



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO DE VACAS

HOLSTEIN ESTIMULADAS CON FSH-RB

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN

DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

AUTOR: LUIS NELSON ÑAMAGUA LALA

DIRECTOR: DR. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MGS.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO DE VACAS
HOLSTEIN ESTIMULADAS CON FSH-RB**

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

AUTOR: LUIS NELSON IÑAMAGUA LALA

DIRECTOR: DR. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MGS.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



DECLARATORIA

Yo, **Luis Nelson Iñamagua Lala** portador de la cédula de ciudadanía N.º **0302174289**. Declaro ser el autor de la obra: **“Producción de embriones in vitro de vacas Holstein estimuladas con FSH-rb”**, 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, **21 de junio de 2024**

F:

Luis Nelson Iñamagua Lala

C.I. 0302174289



CERTIFICACIÓN

Yo **Daniel Ernesto Argudo Garzón**, en calidad de director del Trabajo de Titulación con el tema “**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO DE VACAS HOLSTEIN ESTIMULADAS CON FSH-RB**”, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el señor **LUIS NELSON ÑAMAGUA LALA** bajo mi supervisión.

**Daniel
Argudo
Garzón** Firmado
digitalmente por
Daniel Argudo
Garzón
Fecha: 2024.06.21
17:45:48 -05'00'

Dr. Daniel Ernesto Argudo Garzón MGS.
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi más profundo agradecimiento a Dios, quien me ha dado la fuerza, la sabiduría y la perseverancia para completar este trabajo de investigación. Su guía constante y su amor incondicional han sido la luz que ha iluminado mi camino en los momentos de duda, dificultad e incertidumbre.

También quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. Daniel Argudo, por su dedicación y orientación experta a lo largo de este proceso. Su apoyo y sabios consejos han sido fundamentales para llevar este proyecto a buen término.

Agradezco de manera sincera a mi familia, primordialmente a mi hija Mishel Iñamagua, por ser mi fuente constante de motivación y amor incondicional. Su paciencia y comprensión durante este tiempo han sido mi mayor fortaleza.

Quiero reconocer también el apoyo inquebrantable de mis amigos y seres queridos, en especial de mi pareja, cuyo aliento ha sido un bálsamo para mi alma en los momentos de duda y desafío.

A todos los que han contribuido de alguna manera a este logro, ya sea con sus palabras de ánimo, su apoyo práctico o su presencia constante, les estoy profundamente agradecido.

Que este trabajo sea un tributo a la fe, la dedicación y el amor que he recibido de Dios, mi pareja y mi amada familia.

Luis Nelson Iñamagua Lala

ÍNDICE

DECLARATORIA.....	III
CERTIFICACIÓN.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	11
3.1 Evaluación morfológica de ovocitos.....	11
3.1.1 Método de selección ovocitaria.	11
3.2 Competencia desarrollada por el ovocito	12
3.3 Maduración de los ovocitos	12
3.4 Fertilización in vitro (FIV)	13
3.5 Proceso de Fertilización in vitro	13
3.6 Preparación de los espermatozoides	14
3.7 Cultivo in Vitro.....	14
3.8 Evaluación morfológica de los embriones	15
3.8.1 Evaluación de la calidad de embriones:	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Área de estudio	18
4.2 Universo de estudio	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27
AUTORIZACIÓN.....	33

RESUMEN

El uso de FSH convencional en la hiperestimulación folicular ha generado preocupaciones debido a sus efectos en la expresión génica y la calidad embrionaria. Además, se ha observado una variabilidad considerable en la respuesta de las vacas hiperestimuladas, lo que afecta la eficacia del proceso. La FSH-p de origen porcino, comúnmente utilizada en estos protocolos, puede inducir respuestas inmunitarias en el ganado bovino, lo que aumenta el riesgo de patologías y afecta la calidad de los embriones resultantes. En contraste, la FSH-rb, derivada de tecnología recombinante, ha demostrado ser una alternativa prometedora para mejorar la producción de embriones in vitro y su calidad en vacas Holstein. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de la FSH-rb en la producción de embriones in vitro en vacas Holstein. Donde los resultados obtenidos indican que la FSH-rb no aumentó significativamente la producción de ovocitos viables según la tabla de clasificación establecida por la IETS. Por otra parte, durante el desarrollo embrionario se valoró la etapa de segmentación, variable porcentual medida como tasa de clivaje, donde es claro notar cierta diferencia numérica en el grupo tratado con FSH recombinante bovina (74,38) en comparación con el control (68,4), pero sin duda tal diferencia no es estadísticamente significativa ($P < 0,05$), obteniendo de la misma manera resultados estadísticos similares en cuanto al número de embriones obtenidos tras finalizar la presente investigación.

Palabras clave.

Producción; embriones; FSH-rb; cultivo; In vitro.

ABSTRACT

The conventional use of FSH (follicle-stimulating hormone) in follicular hyperstimulation has raised concerns due to its effects on gene expression and embryo quality. In addition, considerable variability in the response of hyperstimulated cows has been observed, affecting the efficacy of the process. Follicle Stimulating Hormone - pituitary (FSH-p) of porcine origin, commonly used in these protocols, can induce immune responses in cattle, increasing the risk of pathologies and affecting the quality of the resulting embryos. In contrast, recombinant bovine Follicle Stimulating Hormone (rbFSH), derived from recombinant technology, is a promising alternative to improve in vitro embryo production and quality in Holstein cows. This research aimed to thoroughly evaluate the effects of rbFSH on in vitro embryo production in Holstein cows. The results indicate that rbFSH did not significantly increase the production of viable oocytes according to the classification table established by the International Embryo Technology Society (IETS). On the other hand, during embryo development, the stage of segmentation was evaluated, a percentage variable measured as cleavage rate, where it is clear to note a specific numerical difference in the group treated with bovine recombinant FSH (74.38) compared to the control (68.4), but this difference was not statistically significant ($P < 0.05$), obtaining similar statistical results in terms of the number of embryos obtained at the end of this study.

Keywords.

Production; embryos; rbFSH; culture; In vitro.

INTRODUCCIÓN

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales; en la actualidad vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Ma et al., 2019).

La producción de embriones in vitro ha permitido alcanzar objetivos genéticos de alta calidad, esto gracias a la utilización de biotecnologías reproductivas, que permiten obtener ovocitos viables para su fecundación, siendo entre estas alternativas la estimulación a través de un sin número de protocolos hormonales para aumentar la población folicular y por ende el número de ovocitos que posteriormente serán cultivados en laboratorio (Álvarez et al., 2022).

El uso de la FSH convencional utilizada en diferentes protocolos de hiperestimulación folicular, genera múltiples variaciones en la expresión génica asociándose comúnmente con una disminución de la competencia embrionaria y la calidad neta del embrión resultante (Barros et al., 2012). Sin embargo, el principal problema dentro de los trabajos que conlleva la superovulación, se da en sí en las donantes hiperestimuladas con FSH convencional ya que el 15-20 por ciento de todo el universo de estudio no lograron producir embriones implantables, lo que da como resultado una gran variabilidad individual en la respuesta de cada animal (Gallegos et al., 2022).

Además, al ser la FSH-p de origen porcino, esta hormona puede inducir una respuesta inmune humoral cuando se administra en otras especies, como el ganado bovino, causando en sí a ser más propensos a ciertas patologías o toxinas secretadas por organismos externos por lo que es necesario practicar otras alternativas en cuanto se trata a la estimulación folicular (Pellicer., 2015). La aplicación de la hormona FSH-rb genera mayor producción de embriones in vitro y mejora la calidad de los mismos en vacas Holstein.

Si bien es cierto la efectividad que presenta la hormona estimulante del folículo bovino de acción media (FSH-b) quien está bien establecida para los protocolos de superovulación (SOV) en el ganado bovino, el uso de la hormona (FSH-rb) presenta ventajas sobresalientes en cuanto a la aplicación de las nuevas biotecnologías garantizando la viabilidad y sobre todo la sostenibilidad en cuanto a la producción de

embriones dentro de un hato ganadero, mimos que han sido evaluados en cada una de las etapas superadas (Gutiérrez et al., 2022).

Por lo que, como objetivo general de la presente investigación se evaluó y cuantificó la producción de embriones in vitro de vacas Holstein estimuladas con FSH recombinante bovina, con el fin de mejorar la eficiencia y la calidad de la reproducción bovina mediante técnicas de reproducción asistida.

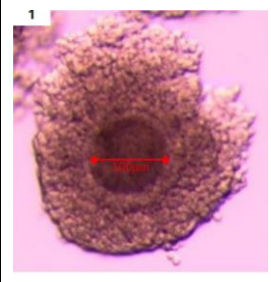
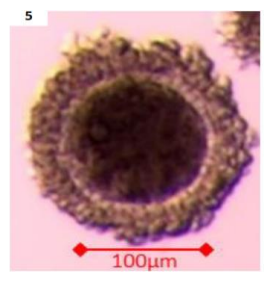
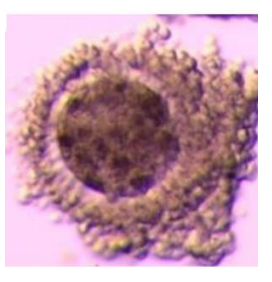
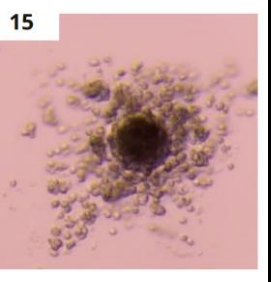
3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Evaluación morfológica de ovocitos

Los ovocitos inmaduros de mamíferos residen dentro de los folículos rodeados por una cúmulo de células somáticas y se mantienen en un estado meiótico inactivo; esta condición se evidencia por la presencia de núcleos sobresalientes llamados vesículas germinales; tal estado de reposo se conserva hasta que se produce una oleada de gonadotropinas antes de la ovulación, lo que desencadena el inicio de la maduración nuclear del ovocito, mientras que la masa celular circundante se vuelve viscosa y se expande (Sirait et al., 2021).

La calidad de los óvulos se refiere a su habilidad para generar un blastocisto en un entorno de producción in vitro. Las investigaciones muestran que la calidad de los ovocitos determina el potencial de desarrollo hasta la etapa de blastocisto y esto está relacionado con el cuerpo donante y el crecimiento, el tamaño del folículo, la proliferación y la integridad de los ovocitos (Quishpe et al., 2018).

Tabla 1: Clasificación de los ovocitos según su morfología

Clasificación de los ovocitos			
			
Ovocito grado 1	Ovocito grado 2	Ovocito grado 3	Ovocito grado 4

Fuente: (Demetrio & Barfiel, 2021).

3.1.1 Método de selección ovocitaria.

La primera forma elemental de distinguir los ovocitos competentes de los incompetentes es la morfología del cúmulo, donde estas células son un subconjunto de las células de la granulosa con diferentes funcionalidades; su actividad principal es nutrir al oocito durante su desarrollo, participar en la formación de la región y continuar el pico de LH, para

limitar la matriz proteica y los componentes del ácido hialurónico que son importantes en el transporte del oviducto (Vélez, 2018).

Varias investigaciones han examinado los efectos de la morfología del cúmulo en el desarrollo posterior del mismo; al clasificar los oocitos inmaduros por el número de capas de cúmulo que quedan alrededor del ovocito después de la aspiración folicular, cuanto más delgado es el cúmulo, mayor es el potencial de desarrollo; la disminución en el número de capas podría deberse al tipo de aspiración aplicado en los oocitos o causa de la pérdida de la capa externa producido por la atresia, por lo tanto, los grupos dispersos pueden ser un rasgo asociado con el desarrollo competitivo (Wrenzycki, 2021).

3.2 Competencia desarrollada por el ovocito

El compendio de ovocitos con mayor potencial deriva de folículos menos compactos, sanos o levemente atrésicos, que generalmente presentan ciertas características foliculares, como la morfología del ovocito y la competencia desarrollada; la distinción de ovocitos generalmente se basa en tres criterios: diámetro del ovocito, apariencia del citoplasma y particularidad del cúmulo que rodea al ovocito, siendo el diámetro del ovocito quien determinará su capacidad de maduración (Ozturk, 2020).

Los óvulos inmaduros producen diversas proteínas mientras crecen, incluida la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), que se produce durante la mitad de la primera fase de crecimiento (S) y disminuye a medida que el óvulo completa su crecimiento. Por lo tanto, la tinción con azul brillante de cresilo (BCB) permite seleccionar de manera no invasiva y no perturbadora a los complejos de óvulos y células de la granulosa (COC) más uniformes y competentes para la fertilización in vitro (PIV); esto se debe a que la tinción permite medir la actividad de la enzima G6PDH, identificando como óvulos desarrollados aquellos que retienen la tinción y como incoloros aquellos que están en proceso de crecimiento (Ayala et al, 2018).

3.3 Maduración de los ovocitos

Los escenarios de cultivo durante la maduración in vitro juegan un papel importante en la fecundación y la posterior supervivencia del embrión. (Vásquez et al., 2014). Anteriormente, se han utilizado medios tamponados complejos, suplementados con albúmina, suero y hormonas (FSH, LH, 17 estradiol) para la maduración de oocitos bovinos; no obstante, los oocitos bovinos reinician la meiosis en una variedad de medios,

desde solución salina simple hasta medios más complejos. Sin embargo, se opta por este último, ya que se ha descubierto que el medio utilizado afecta no solo la fertilidad posterior sino también el desarrollo futuro del embrión (Espin Vargas, 2018).

Un protocolo de maduración utilizado en muchos laboratorios implica el uso de TCM-199 a 38,5 °C complementado con suero fetal bovino al 10 % y gonadotropinas, adicionalmente más el dióxido de carbono atmosférico al 5 %; después de 24 horas de maduración, los ovocitos están completamente desarrollados, pues durante su maduración aparece el primer cuerpo polar y las prepara para la fecundación (Spacek & Carnevale, 2018).

Por otro lado para que se produzca la maduración meiótica del óvulo la adenohipófisis debe secretar LH quién es crucial para que se dé tal maduración, el efecto de la LH sobre sus células diana está relacionado con la acción de receptores específicos sobre la membrana celular, aunque no existen receptores de LH en la superficie de los oocitos, los receptores de LH están presentes en las células y se ha comprobado que tales receptores de los ovocitos in vivo y in vitro son los responsables de la meiosis (Stroebech et al., 2015).

También se investigó la duración del período óptimo de maduración; donde por lo general, considerando la segunda metafase, misma que se ha normatizado a un período de 22 a 26 horas, donde se llega a desarrollarse por completo (Blondin et al., 2018).

3.4 Fertilización in vitro (FIV)

Otro paso crítico para el desarrollo exitoso del embrión es la fertilización, misma que se realizará con una fecundación in vitro, es decir tendrá lugar fuera del cuerpo de la madre, puesto que todo este procedimiento se realizará en laboratorio (Rodríguez et al., 2021).

3.5 Proceso de Fertilización in vitro

Una vez transcurrido la MIV, inicia el proceso de fecundación, la cual consiste en un conjunto de pasos secuenciales, cuyos puntos finales están representados por la fusión de dos núcleos gaméticos y la formación del genoma de un nuevo individuo (Lafontaine et al., 2023).

El paso consiguiente es la selección espermática donde se determina la concentración de la misma, que permite conocer y ajustar la cantidad de espermatozoides que serán

colocados con los ovocitos maduros; este conteo se realiza con hemocitómetro o cámara de Thoma; generalmente la dosis puede variar de entre 1 y 6×10^6 espermatozoides/ml de medio de fecundación, dependiendo del protocolo utilizado (Cruz & Vasquez, 2020,).

El medio de fertilización es conocido como Thyrodes-Lactate modificado, tomando en consideración que el tiempo de fertilización es aproximadamente de 20 a 24 horas en las mismas condiciones de cultivo que durante la maduración del ovocito (Su et al., 2021).

Tras la adición de los espermatozoides al medio de fertilización con los óvulos previamente ubicados, se consolida el cocultivo con los óvulos y espermatozoides en medio de fertilización, por periodos entre 18 y 22 horas en ambiente de alta humedad y protegidos de la luz (Parish et al., 2013).

La implantación de los espermatozoides provoca la iniciación de la segunda fase de la división de la meiosis y la expulsión del segundo cuerpo polar; la des condensación de la cabeza del espermatozoide y la formación del núcleo masculino se realizan de forma simultánea, no obstante, este proceso depende de la presencia de factores de crecimiento masculinos en el citoplasma del ovocito (Romar et al., 2019).

3.6 Preparación de los espermatozoides

Se debe tomar en cuenta algunos parámetros en cuanto a la selección espermática previo a la fertilización; uno de los primeros procesos en la producción de embriones es la selección de espermatozoides para su uso en la fertilización in vitro, ya que muchas veces depende de la calidad y procedencia de este para optimizar la viabilidad y cantidad de embriones resultantes (Romero, 2020).

Un método frecuente es seleccionar esperma en base a medios de separación propuestos por Percoll, ya que se ha demostrado que la técnica de este autor es superior al método swing-up en la obtención de espermatozoides con mayor viabilidad e integridad del acrosoma; de modo que la centrifugación en gradiente de Percoll permite la separación de espermatozoides mediante centrifugación a través de un gradiente de partículas de sílice coloidal recubiertas de polivinilpirrolidona (Bonilla et al., 2018).

3.7 Cultivo in Vitro

El paso final es la maduración embrionaria, para lo cual se han desarrollado y aplicado varios protocolos que involucran diferentes sistemas de cultivo in vitro como; el cultivo

SOF con líquido oviductal sintético, cultivo realizado en presencia de células epiteliales del oviducto. y cultivo in vivo utilizando hembras previamente sincronizadas (Méndez et al., 2020).

En este contexto se refiere a la transición materno-embriónica, pues implica la activación del genoma embrionario (AGE), que es un proceso fundamental en el desarrollo embrionario. En el caso específico de los bovinos, la activación del genoma embrionario ocurre durante los estadios de 8 a 16 células. Después de esta activación, se inicia la transcripción del genoma embrionario, lo que desencadena una serie de eventos dinámicos que controlan la compactación de la mórula y el desarrollo posterior del blastocisto (Graf et al., 2014).

Generalmente los medios de cultivo utilizados en este ámbito, están compuestos por líquido oviductal ovino y la adición de albúmina de suero bovino (BSA) utilizada en cultivo de embriones ovinos, bovinos y caprinos, según el medio, los ovocitos fertilizados se almacenan dentro de una incubadora durante 7 días a 38,5 °C de temperatura con una atmósfera que contiene 5% de CO₂ en el aire (Lino & Chasi, 2021).

3.8 Evaluación morfológica de los embriones

La calidad del embrión es un factor crítico en el éxito del procedimiento de transferencia de embriones, donde se han presentado varios métodos que involucran, las pruebas de exclusión de tinción, las mediciones de la actividad enzimática, la captación de glucosa y las tinciones para distinguir los embriones vivos de los muertos, todos estos son útiles para predecir la supervivencia del embrión después de la implantación, pero este método implica equipos y procedimientos complejos que requiere un proceso largo con cultivo in vitro, por lo tanto, la transferencia de embriones en condiciones de campo tiene poca importancia (Águila et al., 2020).

En la actualidad, la discriminación morfológica se usa considerablemente para evaluar la calidad del embrión y ayuda a predecir las tasas de preñez en grupos post implantación de embriones bovinos; la evaluación de tales embriones sigue siendo uno de los métodos más subjetivos y de mayor calidad en la transferencia de embriones, y la clasificación en base a criterios estandarizados varía entre los expertos (Wrenzycki, 2021).

Tal medio de evaluación, discrimina la calidad del embrión en función de criterios morfológicos como la forma, el color, el tamaño del espacio peri vitelino, el número de

células extruidas o degeneradas y el número y dimensión de las vesículas, a más de diversos factores, como la calidad de los ovocitos, la consistencia de oxígeno, la densidad embrionaria y el tipo de sustrato energético empleado durante la producción de embriones in vitro, pudiendo afectar directamente el porcentaje de pre-implantación y el desarrollo embrionario (Medina & Tovar, 2021).

3.8.1 Evaluación de la calidad de embriones:

La clasificación embrionaria se realiza bajo estándares de calidad establecidos por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), misma que es aceptada en entornos comerciales y estableciendo así la continuidad en la investigación relacionada con la embriología bovina (Barfiel et al., 2022).

Tabla 2: Clasificación de los embriones según la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

Etapa el día 7	Grado IVD	Grado IVP
3 mórula de pre compactación	2	3
4 mórula	1	2
5 blastocisto temprano	1	1 o 2
6 blastocisto	1	1
7 blastocisto expandido	1	1

Fuente: Manual IETS, 5a edición. 2021.

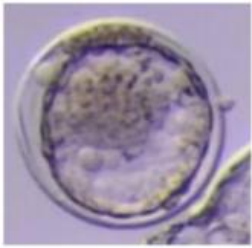
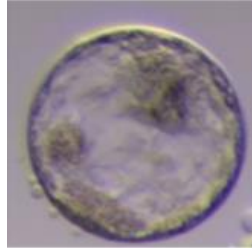
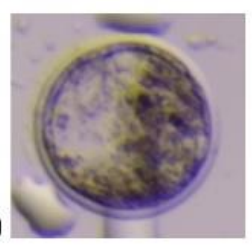
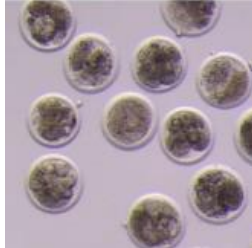
- a)** Código 1 (Excelente): presenta una masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros de excelente tamaño, color y densidad; las irregularidades deben ser relativamente menores y al menos el 85% del material celular contenido dentro de la ZP debe ser parte del embrión propiamente dicho, las células del trofoectodermo deben tener un tamaño parejo y un color claro (Barfiel et al., 2022).
- b)** Código 2 (Bueno): las irregularidades son moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% del material celular debe ser parte de una masa embrionaria intacta y viable (Barfiel et al., 2022).

c) Código 3 (Regular): se observan irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% del material celular debe ser parte de la masa embrionaria intacta y viable. Se hacen visibles que carecen de un ICM fácilmente discernible o tener muy pocas células de diferentes densidades que componen un ICM mal organizado (Barfiel et al., 2022).

d) Código 4 (Degenerado): los óvulos no fertilizados y los embriones que han dejado de desarrollarse en las etapas de división se consideran no viables si las evaluaciones se realizan 7 días después de la FIV.

Los blastómeros pueden aparecer granulados y el citoplasma puede estar desprendiéndose de la membrana plasmática y no se identifica ninguna masa embrionaria viable (Barfiel et al., 2022).

Tabla 3: Clasificación embrionaria según el manual de IETS.

Clasificación embrionaria			
			
Embrión grado 1	Embrión grado 2	Embrión grado 3	Embrión grado 4

Fuente: Manual IETS 2022

4. MATERIALES Y MÉTODOS

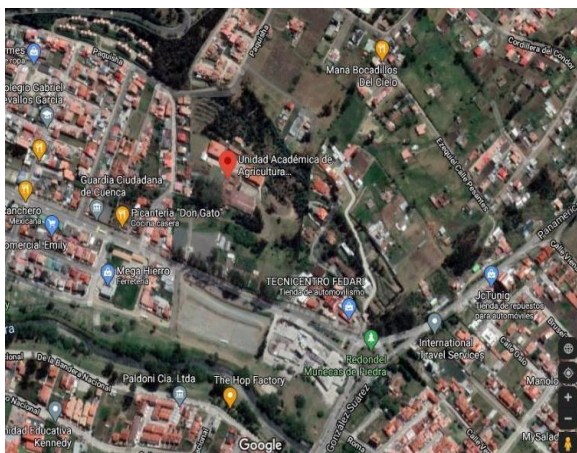
El tipo de estudio que se utilizó en la presente investigación es de carácter experimental, ya que se intervino directamente en la producción ovocitaria con la ayuda de la hormona FSH recombinante bovina, para la estimulación folicular de los bovinos donantes y que posterior a esto se evaluó su incidencia en la calidad y cuantificación de los mismos hasta alcanzar la fertilización in vitro.

4.1 Área de estudio

Cabe mencionar que la presente investigación es una continuación de una etapa anterior de trabajo de campo donde se realizó la OPU y la debida selección de ovocitos idóneos para el siguiente proceso, misma que está ubicada en la Provincia del Cañar, Cantón Biblián, sector Pilatos, con coordenadas geográficas (UTM en X) 732841 (UTM en Y) 9706195.

La presente investigación se realizó exclusivamente en el laboratorio de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, misma que se encuentra ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, con coordenadas geográficas (UTM en X) 726867 (UTM en Y) 9681354.

Figura 1 Ubicación geográfica de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias.



Fuente: (Google Maps., 2023)

4.2 Universo de estudio

El universo de estudio que conformó el presente estudio son todos los ovocitos viables (grado 1 y grado 2) extraídos mediante OPU de las 8 unidades bovinas de la propiedad del sr. Sergio Chauca del predio que se menciona anteriormente, los mismos que fueron

evaluados y seleccionados para su continuación en el laboratorio de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias.

Se procedió a dividir en dos grupos de trabajo, mismos que serán clasificados según el protocolo de estimulación que corresponda; es decir, el grupo “A” donde implica la utilización de la hormona FSH-rb y el grupo “B” sin manejo hormonal o llamado también grupo control.

La primera etapa inició con la recepción de los ovocitos extraídos mediante OPU bajo la estimulación folicular con la hormona FSH recombinante bovina de 8 unidades bovinas de la raza Holstein.

Cabe mencionar que, los ovocitos aspirados fueron previamente seleccionados y clasificados posterior a la OPU, recalcando que únicamente los de grado 1 y 2 de acuerdo a los estándares de calidad presentados por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), avanzaron a la siguiente etapa de trabajo de laboratorio.

Posteriormente se procedió a ubicarlos en una incubadora de CO₂ al 5% con una temperatura de 38,5 grados, durante 18 a 24 hora en TCM-199 complementado con suero fetal bovino al 10% conjuntamente con amikacina 50 mcg/ml, FHS-p 5 mcg/ml y cisteamina 100 µM.

Una vez transcurridos las 24 horas de iniciada la maduración ovocitaria, se procedió a estabilizar el medio de fecundación por un lapso de una hora aproximadamente, el mismo contiene 80 µl de medio de FIV y 800 a 1000 µl de aceite mineral el cual se colocó en cada uno de los 4 pocillos de las cajas Numc. Este medio fue ubicado en la misma incubadora de CO₂ bajo las mismas condiciones en las que se encuentran los ovocitos durante.

Al mismo tiempo se procede a realizar la capacitación espermática misma que inicia con el descongelamiento del semen sexado previamente seleccionado, esto en baño maría a 37 grados durante 1 minuto.

Inmediatamente se procede a medir la concentración espermática, misma que consta de los siguientes pasos:

- A. Las pajuelas seleccionadas fueron vaciadas en un tubo Falcon de 15 ml para luego ser centrifugado a 300 gravedades durante 5 min y mediante una pipeta se extrajo

todo el pellet que se encontraba en la parte inferior del tubo. Este procedimiento se repitió dos veces.

- B. Una vez extraído el pellet del semen se mezcló 5 μl de este junto a 95 μl de agua.
- C. Con una pipeta se extrajo 10 μl de la mezcla anterior y se colocó en una cámara de Neubauer para realizar el respectivo conteo de espermatozoides, y mediante los cálculos adecuados se determinó que la concentración espermática.
- D. Finalmente, determinada la concentración (2×10^6) procedimos a fertilizar los ovocitos colocando 20 μl por gota en cada pocillo donde está el medio de FIV junto a los ovocitos seleccionados.

A las 18 horas de haber iniciado la fecundación se procedió a denudar los ovocitos de los restos de células del cumulus y sobre todo de espermatozoides muertos mediante la técnica del pipeteo esto en un medio de lavado.

Una vez obtenidos los ovocitos fecundados se realizó la ubicación de los mismos en un nuevo medio de HSoF para el cultivo de embriones el cual fue preparado con anterioridad ubicando 500 μl del medio en cada uno de los 4 pocillos de las cajas Numc, luego se colocó 300 μl de aceite hasta cubrir el medio. Cabe mencionar que el medio de cultivo HSoF fue previamente estabilizado en la incubadora a una temperatura de 38,5 grados y 5% de CO₂ durante 2 horas.

Se realizó una primera evaluación luego de 72 horas posterior a la fecundación en donde se determinó la tasa de clivaje.

La segunda evaluación se la realizó al alcanzar el día 7 post fertilización en donde se evaluó la cantidad, la calidad y el estado de desarrollo embrionario.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación indican que la estimulación con FSH-rb no condujo a un aumento significativo en la producción de ovocitos ($5,63 \pm 1,21$) en comparación con el grupo control ($5,31 \pm 1,21$), por tanto no existe diferencia significativa en los dos grupos tratado; sin embargo, es importante destacar que la estimulación con FSH-rb resultó con valores numéricos positivos en cuanto al clivaje de ($2,23 \pm 0,65$) frente a ($2,94 \pm 0,65$) del grupo control de ovocitos, siendo no representativa tal diferencia, lo que concuerda con estudios realizados por Nawaz., et al (2021) donde obtuvo los siguientes resultados en cuanto al clivaje (control $1,80 \pm 0,65$, F100 $3,2 \pm 0,95$, F200 $3,9 \pm 0,8$), mismos que una vez analizados no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los tres grupos tratados en su estudio; resultados que se encuentran descritos en la Tabla 4.

Bó y Mapletoft (2020) indicaron que al usar y mantener un régimen hormonal relativo puede estimular el crecimiento del folículo antral y elevar el número de embriones viables; por lo que El-Hayek y Clarke (2015) menciona que la hormona folículo estimulante (FSH) desempeña un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de ovocitos viables, ya que promueve la autorrenovación de las células madre ováricas, lo que resulta en una mayor producción embrionaria. Esto difiere a los resultados obtenidos en este estudio, ya que el número de embriones obtenidos fue ($0,69 \pm 0,24$) en el grupo FSH-rb en comparación con ($0,38 \pm 0,24$) en el grupo control, pero que concuerda con Barbosa et al. (2017), donde el número de blastocistos obtenidos el día 7 fue: ($4,1 \pm 0,5$) en el grupo control y ($4,3 \pm 0,5$) en el grupo (FSH), resaltando así que no existe diferencia estadísticamente significativa en los dos grupos estudiados.

Se ha demostrado que una alternativa para ayudar a animales con baja actividad folicular es el uso de hormonas estimulantes. Por lo cual, Barucelli et al (2019) manifiesta que la gonadotropina coriónica equina (eCG) tiene un efecto positivo en los tratamientos, a través de su acción como hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), estimulando el crecimiento folicular, incrementa el tamaño del folículo y las concentraciones plasmáticas de progesterona y finalmente mejora la calidad y viabilidad del oocito durante el desarrollo embrionario.

Sin embargo, en una investigación realizada por Medina et al. (2023) en donde hizo uso de la hormona eCG en un sistema de 4 dosis aplicada en bovinos para la estimulación folicular (T1. 0 UI eCG; T2. 1000 UI eCG; T3. 2000 UI eCG; T4. 3000 UI eCG), en el

cual, en razas europeas (*Bos taurus*) se obtuvo mayor número de ovocitos viables en T0 con 4.0 (1.0), mientras que en los demás tratamientos los resultados no tuvo efectos significativos: T1:1.7 (0.7); T2: 2.0 (0.6); T3: 3.3 (1.3); con respecto a la tasa de blastocistos, existe una clara diferencia significativa ($p>0,05$) entre el tratamiento T0 en comparación a los demás tratamientos, debido a que el primero presenta mayor producción con 1.7. (0,6) a diferencia de los demás (1,0). Valores totalmente diferentes a nuestra investigación en donde mediante la inducción con FSH-rb no presentó diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control, pero si numéricamente, siendo mayor en las vacas en donde se realizó el protocolo hormonal.

Tabla 4.- Comparación de la producción de ovocitos y de embriones in vitro en promedio por vaca

Tratamiento	N	Ovocitos n	Clivaje n	Embriones n
FSH-rb	16	5,63 ± 1,21	2,23 ± 0,65	0,69 ± 0,24
Control	16	5,31 ± 1,21	2,94 ± 0,65	0,38 ± 0,24

N= número de vacas. Los datos mostrados son $X \pm EE$.

En la Figura 2 se representa la proporción de ovocitos viables y no viables según el tratamiento empleado, mismos que tras la investigación se puede evidenciar que en el grupo FSH-rb arroja un valor de (74,38%) frente al grupo control con (68,4%) valores que numéricamente presentan cierta diferencia, pero que estadísticamente son similares. Lo que discrepa con estudios realizados por Samaniego et al. (2020) quienes encontraron un número promedio de ovocitos viables por unidad experimental con FSH que fue significativo en comparación con el grupo control, coincidiendo con los resultados obtenidos por Ayala et al. (2018).

Finalmente, Morera et al. (2022) también informaron parámetros positivos para la obtención de ovocitos viables mediante un protocolo hormonal implementado en base a FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Madrid, España) con un total de 350 UI/animal, distribuidas en 10 ml, vía i.m. y repartidas en 4 inyecciones en dosis decrecientes (3,5, 3, 2 y 1,5 ml, respectivamente), administradas 36 h después de la aplicación de GnRH y durante 3 días consecutivos, obteniendo una media de 13 ovocitos por unidad, a diferencia del grupo control cuya media es de 4 ovocitos viables.

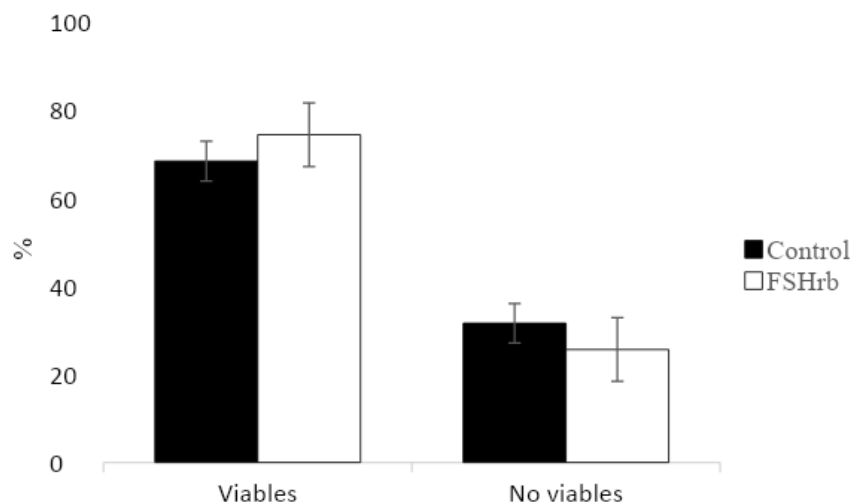


Figura 2.- Proporción de ovocitos viables y no viables por tratamiento.

Con respecto a la Tabla 5, se describe el número total de embriones obtenidos de las 4 repeticiones, así como la tasa de clivaje, donde no tuvo un efecto significativo entre los dos grupos tratados (FSH-rb) y control. Con respecto al porcentaje de clivaje puedo mencionar un estudio realizado por Nawaz et al. (2021) quienes aplicaron 3 protocolos hormonales (Control, FHS 100 mg, FSH 200mg) donde obtuvo un porcentaje a la tasa de blastocistos sin diferencias significativas (24,32, 33,33 y 20,00%) pero sí diferencias numéricas (control $0,9 \pm 0,37$, F 100 $2,0 \pm 0,69$, F 200 $1,8 \pm 0,59$) ya que el número de blastocistos duplicó numéricamente en grupos tratados hormonalmente que en control, valores similares a nuestra investigación (FSH-rb=44,7%; Control=41,1%).

Lo que concuerda plenamente con las investigaciones de Presicce et al. (2019) los cuales al usar ECG obtuvieron resultados similares en la colecta de ovocitos de las vacas donantes, sin embargo, la aplicación hormonal aumentó la tasa embrionaria en estadio de blastocisto ($41,1 \pm 5,7$ frente a $23,0 \pm 4,2$; $p = 0,054$). Valores similares a los obtenidos por Fernandes.et al. (2020) ya que no encontraron diferencias significativas entre el grupo control y tratadas con FSH ($P > 0,05$) en relación con el porcentaje promedio de embriones ($47,1 \pm 4,2\%$ y $45,3 \pm 7,7\%$, respectivamente) o media de embriones ($6,2 \pm 0,8$ y $5,1 \pm 0,6$) producidas in vitro en los dos grupos tratados.

Tabla 5.- Comparación de la producción in vitro de embriones por tratamiento en cuatro repeticiones

Tratamiento	N	Ovocitos	Clivaje n (%)	Embriones n (%)
FSHrb	16	85	47 (44,7)	7 (8,2)
Control	16	90	37 (41,1)	11 (12,2)

N= número de vacas. Los datos mostrados son el número y porcentaje de ovocitos clivados y embriones según cada tratamiento.

La Figura 3, presenta una comparación detallada de los estados de desarrollo embrionario en diferentes condiciones experimentales para comprender el impacto de los tratamientos (FSH-rb y Control) en el proceso de producción de embriones in vitro.

Donde se puede notar una clara diferencia numérica en el estadio de blastocisto expandido de los embriones resultantes del presente estudio con una tasa del 60% del grupo con FSH-rb frente al 13% del grupo control lo que garantizara la viabilidad de los embriones. Valores que son respaldados por los hallazgos de Valencia et al. (2023) quienes mencionan que al realizar un total de 1,710 transferencias con embriones por fertilización in vitro, logró una tasa de preñez general del 29%, destacando que, el blastocisto expandido con 7 días de desarrollo obtuvo una probabilidad del 0.9 veces más en comparación con otros estadios embrionarios, respaldándose con investigaciones realizadas por Conrad et al. (2019), donde se encontró que la tasa de blastocistos fue significativamente mayor en los animales tratados con FSH (T1-FSH7=21%, T1-FSH15=30%) en comparación con el grupo de control (T0=5%, T0-DFR=0 y T2-Residual=0).

Estos hallazgos sugieren que una única aplicación estratégica hormonal (FSH-rb) conduce a un aumento numéricamente significativo tanto en la calidad ovocitaria como en el desarrollo embrionario, este patrón de resultados también se refleja en la investigación de Mendoza (2024), quien en un estudio donde aplico 50mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol) al día 5 en vacas donantes obteniendo resultados positivos en el grupo con FSH, donde el 60% de los 10 embriones totales fueron clasificados como viables, en contraste, con en el grupo control, donde el 37.5% de los 8 embriones totales fueron considerados viables.

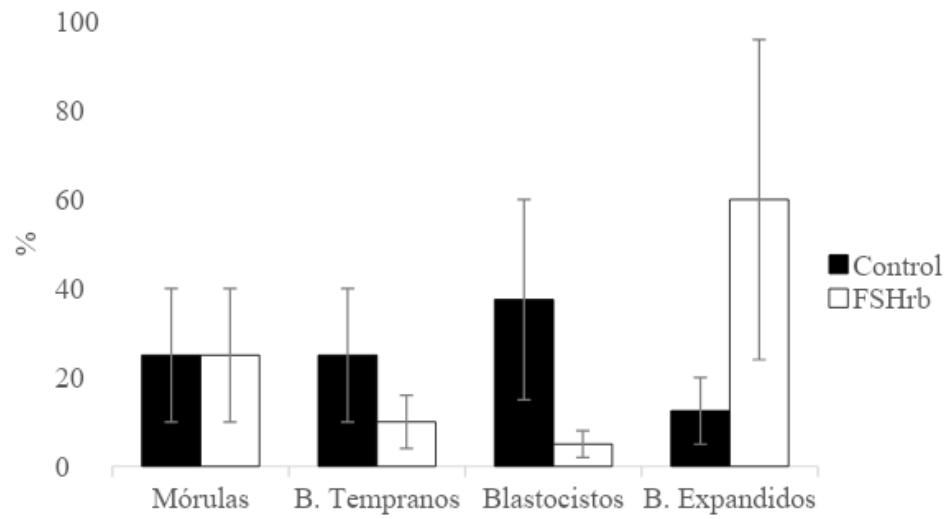


Figura 3.- Comparación de los estados de desarrollo embrionario en la proporción de los embriones in vitro en cada tratamiento.

6. CONCLUSIONES

Finalmente tras la presente investigación donde se hizo uso de la hormona FSH-rb, en una instancia anterior en lo que refiere a la estimulación folicular en 8 unidades bovinas obteniendo un número determinado de ovocitos, mismos que fueron clasificados y separados en dos grupos (FSH-rb) y (Control), para la producción de embriones In Vitro, se obtuvieron resultados que no muestran diferencia significativa alguna en los dos grupos mencionados anteriormente, en cuanto refiere a la tasa de ovocitos viables, clivaje y blastocistos totales.

Es claro mencionar que, luego del análisis realizado a los resultados obtenidos en los dos grupos estudiados es evidente notar cierta diferencia numérica en la producción de embriones por vaca como porcentual en cuanto a la viabilidad de los ovocitos, pero que tales diferencias no superan el grado de significancia requerido estadísticamente.

Por último, cabe destacar que el tamaño de la muestra empleada en este estudio podría haber tenido un impacto significativo en los resultados obtenidos. Es fundamental considerar que una muestra más amplia podría haber proporcionado una mayor representatividad de la población y, por ende, resultados más sólidos y generalizables. Por lo tanto, es importante tener en cuenta esta variable al interpretar los hallazgos de la investigación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Aziz, R. L., Wahab, A. A., Ibrahim, M. A., & Kasimanickam, R. K. (2020). Transcript abundance of anti-Müllerian hormone and follicle-stimulating hormone receptor predicted super stimulatory response in embryo donor Holstein cows. *Reproduction in Domestic Animals*, (56), 153-160. <https://doi.org/10.1111/rda.13859>
- Águila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(20). <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Álvarez Barriere, M. X., Ramírez Valle, C. C., & Ramírez Viana, J. S. (2022). Ovulación múltiple y transferencia embrionaria en bovinos (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Aragonés, P., Bermúdez, I., Ortiz, I., Sánchez, J., & Madrigal, M. (2022). Aspectos relacionados con la fertilización in vitro (FIV) en bovinos, una revisión bibliográfica. *Revista AgroInnovacion en el trópico húmedo*, 3(1), 52-61. <http://revistas.tec.ac.cr/index.php/agroinn/index>
- Ávila, O. I. (2023). Desarrollo y Caracterización de un prototipo de hormona folículo estimulante bovina de simple cadena (BscFSH), para reproducción asistida en rumiantes. *Repositorio Dspace*. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/10859>
- Ayala, L., Samaniego, C., Nieto, E., Rodas, C., Dutan, S., Calle, G., Murillo, A., Vázquez, M., Argudo, G., & Perea, F. (2018). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 552–558. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>
- Barboza, J., Machado, R., Maturana, M., Naves, J., Santin, T., Pugliesi, G., & Hoffmann, E. (2017, marzo 01). Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 90(1), 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.016>
- Barfiel, J., Demetrio, D., & Galli, C. (2022). Considerations for evaluating in vitro-produced bovine embryos. *Manual of the international embryo transfer society*, 2, 1-11.
- Blondín, P., Vigneault, C., Nivet, A., & Sirad, M. (2018). Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far?. *Animal Reproduction*, 9(3), 281-289. <https://www.animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6058f7783717068b46e7>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>

- Bonilla, L., Bonilla, D., & Gómez, R. (2021). Producción de embriones bovinos del laboratorio in vitro colombia durante el año 2019. *Working Papers ECAPMA*, 5(1), 6-16. <https://doi.org/10.22490/ECAPMA.4242>
- 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 del Perú*, 29(4). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14297>
- Callejas, S., Albeiro, R., Cabodevilla, J., Dulout, F., Aller, J., & Catalano, R. (2005). El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos. *Revista Argentina de Producción Animal*, 25(1-2), 63-73. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/120616>
- Carvalho, P., Hackbart, K., Bender, R., Baez, G., Dresch, A., Guenther, J., & Souza, A. (2014, August). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*, 82(3), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>
- Conrad, J., Verdugo, J., Yuponi, R., Clérico, G., Crudeli, G., & Sansiñena, M. (2019). Efecto del tratamiento estratégico con FSH en la producción ovocitaria y desarrollo de embriones en un Programa Comercial de Fecundación in vitro Bupalino. *ICU*, 3(4), 1-4. <https://revistas.umaza.edu.ar/icu/article/view/243/179>
- Cruz, E. S., & Vasquez, R. L. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Scielo Analytics*, 31(3), 1-5. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172020000300003&script=sci_arttext&tlng=pt#B3
- Chuga, W. S., Martinez, R. D., Ceron, S. M., Jativa, D. N., Chamorro, B., Chiran, G., Balarezo, L. R., & Proaño, M. (2021). Transferencia de embriones en bovinos en la provincia de Carchi. *Revista SATHIRI: Sembrador*, 16(2). <https://doi.org/10.32645/13906925.1075>
- Demetrio, D & Barfiel, Jennifer. (2021). Photographic illustrations of bovine cumulus- oocyte complexes. *IATS, 5th edition*, 1-7. https://www.researchgate.net/publication/357635082_IETS_Manual_5th_edition_-_Appendix_2_Photographic_illustrations_of_bovine_cumulus-oocyte_complexes
- Fernández, T., Adona, P., Guevara, S., Camara, T., & Miranda, M. (2020). Recuperación de ovocitos y producción de embriones in vitro en vacaciones tratadas con una dosis única de hormona estimuladora folicular. *Revista Turca de Ciencias Veterinarias y Animales*, 44(1), 151-155. <https://doi.org/10.3906/vet-1907-10>
- El-Hayek, S., & Clarke, H. J. (2015). Follicle - Stimulating hormone increases gap communication between somatic and Germ-Line follicular compartments during murine oogenesis1. *Biology of Reproduction*, 93(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129569>
- Gallegos, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (2022). Producción de embriones bovinos in vitro: Estado del Arte. ESPOCH Congresses: *The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 2(1), 173-185. [10.18502/epoch.v2i2.11192](https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192)

- Gallegos, M. P. (1998). Fertilización in vitro de embriones bovinos. Universidad Autónoma de Nuevo León, 1-99.
- Goicochea, J., Rondon, W., Acosta, F., Gómez, Y., Montalvo, M., Salvatierra, M., Martel, J., Ballarte, O., Diaz, J., & Ratto, M. (2021). Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de embriones bovinos criollos. *Rev. investig. vet. Perú*, 32(5). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i5.18709>
- Gonella, A. M., Atuesta, J. E., Bernal, S. M., & Chacón, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65-80. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/39-generalidades_de_la_produccion.pdf
- Gonzalves, P., Figueiredo, J., & Freitas, V. (2002). Biotécnicas aplicadas a la reproducción animal. *Varela Editora y Librería Ltda.*, 133-134.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal reproduction science*, 149(1-2), 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.016>
- Gutiérrez, M., Aguilera, C., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F., Cabezas, I., Sánchez, O., García, M., & Rodríguez, L. (2022). Effects of extra-long-acting recombinant bovine fsh (bscrfsh) on cattle superovulation. *Animals*, 12(2), 1-21. <https://doi.org/10.3390/ani12020153>
- Lafontaine, S., Labrecque, R., Blodin, P., Cue, R., & Sirad, M. A. (2023). Comparison of cattle derived from in vitro fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 4380-4396. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22736>
- Leão, R. B., & Esteves, S. C. (2014, 4). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo)*, 69(4), 279-293. [10.6061/clinics/2014\(04\)10](https://doi.org/10.6061/clinics/2014(04)10)
- Lino, A., & Chasi, B. (2021). Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénéticos en bovinos. *Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.*, <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7048>
- Looney, C. R., Bondioli, K. R., Hill, K. G., & Massey, J. M. (1988). Superovulation of donor cows with bovine Follicle-Stimulating Hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, 29(1), 271. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90099-4)
- Ma, L., Cole, J. B., Da, Y., & VanRaden, P. M. (2019). Symposium review: Genetics, genome-wide association study, and genetic improvement of dairy fertility traits. *Dairy Science*, 102(4), 3735-3743. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15269>
- Medina, F., & Tovar, L. (2021). Desarrollo y regulación genética en embriones tempranos bovinos. *Universidad Cooperativa de Colombia.* <http://hdl.handle.net/20.500.12494/35517>
- Medina Pérez, L. M., Gutiérrez Piña, F. J., Trejo Meza, F. J., Espinoza Canales, A., Muro Reyes, A., & González-Reyna, A. (2023). Effect of eCG on in vitro embryo production in beef cattle in the dry tropics. *Archivos Latinoamericanos De*

- Producción Animal*, 31(Suplemento), 67-72.
<https://doi.org/10.53588/alpa.310513>
- Méndez, M., Argudo, D., Soria, M., Galarza, L., Perea, F. (2020). Efecto de la adición de melatonina en el medio de maduración y/o vitrificación de ovocitos sobre la producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17557>
- Mendoza Zambrano, B. F. (2024). Efecto de la aplicación de FSH (FOLLTROPIN®) en la producción de embriones bovinos in vitro (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).
- Morera, A., Velasco, E., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (folltropin®) y rendimiento de opu en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 36(1), 1-17. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
- Moshiur, M., Rahman, M., Sultana, N., & Uddin, M. M. (2020). Optimization of in vitro fertilization technique for oocytes of indigenous zebu cows. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(2), 142-148. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.2.142>
- Nawaz, M., Saleem, M., Yaseen, M., Sagheer, M., Zahoor, I., Ahmad, N., & Riaz, A. (2021, diciembre 19). La estimulación ovárica mediante FSH mejora la recolección folicular y el rendimiento de blastocistos en Bos Indicus Ganado. *Revista veterinaria de Pakistán*, 42(1), 17-24. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2021.081>
- Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 87(10), 1021-1036. <https://doi.org/10.1002/mrd.23420>
- Parish, J., Susko, J., Leibfried, M., Critser, E., Eyestone, W., & First, N. (2013). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25, 591-600. 10.1016/0093-691x(86)90143-3
- Pellicer, A. M. (2015, 2). Efecto de la suplementación de rhLH en la respuesta superovulatoria de conejas (*Oryctolagus cuniculus*) tratadas con pFS. *Universidad Politecnica de Valencia*. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/53277/MAS%20-%20Efecto%20de%20la%20suplementaci%20de%20rhLH%20en%20la%20respuesta%20superovulatoria%20de%20conejas%20\(Oryctolagus....pdf?sequence=3](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/53277/MAS%20-%20Efecto%20de%20la%20suplementaci%20de%20rhLH%20en%20la%20respuesta%20superovulatoria%20de%20conejas%20(Oryctolagus....pdf?sequence=3)
- Presicce, G., Neglia, G., Salzano, A., Padalino, B., Longobardi, V., Vecchio, D., De Carlo, E., Gasparrini, B. (2020). Efficacy of repeated ovum pick-up in Podolic cattle for preservation strategies: a pilot study. *Italian journal of animal science*, 19(1), 31-40. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1684213>
- Quispe, C., Ancco, G. E., Solano, A. J., Unchupaico, P. I., & Mellisho, S. E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Rev. Inv Perú*, 29, 1114- 1121. 10.15381/rivep.v29i4.14418


- Rodríguez, J., Gomez, M. J., & Cervantes, E. (2021). ¿Fertilización in vitro o conversión a inseminación intrauterina en baja reserva? Revisión sistemática y metanálisis. *Ginecología y obstetricia de México*, 89(3). <https://doi.org/10.24245/gom.v89i3.4827>
- Romar, R., Canovas, S., Matas, C., Gadea, J., & Coy, P. (2019). Fecundación in vitro porcina: ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos? *Teriogenología*, 137, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.045>
- Romero, L. (2020). Recogida y procesamiento de muestras seminales en el laboratorio de reproducción asistida. *Universidad de Oviedo*, 1-19. https://www.researchgate.net/profile/Laura-Romero-Soriano/publication/350922883_protocolo_normalizado_de_trabajo_pnt_recogida_y_procesamiento_de_muestras_seminales_en_el_laboratorio_de_reproduccion_asistida/links/6079dc368ea909241e0527eb/Protocolo-Normaliz
- Ruddock-D'Cruz, N. T., Hall, V. J., & French, A. V. (2007). Gene expression analysis of single preimplantation bovine embryos and the consequence for developmental potential. *Soc Reprod Fertil Suppl*, (64), 341-363. 10.5661/rdr-vi-341
- Samaniego, C., Ayala, L., Garzón, D., Brugal, M., Perea, F., Carpio, E., Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(1), 7571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Sánchez, O., Toledo, J., Hugues, F., Cabezas, I., Cerro, R., Parra, N., Acosta, J., Simiano, K., Tondello, L., & Gaudencio, S. (2019, 11 21). Recombinant bovine follicle-stimulating hormone, composition comprising the same, and method to induce superovulation and estrus synchronization in bovines using said hormone. *Centro de biotecnología y biomedicina spa*.
- Sirait, B., Wiweko, B., Jusuf, A., Iftitah, D., & Muharam, R. (2021). Biomarcadores de competencia ovocitaria asociados con la maduración ovocitaria: una revisión. *Sec. Reproducción Molecular y Celular*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710292>
- Spacek, S., & Carnevale, E. (2018). Impact of equine and bovine oocyte maturation in follicular fluid from young and old mares on embryo production in vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 68, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.04.009>
- Stroebech, L., Mazzoni, G., Pedersen, H., Freude, K., Kadarmideen, H., Callesen, H., & Hyttel, P. (2015). In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*, 12(3), 465-472. <https://www.animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6032f7783717068b4610>
- Su, W., Li, Xiangnan, B., Ding, R., Zhao, G., Cao, G., Shuxuang, H., Wang, J., Sun, Q., Yu, H., & Li, X. (2021). Correlación entre fecundación in vitro e inseminación artificial en toros Holstein. *Animal Bioscience*, 34(12), 1879-1885. 10.5713/ab.20.0665

- Trejo, F. J., Souza, J. F., Rosales, J., Reyes, H., Rodriguez, A., Lucero, F., & Arnoldo Gonzalez. (2023). Reproduction biotechnology in beef cattle and its application in Northeast Mexico: follicular aspiration and in vitro fertilization. *Latin American archives of animal production*, 31, 383-388. <https://doi.org/10.53588/alpa.310564>.
- Valencia, H., Rodríguez, N., & Mantilla, T. (2023, junio 26). Factores que afectan la tasa de preñez mediante transferencias de embriones por fertilización in vitro en novillas multirraciales en condiciones del trópico colombiano. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(2), 4. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6031>
- Vásquez, N., Torres, V., & Rojano, B. (2014). Efecto del ácido ascórbico durante la maduración in vitro de ovocito bovino sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ero) y la competencia en el desarrollo embrionario. *Información Tecnológica*, 25(2), 141-150. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000200016>
- Vélez, I. (2018). Evaluación de la expresión de proteínas en las células del cúmulo como marcadores de la capacidad de desarrollo del ovocito bovino.
- Viana, J. H., Figueiredo, A., Goncalves, R., & Siquira, L. (2018). A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Animal Reproduction*, 15(1), 963-970. 1021451/1984-3143- AR2018-0016
- Wrenzycki, C. (2021). Parameters to identify good quality oocytes and embryos in cattle. *Vertebrate reproductive science and technology*, 34(2). <https://www.publish.csiro.au/RD/RD21283>
- Viana, J. (2022). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo technology newsletter*, 40(4), 22-40. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf
- Valencia, H. F., Rodríguez, N., & Mantilla, T. (2023, 6). Factors affecting the rate of pregnancy by embryo transfers (ET) by in vitro fertilization in multibreed heifers under Colombian tropical conditions. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(2), 326-338. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242023000200326&script=sci_arttext&tlng=en
- Zolini, A. M., Block, J., Rabaglino, M. B., Rincon, G., Hoelker, M., Bromfiel, J. J., Wondim, D. S., Hansen, P. J. (2020). Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell Tissue Res*, (383), 665-678. 10.1007/s00441-020-03257-y

AUTORIZACIÓN

Luis Nelson Iñamagua Lala portador de la cédula de ciudadanía N° **0302174289**. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Producción de embriones in vitro de vacas Holstein estimuladas con FSH-rb”** 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 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, 21 de junio de **2024**



F:

Luis Nelson Iñamagua Lala

C.I. 0302174289