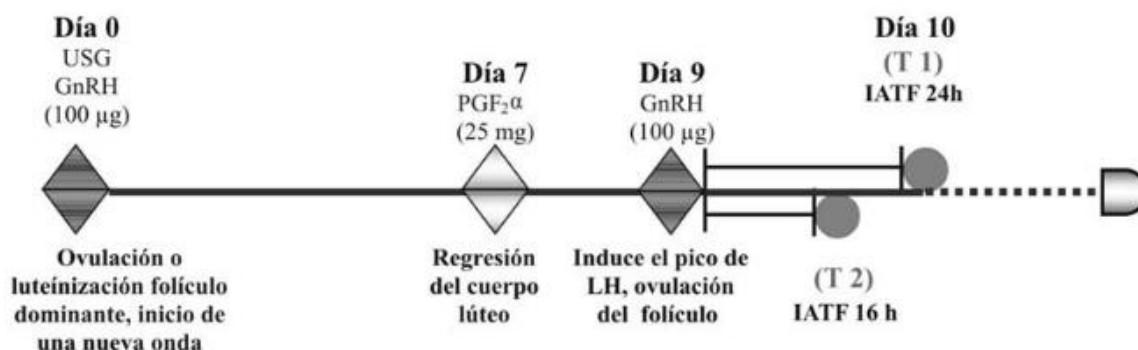
Fuente: (Hernández Cerón, 2016).

Los métodos de sincronización permiten mejorar la eficiencia en cualquier tipo de biotecnología, ya sea Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), superovulación y lavado de embriones; y, Fertilización in vitro (FIV), además, evita las fallas en la detección de celos, reduce el tiempo y número de veces de manejo del ganado, mediante el uso de fármacos se obtiene mejores resultados en la observación de estros y la superovulación (Pérez, 2019).

Entre los fármacos más usados se encuentran el benzoato de estradiol (BE) y la hormona GnRH; el BE asegura la presencia de un nuevo folículo dominante y de un ovocito viable ya que al inicio de la sincronización provoca la regresión del folículo y al cuarto día posterior a la aplicación sincroniza la emergencia de la nueva onda folicular (Agromeat, 2001). La aplicación de la hormona GnRH en vacas que presentan un folículo dominante en crecimiento induce la ovulación con la emergencia de una nueva onda folicular (Colazo, Mapletoft, Martinez, & Kastelic, 2007).

El protocolo **Ovsynch** presenta eficacia en vacas lecheras en producción en donde se observa que el 85% de los animales tiene una respuesta a la primera aplicación de la hormona GnRH; por el contrario en vaconas la respuesta tras la misma primera aplicación se aprecia únicamente en el 54% (Huanca, 2001), el protocolo se indica en la figura 4.

Figura 4. Esquema del protocolo Ovsynch

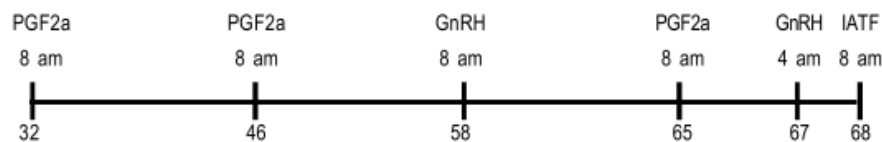


Fuente:(Flores et al., 2015)

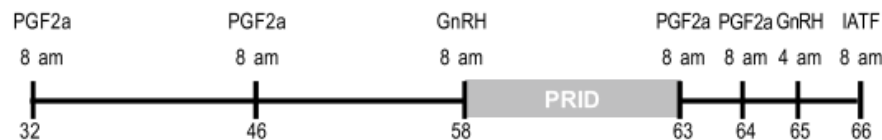
Al protocolo antes descrito en la figura 4 se le realiza una incorporación de dos aplicaciones de PGF₂α intramuscular en un lapso de 14 días en vacas que se encuentran entre los 32 a 35 días posparto, este protocolo se indica en la figura 5. Se han desarrollado modificaciones para el protocolo Ovsynch, una de ellas es la implementación de un implante intravaginal de progesterona durante 5 días (PRIDd) luego de la primera aplicación de GnRH, esto favorece en un 10% la tasa de gestación (Flores et al., 2015), en la figura 5 se puede observar este protocolo.

Figura 5. Esquema de protocolos Ovsynch modificados

Ovsynch



PRID5d



Fuente: (Flores et al., 2015)

2.3 REPRODUCCIÓN DE VACAS HOLSTEIN EN PRODUCCIÓN

El comportamiento reproductivo del ganado lechero se estima en la capacidad para parir en intervalos regulares, aproximadamente entre 12 a 13 meses con un período de lactacia promedio de 10 meses (Gómez, 2008).

Uno de los principales retos dentro de la industria lechera es mantener los niveles altos de producción láctea sin que esto afecte los parámetros reproductivos de los animales, siendo éstos multifactoriales, puede influir la mala alimentación, factores biológicos y genéticos, cambios fisiológicos y además el manejo en general del hato, algunos estudios han demostrado que cuando aumenta la producción de leche, disminuye el capacidad reproductiva (Córdova & Pérez, 2005).

Los periodos productivos de una vaca Holstein va desde el primer parto hasta la salida del animal del hato lechero, buscando la relevancia en longevidad y producción considerando que la longevidad hace énfasis en que la vaca no sea descartada por enfermedad, baja fertilidad y baja producción (Orrego A, Delgado C, & Echevarría C, 1999).

Dentro de la producción de vacas Holstein está en valorar el desempeño reproductivo de los animales ya que estos refieren pérdidas económicas que son principalmente pocos terneros/vaca por año, elevado costo de la inseminación artificial lo cual aumenta el costo de reemplazo y disminuye la vida productiva de las vacas (Zambrano, Rincón, & Echeverri, 2014).

Entre las principales causas de infertilidad que afectan a la capacidad de reproducción se encuentran alteraciones genéticas como aberraciones cromosómicas e intersexualidad, desórdenes ovulatorios como anestros estacionales, por envejecimiento o nutricional, presencia de quistes ováricos, luteales o foliculares; y,

los desórdenes hormonales que son las principales causas de repetición del estro y puede presentarse como un anestro debido a baja concentración de insulina y glucosa en sangre como consecuencia de una mala alimentación, o como quiste ovárico debido falta de las hormonas LH y GnRH (Córdova, Sánchez, Leal, Muñoz, & Murillo., 2002).

La eliminación “voluntaria” de animales en hatos lecheros es un factor que determina la rentabilidad ya que los costos de reposición son excesivos, algunos factores a considerar para su eliminación son problemas de infertilidad considerando estos como: abortos, metritis, infertilidad, esterilidad, fetos momificados; se estima que el descarte de animales debido a los problemas de infertilidad del primer a tercer parto representa el 24.7% en el primer parto, el 26.3% en el segundo y 23.1% para el tercer parto, siendo la causa más frecuente para la eliminación (Fouz, Yus, Sanjuán, & Diéguez, 2014).

2.4 DINÁMICA FOLICULAR

El crecimiento folicular antral es controlado por gonadotropinas de manera endócrina, además de factores de crecimiento los cuales funcionan de forma parácrina y autócrina que junto a cambios nutricionales y ambientales influyen en la actividad ovárica del bovino (Vásquez & Olivera, 2010).

En el ovario de la hembra bovina se forman los folículos preantrales los mismos que se originan en la fase embrionaria en el saco vitelino dando origen a las células germinales primordiales que posteriormente darán origen a las oogonias alojándose en la cresta gonadal, las oogonias son envueltas por células pregranulosas constituyendo el folículo primordial, estima que de 2.700.000 oogonias desde la etapa fetal hasta el nacimiento se reduce a 135.000 folículos primordiales; luego del nacimiento los folículos primordiales cambian su apariencia aplanada por cúbica llamándose folículos primarios, su crecimiento y multiplicación formando entre 2 y 6 capas alrededor del oocito con lo cual da lugar a los folículos secundarios; en la siguiente fase el folículo activa la formación del antro aumentando el diámetro rápidamente constituyendo el folículo terciario o antral; como fase final el folículo que presenta mayor tamaño es el que finalmente dará inicio a la ovulación, al cual se le denomina folículo de Graaf (Palma, 2008).

Las fases del desarrollo folicular pueden describirse en tres períodos:

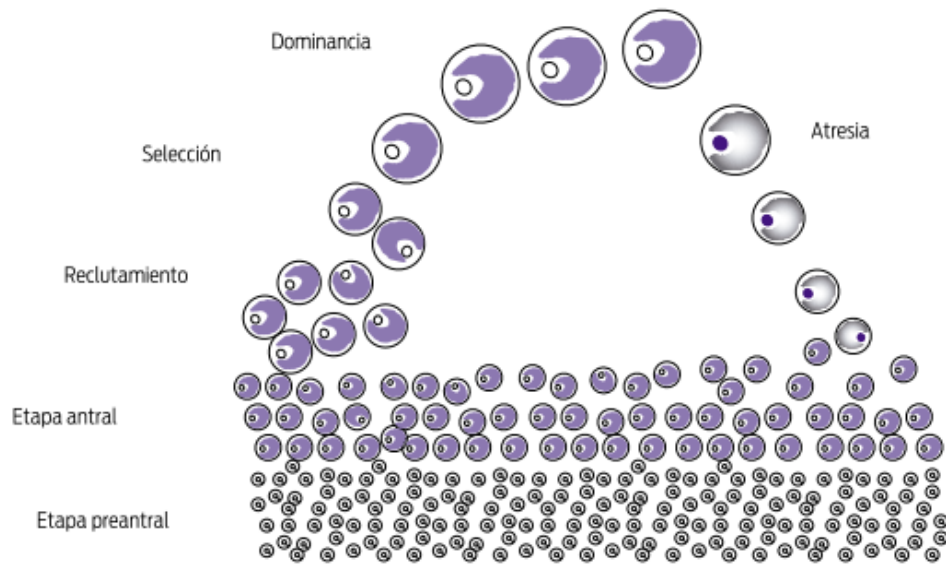
1. **Reclutamiento:** en esta fase en los dos ovarios se presenta la iniciación del crecimiento de 8 a 41 folículos simultáneamente de hasta 4mm de

diámetro, estos folículos son dependientes de gonadotropinas principalmente la hormona FSH (Vásquez & Olivera, 2010).

2. **Selección:** en esta segunda fase se produce disminución en el número de folículos en crecimiento, debido a la atresia de folículos subordinados, esta se define como la reabsorción de líquidos del antro folicular, esta fase se presenta simultáneamente con el descenso de concentraciones de la hormona FSH que se da de 3 a 4 días posteriores al reclutamiento, esto influye en el crecimiento de los folículos que presentan un tamaño menor a 5mm de diámetro, la FSH en algunos folículos induce la producción de activina y folistatina lo cual incrementa el tamaño del folículo (Driancourt, 2001).
3. **Dominancia:** esta tercera fase el folículo dominante es caracterizado por crecimiento folicular rápido y maduración oocitario, aquí se presenta una disminución gradual de la FSH y la inhibición de la emergencia de la próxima onda folicular más la atresia de los folículos sobrantes; esto hace que se incremente la secreción desde la hipófisis de la LH, en esta fase el diámetro del folículo puede llegar hasta 15mm previo a la ovulación (Driancourt, 2001); en caso de que este folículo dominante sea quitado mediante alguna técnica de aspiración o ablación folicular, durante las siguientes 12 horas se generará un pico de la FSH como consecuencia se presentará la emergencia de una nueva onda folicular en 24 horas (Adams, Jaiswal, Singh, & Malhi, 2008).

Se pueden presentar algunas variaciones dentro de la dinámica folicular debido a factores como: la nutrición ya que una dieta pobre se asocia a bajas concentraciones de IGF-I circulante, disminución del diámetro del folículo dominante en todas las ondas, así como también el tiempo de persistencia del folículo durante la primera onda; producción láctea, periodos de lactación, manejo de los animales y el posparto (Motta, Ramos, González, & Rojas, 2011).

Figura 6. Dinámica folicular



Fuente: (Hernández Cerón, 2016)

Mediante la ecografía se puede observar que las vacas presentan dos o tres ondas foliculares en cada ciclo estral, estas ondas se desarrollan a partir de folículos antrales que siguen un crecimiento hasta los 4 mm, posteriormente se realiza una selección de un folículo dominante, el mismo que continúa el crecimiento; el resto de folículos inicia un proceso de atresia. En ciclos de dos o tres ondas, la emergencia de la primera onda ocurre después de la ovulación, la segunda onda se presenta entre los nueve y diez días en ciclos de dos ondas, sin embargo, en ciclos de tres ondas se presenta en los días ocho y nueve, presentándose entre los días quince a dieciséis una tercera onda (Huanca, 2001).

2.5 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

La producción de embriones *in vitro* da inicio con la aspiración de los complejos células del cumulus oophorus-ovocito (COCs), por medio de una sonda transvaginal, un mango de OPU y agujas de 21 y 18G, estos son aspirados con el líquido folicular que mediante una bomba son recolectados hacia tubos estériles de 10ml, este líquido se decanta durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y de la decantación se toma de 2 a 5 ml, posteriormente se coloca en una caja Petri. La eficiencia de la punción se basa en la cantidad de ovocitos obtenidos por la cantidad de folículos aspirados, esto varía acorde al tamaño del ovario, estado nutricional y raza de los animales, además de la pericia del manipulador (Palma, 2007).

La producción de embriones *in vitro* de bovinos ha generado algunas dificultades en los producidos luego de la maduración y fertilización *in vitro* principalmente, sin embargo, no es posible identificar si la causa es la reducción del desarrollo de ovocitos

sometidos a maduración y fertilización *in vitro* o que no se pudieron establecer las condiciones óptimas para su cultivo, la calidad de ovocitos es un factor fundamental que permite el éxito al momento de realizar la producción de embriones *in vitro* ya que permite obtener un porcentaje de fertilización del 73.3% en promedio, ya que los ovocitos que presentan de 2 a 3 capas de células cumulus presentan el 76,9% de porcentaje de fertilizaciónm mientras que los ovocitos rodeados de 4 a 6 capas de células del cumulus, presentan un porcentaje de 81.8% en fertilización (Fernandez, Diaz, & Muñoz, 2007).

Entre las ventajas para realizar embriones *in vitro* es que permite la producción de embriones en vacas preñadas mediante punciones por lo que otorga mayor productividad, rapidez de su propagación y ganancia genética, debido a que mediante el uso de OPUs de vacas donantes se puede obtener gran cantidad de ovocitos, en intervalos cortos de tiempo y sin lastimar a la donante puesto que no existe un número máximo de punciones (Alvares, Rafagnin, Oliveira, Marcondes, & Bizarro, 2014).

Los avances en las biotecnologías de la reproducción han permitido combinar la OPU y la Producción *in vitro* de embriones, sin embargo, la aspiración de ovocitos ha mostrado reducción en la cantidad y calidad de ovocitos recuperados, no obstante se ha desarrollado protocolos para mejorar la calidad y el rendimiento de ovocitos aspirados y consecuentemente la producción de embriones *in vitro*, estos protocolos se basan en la pre-estimulación hormonal mediante el uso de gonadotropinas como paso previo a la realización de la OPU, obteniendo mayor calidad y calidad en la recuperación de ovocitos y posterior producción de embriones *in vitro* (Chaubal et al., 2006).

2.6 TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA (Ovum pick up, OPU)

La punción intravaginal guiada por ecografía permite la recuperación de ovocitos en hembras vivas, dejando de lado la laparoscopia por ser muy invasiva; esta técnica conjuntamente con la producción de embriones *in vitro* ayuda a producir mayor número de embriones por vaca donante, permite la recuperación de ovocitos durante dos meses hasta dos veces por semana. Además, es factible su utilización en vacas que no sobrepasen los tres meses de gestación, cabe destacar que en hembras que presentan mala respuesta a los tratamientos superovulatorios o problemas de infertilidad, la OPU permite obtener embriones lo cual es de gran importancia en la mejora genética (Hidalgo et al., 2002).

Existen algunos factores que afectan la OPU, entre las cuales influye la geometría de la aguja siendo más significativa de 7cm en lugar de la de 50cm, la misma que

debe de ser descartable y estéril, lo cual evita el riesgo de contaminación a su vez que minimiza el volumen muerto y el tiempo en el cual los ovocitos se exponen a un ambiente desfavorable; otros factores que influyen son: el animal donante en relación a la edad, la raza, el estado fisiológico y el momento del ciclo estral; la pre-estimulación hormonal con FSH ya que está demostrado el efecto positivo de la pre-estimulación con gonadotropinas seguida de la aspiración posterior a las 48 horas, ya que esta estimulación permite mayor obtención de embriones; la frecuencia con que se realiza la OPU también presenta influencia sobre la calidad y la cantidad de ovocitos puesto que cada 7 días permite mayor obtención en relación a cada 3 o 4 días, sin embargo, es necesario considerar que la calidad de ovocitos en relación al número de capas celulares del cúmulo es menor en intervalos de 7 días y mayor cada 3, igualmente la capacidad de desarrollo embrionario también se ha visto afectado; finalmente la experiencia del operador es un factor significativo en la recolección del número y la calidad de los ovocitos (Ruiz López, 2010).

La superestimulación hormonal se ha desarrollado con la finalidad de estimular los folículos y sus ovocitos para destinarlos a procesos reproductivos biotecnológicos, la mayor parte de los protocolos para la superestimulación incluyen el control exógeno de las ondas foliculares mediante las hormonas GnRH, FSH y eCG (Bó, Tríbulo, & Mapletoft, 2011)

La hormona FSH permite la obtención de mejores resultados en relación al número y calidad de ovocitos recuperados y folículos aspirados, además, esta hormona aumenta el porcentaje de desarrollo de blastocitos de 18 a 29% antes de la OPU, sin embargo, la FSH presenta un efecto desfavorable por sí sola puesto que un crecimiento acelerado de los folículos genera asincronía entre el folículo y su ovocito, por lo que reduce las tasas de desarrollo por lo que se han desarrollado protocolos combinados (Blondin & Sirard, 1995).

Estos protocolos de superovulación han permitido mejorar la técnica OPU, de tal manera que permite recuperar aproximadamente 15 ovocitos de gran calidad por cada donante, con una frecuencia de aspiración de una o dos veces a la semana (Ferre & Cattaneo, 2013). La superestimulación es la herramienta más utilizada con la finalidad de aumentar el número de folículos para la aspiración, pese a que tiene variaciones en sus protocolos es el momento indicado para la recuperación es el inicio de la onda (De Roover, Feugang, Bols, Genicot, & Hanzen, 2008).

Cabe mencionar que la frecuencia alta de aspiración folicular disminuye la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados (Ruiz López, 2010), por lo tanto Chaubal et al. (2006) indican que a intervalos de 3 o 4 días los ovocitos son de menor calidad para el desarrollo embrionario y que a un intervalo de 7 días o incluso algunos días más entre cada sesión de OPU permite el desarrollo del folículo dominante.

Para realizar la OPU es necesario tranquilizar al animal previamente con xilacina al 2% y procaína vía epidural con la finalidad de permitir la manipulación de los ovarios,

luego se debe vaciar el recto, desinfectar y limpiar el área perineal y la vulva, posteriormente se debe introducir el transductor en la vagina debidamente lubricado. Con la ayuda de un ecógrafo se puede visualizar los folículos ováricos y el mango de OPU donde será colocada la guía de punción, donde se introducirá la aguja desechable misma que estará conectada a un tubo estéril temperado a 37°C, adicionalmente, mediante una bomba de vacío accionada mediante un pedal se realizará aspiración constante (Ruiz López, 2010).

Figura 7. Aspiración folicular



Fuente: (Autor, 2020)

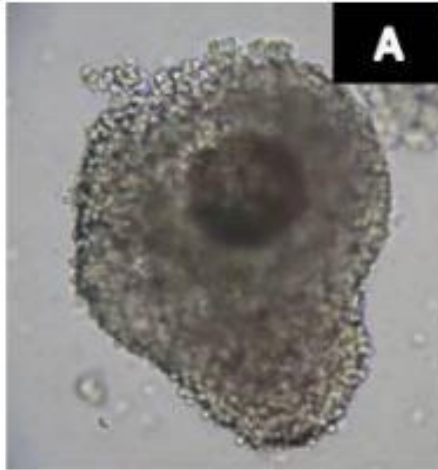
2.7 CALIDAD DE OVOCITOS

La evaluación de la calidad de los ovocitos se basa en la morfología visual, tomando en cuenta la homogeneidad del citoplasma, la integridad de la zona pelúcida y la cantidad de capas de las células del cumulus (Duma, Argudo, Ochoa, Alvarado, & Ayala Guanga, 2019).

Los criterios de selección de los ovocitos se dan de acuerdo a cuatro grados, así tenemos:

- **Grado A:** Ovocitos que presentan más de tres capas de células de cúmulo ooforo, citoplasma color uniforme sin presencia de pigmento (Alvarado Malca et al., 2016).

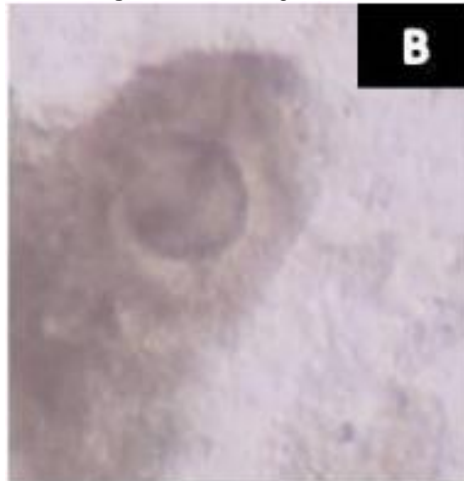
Figura 8. Ovocito grado A



Fuente: (Rodríguez Zamora, 2013).

- **Grado B:** ovocitos con 1-3 capas de células de cúmulo ooforo ya sean completas o incompletas, y, presencia de citoplasma uniforme (Alvarado Malca et al., 2016)

Figura 9. Ovocitos grado B



Fuente: (Rodríguez Zamora, 2013)

- **Grado C:** ovocitos sin células de cúmulo ooforo y el citoplasma se encuentra pigmentado (Alvarado Malca et al., 2016).

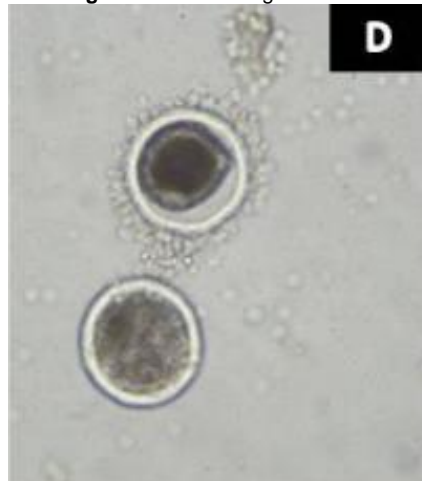
Figura 10. Ovocitos grado C



Fuente: (Rodríguez Zamora, 2013)

- **Grado D:** presenta ovocitos con células de cúmulo maduro fibrosado y su citoplasma es de color negruzco pigmentado (Alvarado Malca et al., 2016).

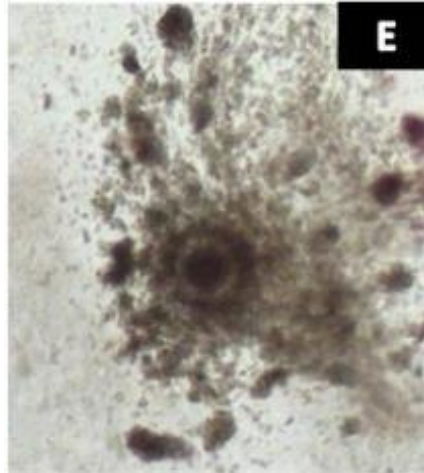
Figura 11. Ovocitos grado D



Fuente: (Rodríguez Zamora, 2013)

- **Grado E:** presenta ovocitos con cúmulo expandido (Rodríguez Zamora, 2013).

Figura 12. Ovocitos grado E



Fuente: (Rodríguez Zamora, 2013)

Uno de los factores que interviene en la calidad de los ovocitos en vacas Holstein de producción lechera es la baja fertilidad, ya que varios estudios señalan que la heredabilidad no está relacionada a la baja fertilidad, sin embargo, otros estudios demuestran que la baja fertilidad está asociada a causas nutricionales, balance energético negativo, pérdida de condición corporal, dietas con niveles altos de energía, urea y nitrógeno como efectos tóxicos y bajos niveles de vitaminas y minerales (Sartori, 2006).

Se debe considerar algunas estrategias que permitan mejorar la tasa de recuperación de ovocitos, como: mantener los niveles bajos de presión al vacío entre 36 a 49 mm. de Hg. ya que los niveles altos eleva la cantidad de ovocitos no viables; las concentraciones de heparina entre 4 a 5 UI/ml de 3 a 4 horas utilizada en el medio de recogida de los ovocitos evita la formación de coágulos que se presentan en los complejos cúmulos de los ovocitos; es necesario pre-estimular a nivel hormonal a las vacas donantes con la finalidad de elevar la cantidad de folículos y ovocitos aspirables; finalmente, en relación a los ovocitos aspirados deben tener un tamaño promedio de 2 mm de diámetro, puesto que ovocitos de menor tamaño no se desarrollan con normalidad (Alvarado Malca et al., 2016).

CAPITULO 3

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Ubicación de la zona de estudio

La Hacienda Joyagshi, está ubicada en el sector Joyagshi en la provincia de Chimborazo del Cantón Chunchi, se encuentra a 130 km de Riobamba, limita al sur con la Provincia de Cañar. Tiene una extensión de 279 km² de suelo irregular, una altitud entre los 1.600 y 4.300 msnm. El clima va desde el subtrópico hasta el frío de los páramos, con una temperatura promedio entre 14° C. y 21° C. Al norte oeste y este limita con el Cantón Alausí, y al sur con la Provincia del Cañar.

Figura 13. Área de estudio



Fuente: (Google Maps, 2020).

3.2 Universo, población y muestra

a) Universo de estudio.

24 Bovinos de raza Holstein, ubicados en la Hacienda Joyagshi, ubicada en el sector Joyagshi en la provincia de Chimborazo del Cantón Chunchi

b) Muestra.

Fase 1. Selección de los animales: Se seleccionará 12 vacas para el presente estudio atendiendo los criterios de inclusión y exclusión.

Fase 2. Inicio de la sincronización: se dividirá la muestra en dos grupos de 6 animales cada uno G1 y G2, posteriormente se realizará un cruzamiento de los tratamientos a los mismos sujetos experimentales.

3.3 Materiales

3.3.1 Biológicos

- Hembras bovinas
- Semen sexado

3.3.2 Equipos

- Ecógrafo
- Estereoscopio

3.3.3 Químicos

- Alcohol
- Azul de cresilo
- Tripan azul
- GnRH
- Benzoato de estradiol
- Progesterona
- Prostaglandina

3.3.4 Materiales de laboratorio

- Utensilios y vidriería de laboratorio
- Pipetas automáticas varios volúmenes
- Puntas para pipetas
- Implantes
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Lámparas de alcohol
- Aspersor (atomizador)
- Guantes
- Mandil
- Mascarillas

- Gorros
- Calculadora
- Cuaderno de apuntes
- Esferos, lápices

3.4 Procedimiento

- Se seleccionó las vacas para el presente estudio atendiendo los criterios de inclusión y exclusión, posteriormente se realizó un chequeo ginecológico por medio de ecografía con la finalidad de corroborar la ciclicidad.
- División de la muestra en dos grupos G1 y G2, con los cuales se trabajó a la par de la siguiente manera:
 - **Grupo 1.**
Día 0: Colocación del implante de 0.6 g. de progesterona vía intravaginal, 2 mg de BE y 500 µg de Cloprostenol vía intramuscular.
 - **Grupo 2.**
Día 0: Colocación del implante de 0.6 g. de progesterona vía intravaginal, 100mcg de GnRH y 500 µg de Cloprostenol vía intramuscular.
 - **Grupo 1 y 2.**
Día 5: Se procedió a retirar los implantes y se realizó la ecografía para evaluar la cantidad de folículos, tamaño de los folículos y la presencia del cuerpo lúteo, posteriormente se llevó a cabo a sesión de OPU de la siguiente manera:
Las vacas se inmovilizaron en un brete, se aplicó por vía epidural 0,3 mg/Kg de Lidocaína 2% (Roxicaina 2%). Con la finalidad de valorar los folículos ováricos se usó un ecógrafo Mindray, con un transductor sectorial de 5 MHz. Este transductor fue ensamblado en el soporte de la guía de punción equipado con una aguja desechable (1,2x75mm) la cual fue conectada a una bomba de vacío a una presión de 70mmHg de aspiración.
Posteriormente se introdujo vía vaginal y se realizó el conteo y la medida de los folículos y la presencia o ausencia de cuerpo lúteo. Para la aspiración se utilizó el medio Lactato de ringer con el 0,1% de polivinil alcohol y 50 mg por litro de gentamicina, suplementado con 50 UI/mL de heparina a 37°C, para la recolección de los ovocitos.
- Una vez obtenido el material aspirado se trasladó al laboratorio de inmediato mediante un tubo falcón de 50ml, su contenido se filtró con un filtro cellstrainer de 100 µm, posteriormente el material filtrado se colocó en una placa petri

cuadrículada de 95mm y con la ayuda de un estereoscopio de identificó y clasificó de acuerdo a su morfología a los ovocitos que fueron recuperados.

- Luego de clasificados y contabilizados se evaluó la actividad enzimática y la viabilidad de los ovocitos con la ayuda de la tinción Azul Brillante de Cresilo y Azul Tripán
- Luego de la aspiración las vacas descansaron por un lapso de 7 días y se comenzó una nueva repetición.
- Se reiniciaron los tratamientos hasta conseguir cuatro repeticiones, intercalando los grupos de animales en cada repetición en los dos tratamientos, en todos los tratamientos y repeticiones se procedió a realizar lo descrito anteriormente.

3.5 Diseño experimental y estadístico

Se aplicó un Diseño Experimental de Bloques Cruzados 2 X 2

Tabla N°2 Diseño de bloques cruzados

Repeticiones	BE	GnRH
1	G1 (6 vacas)	G2 (6 vacas)
2	G2 (6 vacas)	G1 (6 vacas)
3	G1 (6 vacas)	G2 (6 vacas)
4	G2 (6 vacas)	G1 (6 vacas)

3.6 Variables

3.6.1 Variable independiente

- Tratamiento

3.6.2 Variables dependientes

- Presencia de cuerpo lúteo (%)
- Folículos antrales (n)
- Tamaño de folículos (mm)
- Ovocitos recuperados (n)
- Tasa de recuperación (%)
- Ovocitos viables (%)
- Vitalidad (%)
- Competencia (%)

CAPITULO 4

RESULTADOS

Tabla N°1

Cantidad de folículos promedio contados por ovario y por vaca en los dos tratamientos usados

Tratamiento	N	Folículos		
		Ovario Derecho	Ovario Izquierdo	Totales
GnRH	24	5,63 ± 0,53	4,67 ± 0,55	10,29 ± 0,96
BE	24	4,88 ± 0,52	4,54 ± 0,49	9,42 ± 0,83
valor p		0,321	0,866	0,498

N: Vacas aspiradas. Los datos mostrados son la media ± error estándar de la media. La comparación de las medias fue realizada por un ADEVA.

En la tabla N°1 se puede observar la cantidad de folículos promedio contados por ovario y por vaca, en el ovario derecho se obtuvo 5,63 ± 0,53 y en el izquierdo 4,67 ± 0,55 para el tratamiento GnRH; con el tratamiento BE se obtuvo en el ovario derecho un promedio de 4,88 ± 0,52 y en el izquierdo de 4,54 ± 0,49; sin embargo, la diferencia no fue significativa $p > 0,05$.

Tabla N°2

Frecuencias de la presencia de cuerpo lúteo o folículo dominante en las donantes el momento de la OPU

Tratamientos	Cuerpo Lúteo		Folículo Dominante	
	N	%	N	%
GnRH	15/24	62,5%	5/24	20,8%
BE	9/24	37,5%	6/24	25,0%
valor p		0,074		0,500

La comparación de las proporciones entre tratamientos fue realizada por medio de la prueba de Chi cuadrado.

La tabla N°2 indica la presencia de cuerpo lúteo o folículo dominante en las vacas donantes al momento de realizar la OPU, se puede observar que con el uso de la GnRH se obtuvo mayor cantidad de cuerpos lúteos, a diferencia de vacas en las que se utilizó BE; se presenta diferencias numéricas pero no estadísticas ya que el valor $p > 0,05$; en cuanto al folículo dominante no se obtuvo cantidades ni diferencias significativas para los dos tratamientos.

Tabla N°3

Tamaño promedio (mm) de los folículos antrales, folículo dominante y cuerpo lúteo

Tratamiento	Folículos Antrales	Folículo Dominante	Cuerpo Lúteo
GnRH	4,75 ± 0,44	14,03 ± 1,17	18,56 ± 1,11
BE	3,44 ± 0,44	13,42 ± 0,71	23,89 ± 1,05
valor p	0,063	0,646	0,005

Los datos mostrados son la media ± error estándar de la media expresados en milímetros. La comparación de las medias fue realizada por un ADEVA. Se consideró diferencia estadística significativa cuando el valor $p < 0,05$.

En la tabla N°3 se puede observar el tamaño de los folículos antrales y dominantes relacionados a los tratamientos utilizados GnRH y BE, en donde existen diferencias aritméticas más no estadísticas, no así para el tamaño del cuerpo lúteo que el el tratamiento con BE presentaron mayor tamaño que con el tratamiento de GnRH, existiendo así una diferencia significativa ya que el valor de $p = 0,005$.

Tabla N°4

Promedio de ovocitos según su calidad calculada por sesión de OPU

Tratamiento	N (ovocitos)	%Calidad A	%Calidad B	%Calidad C
GnRH	24 (157)	54,35 ± 5,82	19,58 ± 4,24	30,15 ± 4,33
BE	24 (141)	60,06 ± 5,45	13,45 ± 2,10	26,49 ± 6,15
valor p		0,501	0,243	0,643

N: Vacas aspiradas (ovocitos totales recuperados). Los datos mostrados son la media ± error estándar. La comparación de las medias fue realizada por un ADEVA.

La tabla N°4 muestra que el promedio total de ovocitos obtenidos por sesión de OPU fue mayor con el tratamiento de GnRH que para BE, sin embargo, el porcentaje de ovocitos obtenidos de calidad A fueron mayores con el uso de BE, de calidad B y C el porcentaje fue mayor con el uso de GnRH, existiendo así diferencias numéricas pero no existen diferencias estadísticas significativas.

Tabla N°5

Promedio de la tasa de recuperación de ovocitos por sesión de OPU comparada entre tratamientos

Tratamiento	N	Total de ovocitos recuperados	Tasa de recuperación ovocitos	Ovocitos /OPU	Ovocitos viables /OPU
GnRH	247	157	64,82 ± 8,22	6,54 ± 1,63	4,83 ± 1,25
BE	226	141	63,61 ± 9,90	5,87 ± 1,50	4,25 ± 1,09
valor p			0,928	0,566	0,508

N: Folículos aspirados totales del experimento. Tasa de recuperación de ovocitos: ovocitos recuperados / folículos aspirados *100. Ovocitos viables: ovocitos de calidad A y B. Los datos mostrados son la media + error estándar. La comparación de las medias fue realizada por un ADEVA.

En la tabla N°5, se muestra el promedio de la tasa de recuperación de ovocitos por sesión de OPU, la misma que fue mayor con el tratamiento de GnRH que con BE, pese a existir una diferencia numérica, no existe diferencia significativa ya que el valor $p > 0,05$.

Tabla N°6

Integridad de los ovocitos medida por medio la tinción Tripán Blue y el estado de desarrollo medido por la prueba de Azul Brillante de Cresilo (BCB).

Tratamiento	Integridad		BCB +	
	N	%	N	%
GnRH	24/25	96,0	13/25	52,0
BE	17/18	94,4	8/27	29,6
valor p		0,668		0,087

La comparación de las proporciones entre tratamientos fue realizada por medio de la prueba de Chi cuadrado.

La tabla N°6 indica la integridad de los ovocitos para cada tipo de tratamiento, la misma que fue medida con la tinción Tripán Blue y fue del 96% para GnRH y del 94,4% para BE; adicionalmente muestra el estado de desarrollo de los ovocitos, el cual fue medido por la prueba de Azul brillante de cresilo, se puede observar que con el GnRH se obtuvo el 52% de integridad, mientras que con el BE alcanzó el 29,6%; en los dos casos existe diferencia aritmética, pero no existe diferencia estadística significativa.

Tabla N°7

Producción in vitro de embriones.

Variables	GnRH	BE	valor p
N	12	12	-
Ovocitos	58	42	-
% Clivaje	67,10 ± 1,70	70,15 ± 7,65	0,735
% Embriones	29,81 ± 6,80	41,67 ± 25,0	0,687
% Embriones Calidad 1	19,71 ± 7,21	25,00 ± 25,0	0,858
Embriones/OPU	0,92 ± 0,25	0,75 ± 0,75	0,850

N: Vacas aspiradas. El % de Clivaje, % de Embriones y % de Embriones Calidad 1 fueron calculados en base a los ovocitos inseminados. Los datos mostrados son la media ± error estándar. La comparación de las medias fue realizada por un ADEVA.

La cantidad de ovocitos obtenidos con GnRH fué de 58 y con BE fue de 42, el porcentaje de clivaje, porcentaje de embriones obtenidos y porcentaje de embriones de calidad 1 fue mayor con BE que con el uso de GnRH; y, los embriones /OPU fue mayor con GnRH que con el uso de BE, pese a existir una diferencia numérica en cada una de las variables medidas, no existe diferencia significativa ya que el valor $p > 0,05$ en todos los casos.

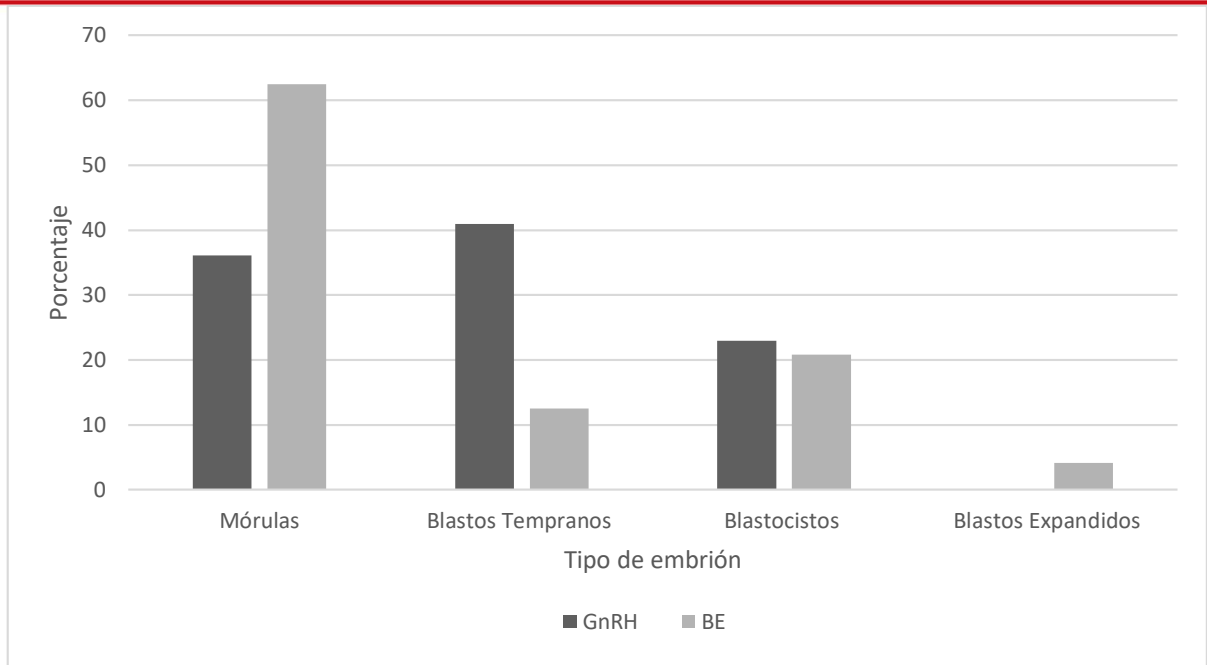


Figura 1. Proporción de embriones producidos según su estadio con cada tratamiento

La figura 1 indica el porcentaje de embriones producidos según su estadio y acorde a cada tratamiento, así tenemos los tipos de embriones: mórulas 36,11% con el GnRH y 62,5% con BE; blastos tempranos en un 40,97% para GnRH y 12,5% para BE; blastocistos en un 22,92% con GnRH y 20,84% con BE, finalmente, blastos expandidos 4,17% para BE, sin presentarse con GnRH. No hubo diferencia estadística en ningún caso.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Quispe et al. (2014), indica que obtuvo un mayor número de folículos de 2 a 4mm con el tratamiento de BE en comparación con el tratamiento GnRH, realizando la aspiración al día 4; sin encontrarse diferencias significativas en este estudio, así mismo, la presencia del cuerpo lúteo se encontró en el 14% con el uso de BE y el 28% con GnRH, estos resultados difieren de este estudio, ya que se obtuvo un mayor tamaño de folículos antrales y dominantes con el tratamiento GnRH que con BE; siendo nuestra aspiración en el día 5, de igual manera la presencia del cuerpo lúteo fue mayor con el uso de BE que con el uso de GnRH, ambos estudios no presentan diferencias significativas.

La calidad de los ovocitos se clasifica de acuerdo a categorías, para el presente estudio el porcentaje de ovocitos obtenidos de calidad A fueron mayores con el uso de BE, de calidad B y C el porcentaje fue mayor con el uso de GnRH, en un estudio realizado por López (2009), menciona que los ovocitos de calidad A, B y C son los más aptos para maduración, fecundación y producción de embriones, mientras que los de categoría D y E no se consideran viables; parámetro que se debe considerar para la obtención de ovocitos por OPU. Por otra parte, en un estudio realizado por Manjunatha *et al.* (2007), indican que la función luteal altera el desarrollo de los ovocitos ya que la presencia de cuerpo lúteo y la etapa fisiológica de este influye en la calidad y cantidad de ovocitos recuperados.

Según De Roover et al. (2008), los tratamientos de estimulación de la FSH aumenta el desarrollo de folículos ováricos múltiples en vacas Holstein lactantes y no lactantes. En un estudio desarrollado por Ogata, Hidaka, Matzushige, & Maeda (2015), informan que la estimulación con GnRH antes de la OPU mejoró significativamente la recuperación de ovocitos consecuentemente la eficiencia en la producción de embriones. Por otra parte, Hidaka, Fukumoto, Yamamoto, Ogata, & Horiuchi, (2018), reportan que para los estadios finales del crecimiento del folículo dominante la secreción de estradiol es importante, además, el desarrollo de la onda folicular es

manipulable con el tratamiento de benzoato de estradiol, con lo cual se sincroniza el desarrollo del folículo ovulatorio, acorde a lo mencionado por Burke, Day, Bunt, & Macmillan, (2000).

El presente trabajo muestra una obtención total de recuperación de 298 ovocitos de los cuales 157 se obtuvo de las vacas con tratamiento de GnRH y 141 de las tratadas con BE, en donde la tasa de recuperación fue de $64,82 \pm 8,22$ para GnRH y de $63,61 \pm 9,90$ para BE; número inferior al obtenido por Alvarado-Malca et al. (2016), que obtuvieron un total de 403 ovocitos, sin embargo, el número de aspiraciones en este estudio fue mayor al nuestro.

La evaluación de la calidad de ovocitos obtenidos se la realiza con la tinción azul brillante de cresilo (BCB), en un estudio realizado por Samaniego (2017), Al valorar los resultados obtenidos en la prueba azul brillante de Cresilo (BCB), determinó que obtuvo el 100% de los ovocitos de calidad A en los cuatro tratamientos, es decir, reaccionaron positivamente al BCB; lo cual no concuerda con el presente estudio, en donde obtuvimos con el GnRH el 52% de integridad, mientras que con el BE alcanzó el 29,6%

En un estudio reportado por Cavalieri *et al.*, (2018), indican que el protocolo hormonal para la sincronización de la emergencia folicular, aumenta el número y proporción de embriones, además de que permite que los folículos aspirados sean más homogéneos en cuanto al tamaño y la fase del desarrollo, obteniendo de esta manera ovocitos mas competentes, este estudio concuerda con nuestra investigación ya que obtuvimos una alta tasa de recuperación de ovocitos de $64,82 \pm 8,22$ para GnRH y $63,61 \pm 9,90$ con Benzoato de estradiol

La calidad embrionaria evaluada de acuerdo a un estudio reportado por Velez *et al.*, (2017), el conteo de blastocitos obtenidos de COC tipo I y tipo II a los 7 días de cultivo no presentó diferencia significativa en los tratamientos evaluados, esto concuerda con el presente estudio en donde el porcentaje de blastocitos obtenidos fue de 22,92% con GnRH y 20,84% con BE, lo cual no representa diferencia estadística.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo, podemos concluir:

- Los métodos de sincronización de la emergencia folicular evaluados GnRH y Benzoato de estradiol no presenten diferencia significativa previo a la punción folicular (OPU), por cuanto pudimos sincronizar de manera eficiente las vacas Holstein en producción con los dos métodos.
- Se logró medir la capacidad de GnRH y Benzoato de estradiol para sincronizar la emergencia folicular, las cuales no presentan diferencia, por lo que se puede utilizar cualquiera de los dos tratamientos para la sincronización.
- Existe una tendencia estadística en relación al tamaño de los folículos, siendo estos más grandes los obtenidos con el tratamiento de GnRH presentando en los antrales una diferencia de tamaño promedio de 1.31 mm para los antrales.

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de GnRH o Benzoato de estradiol como métodos de sincronización folicular ya que con los dos se obtuvo un buen porcentaje de ovocitos tras la aspiración folicular.
- Es importante que se el estudio se realice con otros métodos de sincronización para evaluar la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos por OPU.
- Como trabajo continuo se puede recomendar realizar estudios enfocados en la evaluación de la tasa de concepción en embriones producidos por aspiración folicular con cada tratamiento.
- Es factible que el presente estudio se pueda realizar en vacas de producción de carne para poder realizar un estudio comparativo con los datos obtenidos.
- Se puede recomendar el uso de la GnRH como reemplazo al tratamiento de sincronización con Benzoato de estradiol (BE), ya que el BE está prohibido su uso en algunos países.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Agromeat. (2001). Inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos. *Revista Veterinaria Argentina*, 1, 1–11.
- Alvarado Malca, A. E., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillán, V. (2016). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Anales Científicos*, 77(1), 63–68. <https://doi.org/10.21704/ac.v77i1.545>
- Alvares, P., Rafagnin, L., Oliveira, C., Marcondes, M., & Bizarro, C. (2014). UTILIZACIÓN DE EMBRIONES COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DEL GANADO LECHERO. *Spermova*, 4(2), 131–138. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/283616630>
- Aréchiga-Flores, C., Cortés-Vidauri, Z., Hernández-Briano, P., Flores-Flores, G., Rochín-Berumen, F., & Ruiz-Fernández, E. (2019). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico Veterinario*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Astiz, S., Romero-Aguirregomez, J., Poto, A., & Ruiz, S. (2012). Producción de embriones in vitro en el bovino: descripción de la técnica y ejemplos de su aplicación en España. *Frisona Española*, (188), 88–92.
- Atuesta, J. E., & Gonella, A. (2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Spei Domus*, 7(14), 15–25.
- Blondin, P., & Sirard, M. -A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1), 54–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Bó, G. A., Pelizzari, M., Bernal, B., Tribulo, A., Ongarato, F., Rodriguez, P., ... Mapletoft, R. (2014). *Actualidades de las técnicas de superovulación y transferencia de embriones*. (1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bó, G. A., Tríbulo, A., & Mapletoft, R. J. (2011). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Spermova*, 1(1), 26–33.
- Burke, C. R., Day, M. L., Bunt, C. R., & Macmillan, K. L. (2000). Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *Journal of Animal Science*, 78(1), 145–151. <https://doi.org/10.2527/2000.781145x>
- Cavaliere, F. L. B., Morotti, F., Seneda, M. M., Colombo, A. H. B., Andreazzi, M. A., Emanuelli, I. P., & Rigolon, L. P. (2018). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up.

- Theriogenology*, 117, 57–60.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>
- Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E. J., ... Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65(8), 1631–1648.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
- Colazo, M., & Mapletoft, R. (2014). Fisiología del ciclo estral Bovino. *Revista Ciencias Veterinarias*, 16(2), 31–46. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/262106069_Fisiologia_del_ciclo_estrал_bovino
- Colazo, M G, Mapletoft, R. J., Martinez, M. F., & Kastelic, J. P. (2007). El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas. *Ciencia Veterinaria*.
<https://doi.org/http://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1886/1848>
- Colazo, Marcos Germán, & Mapletoft, R. J. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9(1), 20–37. Retrieved from <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>
- Córdova, A., & Pérez, J. (2005). Relación Reproducción-Producción en vacas Holstein. *REDVET*, VI(2), 1–5. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020205.html>
- Córdova, A., Sánchez, Y., Leal, A., Muñoz, C., & Murillo., A. (2002). Causas de infertilidad en ganado bovino. *Med Vet*, 19(9), 112–124.
- De Roover, R., Feugang, J. M. N., Bols, P. E. J., Genicot, G., & Hanzen, C. (2008). Effects of ovum pick-up frequency and fsh stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
- Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211–1239. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4)
- Duma, J. ., Argudo, D., Ochoa, R., Alvarado, J., & Ayala Guanga, L. (2019). Uso del Azul Brillante de Cresilo en la selección de ovocitos competentes para la producción in vitro de embriones. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 4(1), 75–84. <https://doi.org/.1037//0033-2909.l26.1.78>
- Fernandez, A., Diaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de embriones bovinos. *Rev. Fac. Cs. Vets.*, 48(1), 51–60.
- Ferre, L., & Cattaneo, L. (2013). Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado. (¿La pareja perfecta?). *Rev. Med. Vet.*, 94(2), 28–36.

- Flores, S., Muñoz, L., Reyes, O., Aréchiga, C., Mapes, G., & Hernandez, J. (2015). Gestación en vacas lecheras con dos protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(4), 393–404. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v6i4.4100>
- Fouz, R., Yus, E., Sanjuán, M. L., & Diéguez, F. J. (2014). Causas de eliminación en rebaños bovinos lecheros de raza frisona en Control Lechero Oficial. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 110(2), 171–186. <https://doi.org/10.12706/itea.2014.011>
- Galvis R., R., Múnera, E., & Marín, A. (2005). Relación entre el mérito genético para la producción de leche y el desempeño metabólico y reproductivo en la vaca de alta producción. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(3), 228–239.
- Gómez, R. G. (2008). Capítulo 10. Reproducción bovina. In *Enciclopedia bovina* (pp. 389–414). Retrieved from <http://es.scribd.com/doc/55407879/Enciclopedia-Bovina-UNAM>
- Google Maps. (2020). Google Maps. Retrieved from <https://www.google.es/maps/@-2.3742758,-78.9687991,994m/data=!3m1!1e3>
- Gutiérrez-Añez, J. C., Palomares-Naveda, R., Sandoval-Martínez, J., De Ondíz-Sánchez, A., Portillo-Martínez, G., & Soto-Belloso, E. (2005). Uso del protocolo Ovsynch en el control del anestro postparto en vacas mestizas de doble propósito. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 15(1), 7–13.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (McGraw-Hill, Ed.). Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/150197543/HAFEZ-REPRODUCCION-E-INSEMINACION-ARTIFICIAL-pdf>
- Hernández Cerón, J. (2016). Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros. In *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros* (Primera). <https://doi.org/10.22201/fmvz.9786070286902e.2016>
- Hidaka, T., Fukumoto, Y., Yamamoto, Y., Ogata, Y., & Horiuchi, T. (2018). Estradiol benzoate treatment before ovum pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese Black cattle. *Veterinary and Animal Science*, 5(February), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.02.001>
- Hidalgo, C. O., Fernández, I., Duque, P., Facal, N., Díaz, E., Prendes, J. M., ... Díez, C. (2002). Primeros Terneros Producidos in Vitro Tras Punción Ecoguiada De Folículos Ováricos First Calves Obtained By Ovum Pick-Up Aided By Ultrasound and in Vitro Fertilization. *Arch. Zootec*, 51, 411–422. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/495/49519601.pdf>
- Huanca, W. (2001). Inseminación artificial a tiempo Fijo En Vacas Lecheras. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 12(2), 161–163.
- López, S. R. (2009). Ovum Pick Up (OPU) en bovinos : Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. *CYSB*, (31), 58–63.

- Lozano, M. C., & Arias, D. C. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 121–135. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023520012>
- Manjunatha, B. M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Devaraj, M., Ramesh, H. S., & Nandi, S. (2007). In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 68(6), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.07.001>
- Marcondes Seneda, M., Fonseca Zangirolamo, A., Zamparone, L., & Morotti, F. (2020). Follicular wave synchronization prior to Ovum Pick-Up. *Theriogenology*, 142, 1–250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.024>
- Martinez, D. (2008). Situación Actual De La Transferencia Embrionaria. Revisión Y Actualización. *Frisona Española*, 164, 74–80. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2585227>
- Matamoros, R., & Salinas, P. (2017). *Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos*.
- Motta, P., Ramos, N., González, C., & Rojas, E. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Veterinaria y Zootecnia*, 5(2), 88–99.
- Ogata, Y., Hidaka, T., Matzushige, T., & Maeda, T. (2015). Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2(1), 16–23. <https://doi.org/10.9734/jabb/2015/13028>
- Orrego A, J., Delgado C, A., & Echevarría C, L. (1999). Vida productiva y principales causas de descarte de Vacas Holstein en la Cuenca de Lima. In *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* (Vol. 14). Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172003000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Palma, G. A. (2008). *BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN CIENCIA , TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD*.
- Pérez, A. (2019). *Efecto de dos protocolos de sincronización sobre la tasa de aprovechamiento, en receptoras en el sureste de México*.
- Pesantez, J., & Supliguicha, J. (2019). *Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vacas Holstein Mestiza en fase luteal*.
- Prieto, P., Stahringer, R., & Vispo, P. (2016). Estudio de alternativas para mejorar los porcentajes de preñez en protocolos de IATF en bovinos. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 1, 1–8. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_estudio_de_alternativas_para_mejorar_los_porcentajes_de_prenez_en_protocolos_de_iatf_en_bovinos.pdf
- Quispe, C., Mercado, J., Fernández, E., Mixan, E., Gamarra, S., & Mellisho, E. (2014). Efecto de tratamientos con benzoato de estradiol ó GnRH sobre la dinamica

folicular para aspiración de folículos (Ovum pick up) guiada por ultrasonido en vacas lecheras. *Spermova*, 4(1), 86–88.

- Rangel, L. (2009). Morfofisiología del Aparato Reproductor. In *Manual de Prácticas de Reproducción Animal* (pp. 7–30). Retrieved from <http://www.ghbook.ir/index.php?name=مجموعه مقالات هم دومین اندیشی هم رسانه سراسری اندیشی هم دومین مقالات مجموعه> و تلویزیون و http://www.ghbook.ir/index.php?option=com_dbook&task=readonline&book_id=13629&page=108&chkhk=03C706812F&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Rippe, C. (2009). El Ciclo Estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, 111–116.
- Rodríguez Zamora, L. A. (2013). Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro. *Universidad de Santiago de Compostela*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10347/9213>
- Romero, J., & Galarza, L. (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* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32174/1/TRABAJO-DE-TITULACION.pdf>
- Ruiz López, S. (2010). Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la Reproducción (PDF Download Available). Retrieved from Enero 2010 website: https://www.researchgate.net/publication/260359949_Ovum_Pick_Up_OPu_en_bovinos_Aplicaciones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion
- Ruiz, S., Zaraza, J., De Ondiz, A., & Rath, D. (2018). *Rendimiento de la OPU en vacas secas no estimuladas para el uso de ovocitos en la producción in vitro de embriones*. (January 2009), 34–37.
- Samaniego, J. X. (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.” Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo de Titulación.pdf>
- Sartori, R. (2006). Mortalidad embrionaria en bovinos lecheros. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología*, 1–6.
- Shearer, J. K. (2003). Reproductive Anatomy and Physiology of Dairy Cattle. *Animal Science*, (September 1992), 1–4.
- Solís Corrales, 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 Electronica de Veterinaria*.
- Soria Parra, M., Soria Parra, C., Argudo Garzón, D., Serpa García, G., Méndez Álvarez, S., Torres Inga, C., & Guevara Viera, G. (2017). Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Revista de Producción Animal*, 29(1), 40–43.

- Vásquez, J., & Olivera, M. (2010). Señalización Celular en el Folículo Antral Bovino. *Orinoquia*, 14(2), 178–187. <https://doi.org/10.22579/20112629.80>
- Vázquez Borja, S. (2017). Evaluación del método de transferencia embrionaria en novillas y vacas receptoras en una hacienda de producción bovina.
- Velez, I. C., Chica, A., Urrego, R., Torres, V., Jimenez-Escobar, C., & Zambrano-Varon, J. (2017). Producción in vitro de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 12(2), 76–87. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.1>
- Viana, J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter-IETS*, 36(4), 1–26.
- Zambrano, J. C., Rincón, J. C., & Echeverri, J. J. (2014). Parámetros genéticos para caracteres productivos y reproductivos en Holstein y Jersey Colombiano. *Archivos de Zootecnia*, 63(243), 495–506. <https://doi.org/10.21071/az.v63i243.529>
- Zambrano Neira, D., & Neira Sanchez, P. (2020). Actualidad en Ginecología y Obstetricia en Bovinos.

9. ANEXOS

Ilustración 1. Selección de vacas donadoras



Ilustración 2. Sincronización folicular



Ilustración 3. Aspiración folicular



Ilustración 4. Filtrado de los ovocitos

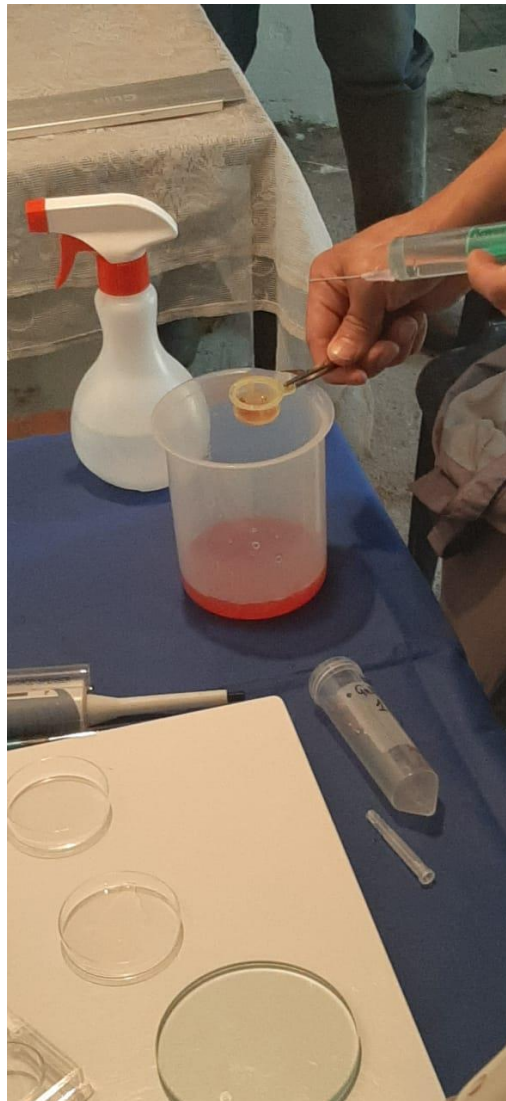


Ilustración 5. Folículos vistos mediante Eco



Ilustración 6. Ovocitos recuperados

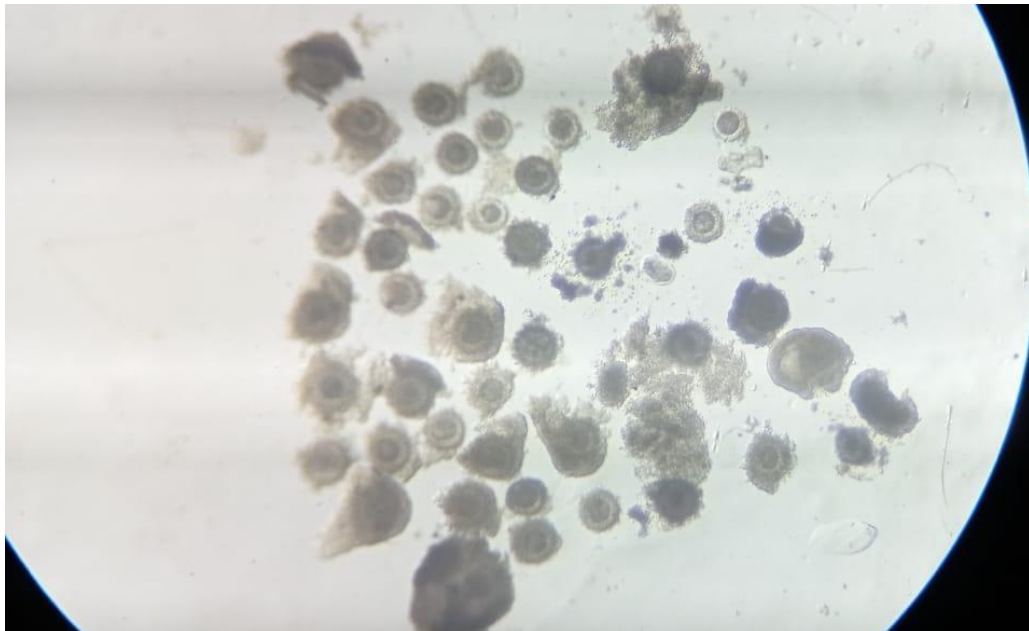


Ilustración 7. Clasificación de ovocitos



Ilustración 8. Tinción azul tripan

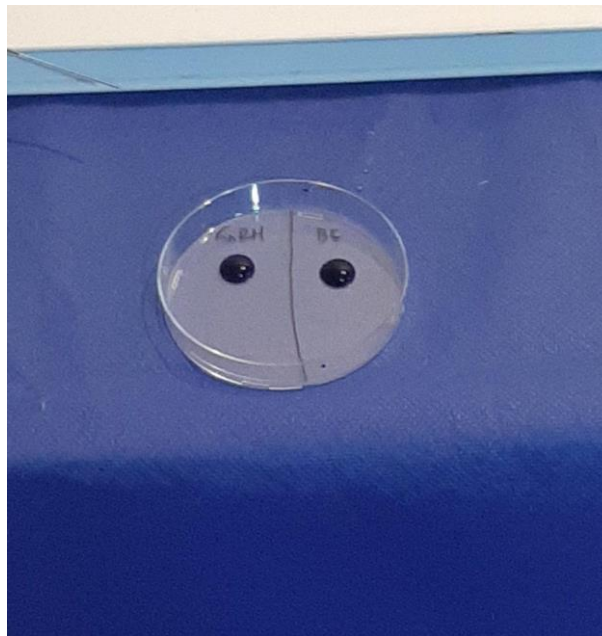


Ilustración 9. Tinción Brillante de cresilo

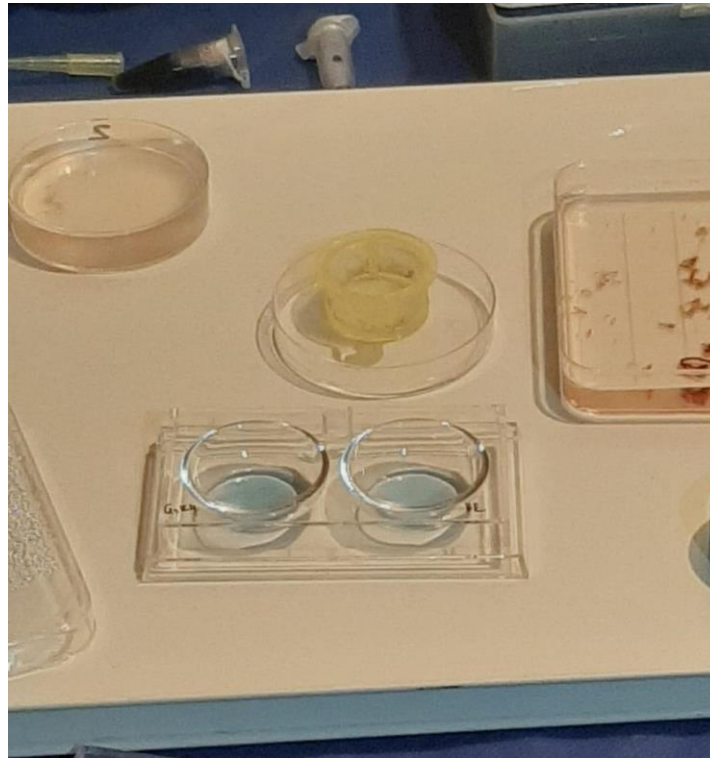


Ilustración 10. Observación al microscopio con la tinción Azul Brillante de Cresilo

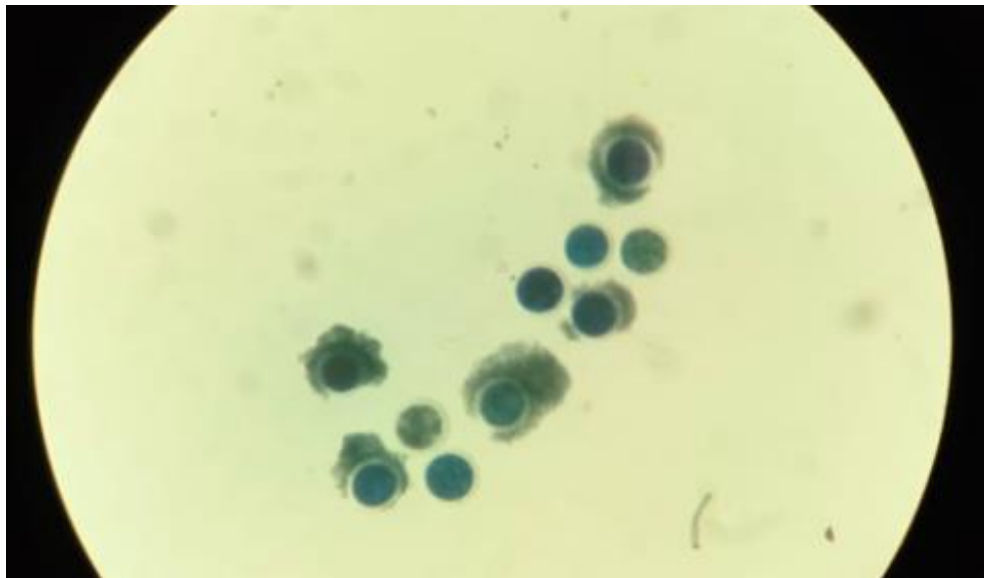


Ilustración 11. Maduración In Vitro

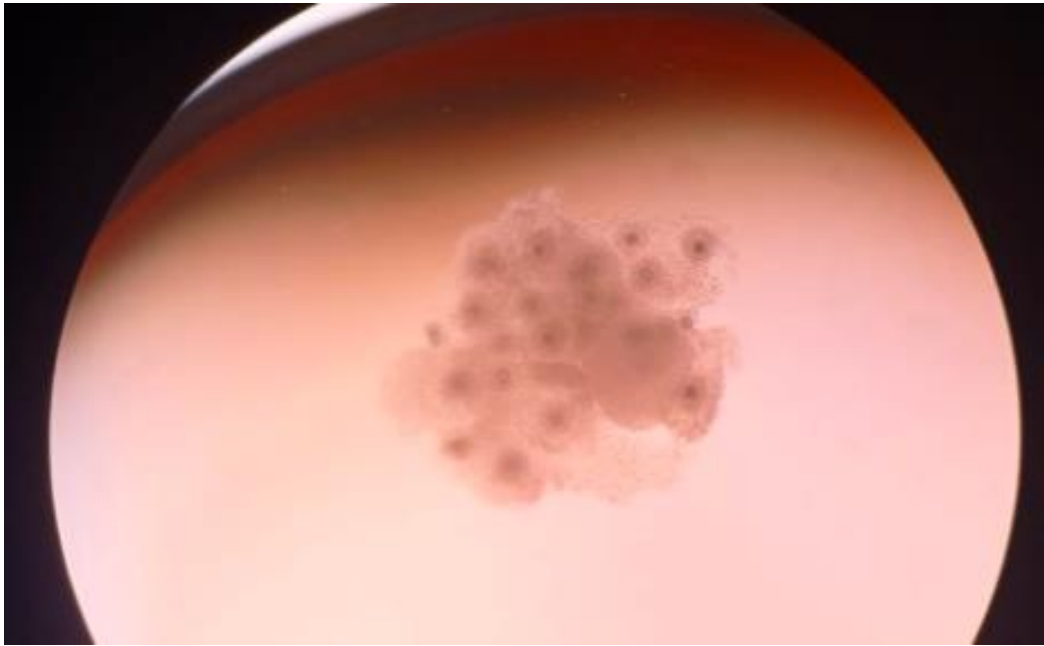


Ilustración 12. Embriones producidos

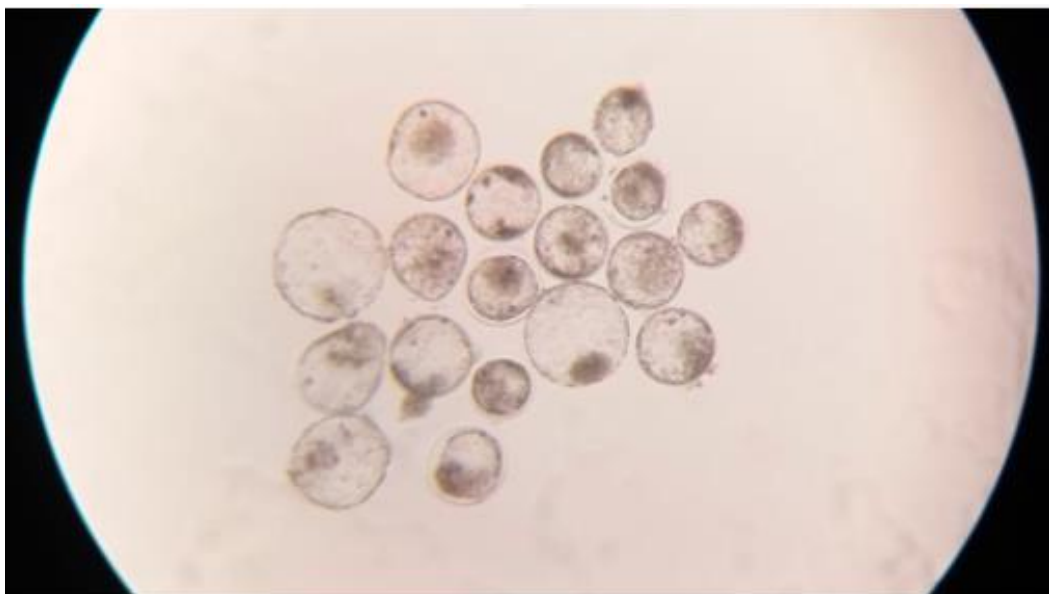
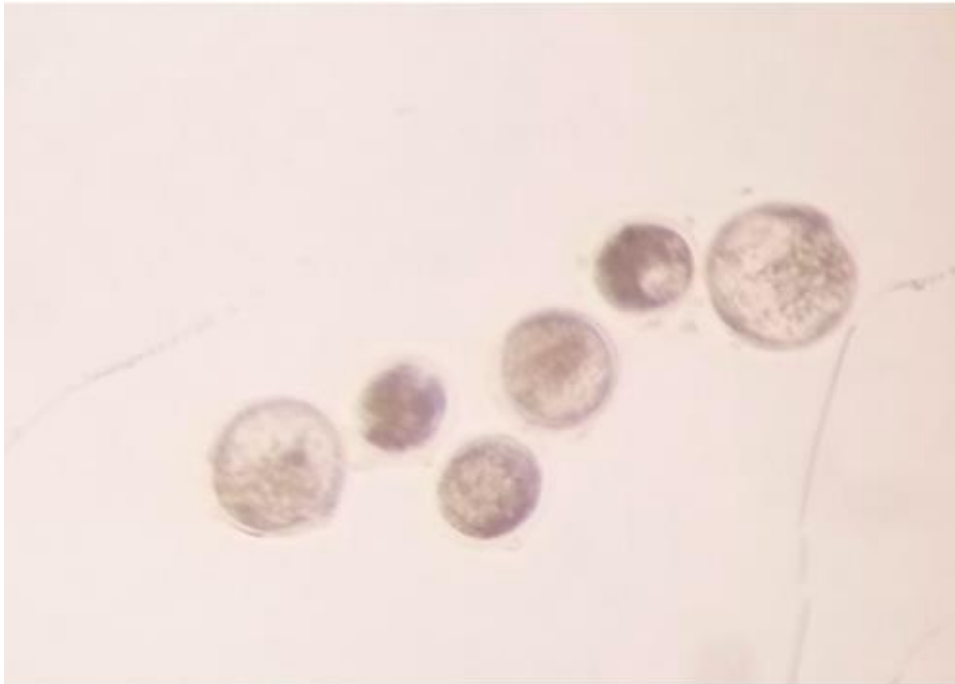


Ilustración 13. Observación de embriones producidos



PERMISO DEL AUTOR DE TESIS PARA SUBIR AL REPOSITORIO
INSTITUCIONAL

Yo, Dorian Fernando Idrovo Calle; en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**SINCRONIZACIÓN DE LA EMERGENCIA PARA LA PUNCIÓN FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN EN PRODUCCIÓN**”, de conformidad a lo establecido en el artículo 114 de 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, así mismo; autorizo a la Universidad para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de abril de 2021.



F. _____

0104608104