



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

ESTIMULACIÓN FOLICULAR CON FSH

RECOMBINANTE BOVINA PREVIO A LA OPU EN

VACAS HOLSTEIN

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN

DEL TÍTULO DE MEDICA VETERINARIA

AUTORA: JENNIFER ELIANA CHAUCA GUAMAN

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

ESTIMULACIÓN FOLICULAR CON FSH RECOMBINANTE

BOVINA PREVIO A LA OPU EN VACAS HOLSTEIN

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE MEDICA VETERINARIA

AUTORA: JENNIFER ELIANA CHAUCA GUAMAN

DIRECTOR: DR. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MGS.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA

Yo, **Jennifer Eliana Chauca Guamán** portadora de la cédula de ciudadanía N.º **0350173571**.
Declaro ser la autora de la obra: **“Estimulación Folicular con FSH recombinante bovina previo a la OPU en vacas Holstein”**, 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, **15 de junio de 2024**



F:

Jennifer Eliana Chauca Guamán

C.I. 0350173571



CERTIFICACIÓN

Yo **Daniel Ernesto Argudo Garzón**, en calidad de director del Trabajo de Titulación con el tema **“ESTIMULACIÓN FOLICULAR CON FSH RECOMBINANTE BOVINA PREVIO A LA OPU EN VACAS HOLSTEIN”**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la señorita **JENNIFER ELIANA CHAUCA GUAMAN** bajo mi supervisión.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Daniel', is centered on the page.

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios por brindarme salud y sabiduría a lo largo de mi vida por lo cual he llegado hasta este momento importante cumpliendo uno de mis mayores sueños.

También hago mención a mis padres Aida Guamán y Sergio Chauca por todo el cariño y apoyo brindados a lo largo de mi carrera por lo cual mis agradecimientos van ellos; a mis hermanas quienes han estado ahí para escucharme y aconsejarme, así como el resto de mi familia, muchas gracias.

Por otra parte, también quiero agradecer de manera especial a mi Docente tutor el Dr. Daniel Argudo, quien con paciencia ha sabido guiarme a lo largo de este proyecto de investigación y a la vez impartiendo sus conocimientos con nosotros.

Agradezco también a todos los docentes de la Universidad por haber impartido sus conocimientos y experiencias a lo largo de este trayecto, y más sobre todo por brindarnos su confianza.

A la universidad Católica de Cuenca por abrirnos las puertas a esta oportunidad de convertirnos en grandes profesionales como Médicos Veterinarios, sobre todo a la facultad de Ciencias Agropecuarias donde nos ha brindado unas instalaciones adecuadas para la realización de este tema.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis compañeros quienes han sabido llevar una amistad mutua y ayuda durante el aprendizaje en el aula de clases por lo cual espero los mejores éxitos para ellos.

Jennifer Eliana Chauca Guamán

ÍNDICE

DECLARATORIA	III
CERTIFICACIÓN	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	11
3.1 Anatomía y fisiología del tracto genital de la hembra bovina	11
3.2 Ciclo estral y ondas foliculares	12
3.3 Técnica de la Aspiración Folicular guiada por ultrasonografía	13
3.4 Calidad ovocitaria	14
3.5 Clasificación de los ovocitos	14
3.6 FSH recombinante bovina (FSHrb)	16
4. METODOLOGÍA	17
4.0 Tipo de estudio	17
4.1 Área de estudio	17
4.3 Universo de estudio	17
4.4 Variables	18
4.5 Procedimiento	18
4.6 Estadística	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27
AUTORIZACION	32

RESUMEN

La aspiración folicular guiada por ultrasonido se ha destacado como una técnica eficaz para la obtención de ovocitos de alta calidad en vacas con alto valor genético, particularmente cuando se emplean protocolos de sincronización folicular previos a la aspiración. A lo largo de las décadas, la utilización de FSH convencional en protocolos de hiperestimulación folicular ha enfrentado desafíos, como la necesidad de múltiples dosis para mantener su actividad biológica y el riesgo de contaminación y variabilidad entre lotes. En respuesta a esto, las gonadotropinas recombinantes, como la FSH recombinante bovina (FSH-rb), han surgido como una alternativa prometedora. La FSH-rb, purificada por cromatografía de afinidad, ofrece una mayor pureza y estabilidad hormonal; por lo que en esta investigación experimental se evaluó el uso de FSH-rb en la estimulación folicular de vacas Holstein, comparándolo con la sincronización hormonal estándar. Los resultados sugieren que la FSH-rb comparado con el protocolo control no generó diferencias significativas en el desarrollo folicular y por ende en la tasa de recuperación, sin embargo, si se observan diferencias numéricas (FHS-rb= 50,63 + 19,22; Control= 45,85 + 19,22); de la misma manera la tasa de recuperación ovocitaria de acuerdo a la categoría, se observa una similitud en los resultados, resaltando la categoría I y II como más recuperados. Este enfoque podría representar un avance significativo en la siguiente etapa, es decir, en la producción de embriones in vitro en la ganadería láctea, mejorando la eficiencia y la rentabilidad del proceso.

Palabras clave: FSHrb, OPU, Estimulación Folicular, Reproducción

ABSTRACT

Ultrasound-guided follicular aspiration has been recognized as an effective technique for obtaining high-quality oocytes in cows with high genetic value, especially when combined with prior follicular synchronization protocols. Over the decades, the use of conventional FSH in follicular hyperstimulation protocols has faced challenges, such as the need for multiple doses to maintain its biological activity and the risk of contamination and variability between batches. In response to this, recombinant gonadotropins such as recombinant bovine FSH (rFSH) have emerged as a promising alternative. Purified by affinity chromatography, rFSH offers higher purity and hormonal stability. In this experimental research, the use of rFSH in follicular stimulation of Holstein cows was evaluated, and it was compared with standard hormonal synchronization. The results suggest that rFSH, compared to the control protocol, did not yield significant differences in follicular development and consequently in the recovery rate. However, numerical differences were observed (rFSH= 50.63 + 19.22; Control= 45.85 + 19.22). Similarly, the oocyte recovery rate based on category shows similarity in results, with categories I and II highlighted as more recovered. This approach could potentially represent a significant advancement in the next stage, specifically in the production of in vitro embryos in dairy farming, enhancing the efficiency and profitability of the process.

Keywords: rbFSH, OPU, Follicular Stimulation, Reproduction

INTRODUCCIÓN

Con la finalidad de optimizar la ganadería láctea, se han implementado diferentes biotecnologías a lo largo de los años, siendo la producción in vitro la última incorporada a esta explotación pecuaria, ya que aquella sugiere ser una de las mejores alternativas para elevar el valor genético y sobre todo mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de los bovinos (Baruselli et al., 2019).

La aspiración folicular (OPU) guiada por ultrasonido es una técnica para la recolección de complejos de ovocitos de cumulus, el cual ha demostrado ser una herramienta útil en la producción elevada de embriones bovinos in vitro a partir de vacas donantes con alto valor genético en un período de tiempo corto (Ongaratto et al., 2015).

Anteriormente la técnica de aspiración folicular transvaginal era realizada durante momentos aleatorios del ciclo estral, pero la necesidad de obtención de mayor y mejor calidad de ovocitos y sobre todo mejorar la eficacia de esta técnica, sugiere el uso de protocolos pre-aspiración (Boni, 2018). Por ello, existen protocolos que permiten la sincronización de las ondas foliculares para que la aspiración se pueda realizar durante el comienzo de la onda, por ejemplo, utilizando frecuencias de aspiración más cortas y preestimulación hormonal (Narvaez, 2020).

En los últimos 40 a 50 años que se vienen utilizando la hormona FSH convencional como protocolo de hiperestimulación folicular, sin embargo, se han derivado un sin número de inconvenientes debido a la tasa de preñez de las vacas receptoras, ya que eran necesarios alrededor de 6 embriones/animal para alcanzar su concepción siendo totalmente desfavorable para el ganadero (Hesser, et al., 2011).

La bioactividad de FSH es relativamente corta en comparación con FSH-p, siendo de 5 h y de 10 a 12 h respectivamente, lo que confirma la aplicación necesaria de varias dosis para su accionar (Wilson, et al., 2022). De la misma manera, el uso de productos derivados de la hipófisis puede provocar la contaminación con otras hormonas, problemas dentro y entre lotes y la propagación de vectores de enfermedades (Perez, et al., 2019).

En la actualidad se hace uso de un tratamiento de hiperestimulación antes de la OPU el cual permite aumentar el número de folículos aptos para la punción por sesión de aspiración y por ende una recuperación de mayor cantidad de ovocitos (Baruselli et al., 2019).

Las gonadotropinas recombinantes se han diseñado para producir variedades de FSH y hormona luteinizante a partir de una miríada de huéspedes heterólogos y los productos resultantes demuestran varios niveles de actividad biológica (Pal, 2019). Por esta razón el uso de la FSH-rb en los protocolos de estimulación serían una alternativa y ofrecer una mejor respuesta, como en la producción folicular y ovocitaria, ya que ofrecería mejores resultados en comparación con los extractos comerciales de FSH de origen animal.

Por lo cual actualmente se ha hecho uso de la hormona FSH recombinante bovina derivada de ADN (FSH0rb) como agente superovulatorio ya que es purificada por cromatografía de afinidad, lo que garantiza un nivel de pureza superior al 97% asegurando una alta actividad, potencia, homogeneidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos, esto debido a la ausencia de la LH obteniendo una alta estabilidad hormonal como la vida media en el organismo (una vida media superior a 48 h) (Gutierrez, et al., 2022).

Es por esta razón que la presente investigación de carácter experimental tuvo como objetivo principal el evaluar el uso de FSHrb en la estimulación folicular de vacas Holstein, es decir, comparar la cantidad y características morfométricas de los folículos, así como la tasa de recuperación ovocitaria; todo esto en comparación frente a un grupo control en donde no hubo estimulación.

Para la aspiración folicular frente a la sincronización (Grupo Control); así como el efecto de la hormona la cantidad y características morfométricas de folículos el cual posteriormente se comparó la tasa de recuperación y calidad de ovocitos obtenidos por OPU de vacas estimuladas con FSHrb frente al grupo Control y finalmente se estableció la competencia e integridad de los ovocitos provenientes de vacas estimuladas con FSH-rb.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Anatomía y fisiología del tracto genital de la hembra bovina

2.1.1 Vulva: está conformada por los labios mayores, menores y el clítoris, su función se basa en aislar la vagina del exterior y sobre todo forma parte del canal del parto.

2.1.2 Vagina: Parte genital cuya estructura forma parte del canal del parto quienes poseen glándulas estrictamente localizadas encargadas de la lubricación y humectación de la zona; también permite la recepción del pene y descarga de los gametos masculinos durante la monta natural; en esta zona se ubica el divertículo suburetral y la uretra (Dejarnette & Nebel., 2018).

2.1.3 Cérvix: También denominado cuello uterinos cuya característica principal es la presencia de anillos de colágeno revestidas de moco cervical, en donde su función consiste en formar una barrera biológica y física importante impidiendo el ascenso de los patógenos desde el tracto genital inferior hasta el útero (Osei et al., 2020).

2.1.4 Útero: Conforman la unión entre el cérvix cuernos uterinos con una longitud de 1 a 5 cm, posee 3 capas de tejido el cual el externo se denomina perimetrio o serosa, la intermedia o también mucosa y internamente el endometrio el cual se caracteriza por poseer proyecciones circulares de nombre carúnculas; durante la inseminación artificial, el útero conforma el lugar para depositar el semen (Boeta et al., 2023).

2.1.5 Cuernos uterinos: tienen la función de recibir al embrión en desarrollo y permitir que ocurra el proceso de implantación y desarrollo hasta el momento del parto. Los cuernos uterinos están separados entre sí por el tabique intercornual, pero son sostenidos por el mesometrio o ligamento ancho y el ligamento intercornual (Alvarado et al., 2016).

2.1.6. Oviductos: posee una forma tubular y longitud de 25 cm y cumple la función de transportar los óvulos, estos órganos se dividen en 3 porciones, siendo la primera el istmo cuya función es la de reservorio para los espermatozoides; la segunda porción denominada ámpula en donde se produce la fecundación y finalmente el infundíbulo que consiste en una estructura expandido en forma de embudo que rodea el ovario, su borde presenta veintiuno proyecciones filiformes que constituyen la fimbria y la

apertura se llama ostium Este es el encargado de recibir el óvulo cuando es expulsado del ovario (Mancheno, 2022).

2.1.7. Ovarios: tienen forma ovoide y son pares ubicados a lado del útero mediante ligamentos, siendo el derecho un poco más grande que la izquierda causa de su funcionalidad, este órgano está compuesto por la corteza y la médula, en donde en la superficie sobresalen los folículos y cuerpo lúteo que son los más importantes, mientras que en el interior posee tejido conectivo denso y vascularización, su función se caracteriza en la maduración del ovocito y produce el estradiol (Narvaez et al., 2019).

3.2 Ciclo estral y ondas foliculares

Los bovinos son animales en poliestro, que consta de dos etapas, la fase folicular y la fase lútea, con una duración promedio de 21 días (17-24 días), regulada por hormonas bovinas como la hormona liberadora de gonadotropina o GnRH secretada por el Hipotálamo, hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) por la hipófisis, progesterona (P4), estradiol (E2) e inhibina por el ovario y la prostaglandina (F2 α , PGF) por el útero (Aletiga et al., 2019).

Estas hormonas actúan a través de sistemas de retroalimentación positiva y negativa. Carvajal & Martinez, (2020) mencionaron que durante el ciclo estral se producen 2-3 oleadas u ondas foliculares, teniendo como primer periodo característico la emergencia, seguida por la selección y finalmente la ovulación del folículo dominante, en donde la LH y FSH actúan como principales hormonas reguladoras en la foliculogénesis y la esteroidogénesis.

Colazo et al, (2017) afirma que durante los ciclos que constan de 2 y 3 ondas, la onda folicular aparece por primera vez el día de la ovulación (día 0); en bovinos que poseen un ciclo de 2 ondas la segunda oleada se da el día 9 o 10 y el día 8 o 9 en animales con un ciclo de 3 ondas ya que la última oleada ocurre el día 15 o 16.

Las ondas foliculares presentes en la fase lútea del ciclo estral permanecen anovulatorias hasta la disolución lútea; Posteriormente, el folículo dominante de esta onda se convierte en el folículo preovulatorio; pero para que ocurra la ovulación, las concentraciones de P4 deben disminuir (gracias a la luteólisis) y las concentraciones

de E2 deben incrementarse para proporcionar retroalimentación positiva, lo que desencadena el aumento de LH necesario para la ovulación, que ocurre aproximadamente 27 a 28 horas después de ese pico.

3.3 Técnica de la Aspiración Folicular guiada por ultrasonografía

Para realizar correctamente la técnica de aspiración folicular en las hembras bovinas, es necesario un equipo de ultrasonido, una sonda sectorial, una bomba de aspiración y finalmente un sistema de guía de la aguja.

El transductor de ultrasonido para la OPU está diseñado para que la aguja pueda manipularse fuera del animal y el transductor pueda contactar con el ovario y de esta forma, se puede visualizar la punta de la aguja cuando entra en el folículo que se pretenda aspirar (Grajales, et al., 2018).

La aguja se conecta a una bomba de vacío mediante un tubo de plástico o silicona que permite vaciar el contenido del folículo directamente en un filtro similar a los que se utilizan para la recogida de embriones. Primero se debe sedar a la hembra seleccionada con una dosis de xilacina y anestesia epidural mediante lidocaína concentrado al 2% antes de comenzar a trabajar, luego procedemos a limpiar y desinfectar zona de la vulva y el perineo (Alvarado, et al., 2020).

Cuando se completa el protocolo de higienización, se inserta una sonda adjunta a un sistema de guía de aguja. No se necesita meter la mano en el canal vaginal para esto. Las cabezas de los transductores deben colocarse a ambos lados del cuello uterino, según el ovario que se vaya a perforar. Luego, la mano izquierda se inserta a través del recto y el ovario se sujeta al cabezal del sensor para que el folículo y la aguja también se puedan visualizar en la pantalla de la máquina de ultrasonido (Giraldo, et al., 2017).

La trayectoria de la aguja se puede mostrar continuamente en la pantalla de ultrasonido, lo que nos permite determinar los folículos ováricos para una aspiración exitosa. Después de posicionar mediante ultrasonido el folículo que se va a aspirar, se debe impulsar la aguja suave y lentamente para que pase a través de la pared vaginal y del folículo, una vez logrado esto, se activa una bomba de vacío, que aspira el

contenido y lo coloca en un filtro o recipiente de embriones preparado previamente (Meza, et al., 2023).

En cualquier caso, estos deben contener un medio de aspiración heparinizado (PBS + suero fetal bovino al 10%). Luego, los ovocitos se procesan de la misma manera que en la fertilización in vitro (Nava & Hernández, 2005)

3.4 Calidad ovocitaria

Uno de los aspectos que afectan directamente a la calidad del oocito en las vacas lecheras de la raza Holstein es la baja fertilidad, aspecto que ha sido sustentado en base a varios estudios quienes mencionan que, la herencia no está asociada con la tasa de fertilidad; no obstante, otras indagaciones han relacionado la baja fertilidad con causas dietéticas, balance energético negativo, mala condición física, dietas hipocalóricas, urea y nitrógeno como toxicidad y niveles vitamínicos y minerales relativamente bajos (Idrovo, 2020).

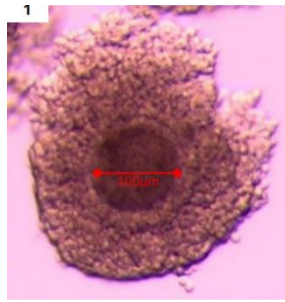
Se deben considerar distintas estrategias para incrementar la tasa de recuperación ovocitaria, que incluyen: mantener un nivel de vacío de 36 a 49 mmHg, ya que una presión elevada aumenta el número de ovocitos no viables; para prevenir la formación de coágulos en el complejo cumulus es necesario concentraciones de heparina entre 4 y 5 UI/ml en el medio de recolección; Las vacas donantes deben ser preestimuladas con hormonas para aumentar el número de folículos y ovocitos para la aspiración, cuyo tamaño medio debe ser de 2 mm de diámetro, porque los ovocitos más pequeños no se desarrollan normalmente (Alvarado et al., 2016).

3.5 Clasificación de los ovocitos

La clasificación basada en la calidad de los ovocitos es de acuerdo a las características morfológicas visuales, teniendo en cuenta la homogeneidad del citoplasma, la zona pelúcida integra y el número de capas que forman las células del cúmulo (Duma, et al., 2019). Los parámetros de selección ovocitaria se define o clasifica en 4 grados siendo estos los siguientes:

2.5.1. Grado 1: El ovocito tiene al menos 3 capas de células del cúmulo, el citoplasma está teñido uniformemente y no contiene pigmento (Alvarado et al 2016).

Figura 1. Ovocito de primer grado



Fuente: (Demetrio & Barfiel, 2021).

2.5.2. Grado 2: Los ovocitos poseen alrededor de 1 a 3 capas de complejos cúmulos las cuales pueden estar o no completas mientras que el citoplasma permanece uniforme (Alvarado et al, 2016).

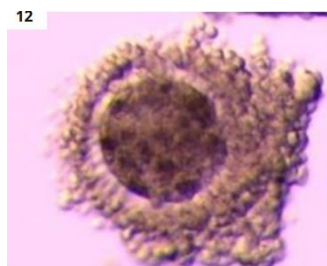
Figura 2. Ovocitos de segundo grado



Fuente: (Demetrio & Barfiel, 2021).

2.5.3. Grado 3: Ovocito sin presencia de células del cúmulo como tampoco de pigmentación citoplasmática (Alvarado et al., 2016).

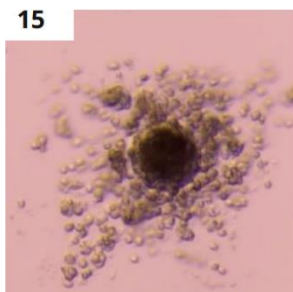
Figura 3. Ovocitos de tercer grado



Fuente: (Demetrio & Barfiel, 2021).

2.5.4. Grado 4: Los ovocitos contienen células de cúmulos en estado maduro, pero estas están fibrosadas y cuyo citoplasma es de pigmentación oscura (Alvarado et al, 2016).

Figura 4. Ovocitos de cuarto grado



Fuente: (Demetrio & Barfiel, 2021).

3.6 FSH recombinante bovina (FSHrb)

La tecnología del ADN recombinante es un avance farmacológico importante en la producción de rFSH. Este método utiliza procesos biológicos capaces de codificar las dos subunidades de FSH, creando formas recombinantes de la hormona, lo que le permite inducir una respuesta superovulatoria sin LH exógena. Sin embargo, lograr modificaciones postraduccionales apropiadas, como la glicosilación, es un desafío importante en la producción de estas proteínas recombinantes para aumentar su actividad biológica y su vida media, ya que la glicosilación adecuada ayuda a proteger la hormona de la degradación enzimática en el torrente sanguíneo, reduciendo el aclaramiento renal y hepático (Baruselli et al, 2023)

La bcsrFSH es una bio variante mejorada de FSH bovina. Se desarrolló una variante de la secuencia genética de FSH bovina recombinante monocatenaria (bscrFSH) considerando las subunidades alfa y beta de *Bos taurus* unidas a dos sitios potenciales de N-glicosilación a través de un péptido espaciador flexible.

Según esta secuencia de aminoácidos, el peso molecular previsto de bcsrFSH es 26,6 kDa. Sin embargo, los 6 N-glicanos unidos a la molécula añaden entre 24 y 30 kDa adicionales. Por lo tanto, bcsrFSH es una glicoproteína de 51-57 kDa con aproximadamente el 50 % de su peso molecular derivado de oligosacáridos (Gutierrez et al., 2022).

4. METODOLOGÍA

4.0 Tipo de estudio

El presente estudio fue de carácter experimental, debido a que la información se obtuvo directamente tras la evaluación de la actividad hormonal de la FSH recombinante bovina en hembras bovinas de la raza Holstein sometidas a OPU.

4.1 Área de estudio

La presente investigación se realizó en una propiedad ubicada en la provincia de Cañar, en el cantón Biblián, cuya altitud es de 3380 msnm y presenta las coordenadas de (-2.656368, -78.90563), en el cual, la temperatura oscila de 18 a 26 ° C respectivamente y se maneja mayormente ganado de carácter lechero.

Figura 5: Ubicación geográfica del lugar donde se realizó el estudio.



Fuente : (Google Maps., 2023)

4.3 Universo de estudio

La presente investigación tomó como universo de estudio 8 unidades bovinas de la raza Holstein.

4.4 Variables

La variable independiente es el tratamiento que fue aplicado a cada grupo de bovinos; las variables dependientes son el porcentaje de cuerpo lúteo, presencia de folículo dominante, cantidad y tamaño de los folículos (mm), porcentaje de tasa de recuperación, cantidad de ovocitos totales, clasificación de los ovocitos, porcentaje de ovocitos viables e integridad de los oocitos.

4.5 Procedimiento

Fase o Etapa 1

Como primera fase se procedió a seleccionar y evaluar a las vacas donantes destinadas para el estudio, tomando en consideración los siguientes aspectos: un adecuado periodo de descanso de 45 días aproximadamente, una condición corporal de 2,5 a 3,5 y sobre todo que mantengan un alto valor genético de la raza holstein representada es su producción láctea de 25 litros diarios en promedio de todas las vacas donantes; de la misma manera se adquirieron todos los materiales necesarios para la OPU, como también la hormona FSH-rb para la estimulación folicular.

Fase o Etapa 2

Una vez adquirido todos los materiales necesarios para la investigación, se procedió a iniciar con el trabajo de campo, que consistió en dividir en dos grupos de trabajo; el grupo A con la aplicación de la hormona FSH-rb para la estimulación folicular y el grupo B sin aplicación hormonal o llamado también grupo control.

Una vez separado los dos grupos de trabajo que constan de 4 unidades bovinas aleatorias cada una, se inicia con el protocolo de sincronización, que se detalla a continuación:

Día 0: ubicación de un dispositivo intravaginal de progesterona activa (1,3 mg), más 2 mg de Benzoato de estradiol (E2) y 2 ml de PGF2 alfa vía intramuscular en los 2 grupos de trabajo

Día 3: aplicación de la hormona FSH-rb (75µg x unidad bovina) en el grupo A.

Día 5: retiro del implante de P4 e iniciación de la OPU detallada en la Fase 3.

Cabe mencionar que se aplicó un diseño cruzado de 2 x 2 en cuanto al tratamiento hormonal, teniendo un total de 4 repeticiones, en donde hubo un intervalo de descanso de 15 días desde la aspiración folicular hasta comenzar de nuevo con el protocolo hormonal.

Fase o Etapa 3.

Finalmente, en esta etapa se determinó la respuesta folicular, realizando un conteo de los folículos, evaluar su morfología y determinar si existe presencia del folículo dominante, cuerpo lúteo, todo esto a través mediante ecografía (Ecógrafo Mindray) para posteriormente aspirar cada uno de ellos.

Para ello se siguió el procedimiento adecuado e higienizado que consiste en los siguientes pasos:

1. Primero se debe de sedar a la hembra bovina mediante una mezcla de anestésicos los cuales son Roxicaina al 2% (3 ml) + Bupiropro al 5% (2 ml)+ Xilacina al 2 % (0,03 mg/kg) aplicada vía epidural; luego procedimos a la limpieza y desinfección de la vulva y el perineo.
2. Insertamos una sonda con un sistema de guía de aguja el cual está diseñado para que la cabeza del transductor contacte directamente con el ovario a aspirar mientras que permite la manipulación externa en el animal visualizando solo la aguja al momento de la perforación y aspiración.
3. La aguja se conectó a una bomba de vacío mediante un tubo de silicona que permite vaciar el contenido del folículo directamente en el tubo Falcon.
4. Posteriormente, la mano izquierda insertamos a través del recto y el ovario se sujeta al cabezal del sensor permitiendo que el folículo y la aguja sean visibles en la pantalla del ecógrafo.
5. Una vez visualizado el ovario y las estructuras presentes se procede a realizar el conteo y medición tanto de los folículos antrales y dominante, como también del cuerpo lúteo en caso de que esté presente.

Para la aspiración folicular impulsamos la aguja suave y lentamente traspasando la pared vaginal y folicular y una vez activado la bomba de vacío se procede a aspirar el contenido

el cual será depositado en los tubos Falcon de 50 ml los cuales ya están previamente preparados con lactato de ringer, el medio de aspirado heparinizado, amikacina y alcohol polivinílico (PVA) previamente estabilizado a temperatura de 38.5 ° C.

El resultado obtenido se filtró y se puso en una placa de búsqueda y con el estereoscopio se procedió a analizar los ovocitos que se clasificarán según su morfología.

4.6 Estadística

Para comparar las variables entre tratamientos de presencia de cuerpo lúteo y folículo dominante se utilizó la prueba de chi cuadrado y para las demás variables se realizó una comparación de promedios mediante un ADEVA al 5% de significancia. Para mostrar los datos se utilizó las tablas de contingencia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 1.- Efecto de la FHSrb sobre el desarrollo folicular y recuperación de ovocitos mediante OPU frente al grupo control.

Tratamiento	N	Folículos n	Ovocitos n	Recuperación %
FSHrb	16	14,11 ± 2,03	5,81 ± 2,29	50,63 ± 19,22
Control	16	11,40 ± 2,03	6,56 ± 2,29	45,85 ± 19,22

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

De acuerdo con la Tabla 1. en la que muestra datos obtenidos de la recuperación de ovocitos se puede apreciar una diferencia entre los dos grupos en cuanto al porcentaje de recuperación, siendo el más alto en aquel grupo en donde se realizó la estimulación folicular (50,63%); sin embargo, al comparar los datos de los dos tratamientos no se muestran diferencias significativas como tal ($p > 0,05$); resultados que son similares a los obtenidos por Morera Jiménez et al, (2022) quien utilizó un protocolo hormonal utilizando pFSH frente a al grupo control, y donde obtuvo mayor porcentaje de recuperación en el primero mencionado (44,62%); por lo contrario Aller et al. (2020) en su estudio obtuvo una tasa de recuperación COC en vacas tratadas con FSH (35,5%) menor ($P < 0,001$) que en las vacas no tratadas (70,9%).

En otro estudio realizado por Rodríguez et al. (2023), quienes sometieron a las vacas a tres tratamientos hormonales, en donde hizo uso de la hormona FHSr en el cual en un grupo se aplicó una dosis única 100 µg de FSHr, otro grupo recibió una dosis única de 150 µg de FSHr (3 días previos a la OPU) y un tercer grupo recibió una dosis de 200 mg de pFSH (Folltropin, Vetoquinol) administrado en cuatro dosis decrecientes; obteniendo una tasa de recuperación superior en el grupo control (81,9%) y similares en los grupos tratados con FSHr (F100µg= 71,1%; F150µg=74,7%) a comparación con FHSp (68%) que fue relativamente bajo ($P < 0,05$); por lo que se puede decir que este estudio no coincide numéricamente con los datos obtenidos en nuestra investigación ya que la tasa de recuperación es superior en el grupo control, contrario en nuestra investigación donde se obtuvo mejores resultado en el grupo sometido al protocolo hormonal..

La utilización de FSH-rb en la estimulación ovárica de hembras bovinas de raza Holstein con fin de producir embriones in vitro ha demostrado ser una estrategia eficaz para aumentar la tasa de recuperación de ovocitos. Por ello la administración de FSH-rb resultó en una mayor respuesta ovárica en comparación con otros tratamientos, lo que sugiere una mejora en la calidad y cantidad de ovocitos viables para la fecundación in vitro (FIV).

Tabla 2.- Tamaño de folículos antrales en vacas estimuladas con FSHrb y sin estimulación hormonal.

Tratamiento	N	Ovario Derecho (mm)	Ovario Izquierdo (mm)	Total (mm)
FSHrb	16	4,92±0,01	5,26 ± 0,01 ^a	5,09±0,01 ^a
Control	16	4,36±0,02	4,34 + 0,02 ^b	4,35±0,01 ^b

N= número de vacas. Los datos mostrados son $X \pm EE$. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias estadísticas significativas $p < 0,05$ ^(a, b)

Los datos expuestos en la Tabla 2. muestra una clara diferencia estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados en lo que se refiere al tamaño de los folículos; siendo este más notorio en el ovario izquierdo (FHSrb= 5,26 ± 0,01; Control= 4,34 + 0,02; $p < 0,05$); por otro lado el tamaño de los folículos del ovario derecho no presenta diferencias significativas (FHSrb= 4,92 ± 0,01; Control= 4,36 + 0,02; $p > 0,05$), el cual en el total provoca diferencias significativas; esto se puede relacionar a lo que plantean Giraldo et al. (2017), el cual realizó un estudio en donde obtuvo un mayor tamaño folicular en vacas estimuladas con FSH (8,4± 0,39) a comparación del grupo sin estimulación hormonal (3,8± 0,14).

Por otro lado, en un estudio realizado por Presicce et al. (2019), en el cual hizo uso de la hormona eCG revela un mayor número de ovocitos medianos (3-6 mm) en vacas estimuladas hormonalmente (1,70 ± 0,20) contrario al grupo en donde no se aplicó (0,90 ± 0,18), confirmando que el uso de hormonas ofrece mejores resultados en tratamientos como la OPU.

Por lo tanto, la aplicación hormonal previo a la OPU como la FSH porcina y eCG promueve el crecimiento folicular por ende ofrece mejores resultados en tratamientos.

Aunque la hormona FHS_p ofrece resultados positivos en el crecimiento folicular evitando la atresia en los mismos, la eCG estimula la esteroidogénesis, crecimiento folicular y maduración a causa de su actividad tanto de FSH como LH incluyendo también una vida media de 46 h por lo cual solo es necesaria una única dosis (Noal et al., 2018).

Tabla 3.- Morfología y presencia del cuerpo lúteo y folículo dominante entre dos grupos de estudios (FHS_{rb} vs Control).

Tratamiento	N	Presencia Folículo Dominante n (%)	Tamaño Folículo Dominante (mm)	Presencia de Cuerpo Lúteo n (%)	Tamaño de Cuerpo Lúteo (mm)
FHS _{rb}	16	7 (43,8)	12,9± 1,70	3 (18,8)	14,4 ± 2,40
Control	16	9 (56,3)	13,4± 0,80	5 (31,3)	20,8 ± 2,07

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

Como se muestra en la Tabla 3, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dos tratamientos hormonales en la presencia y tamaño de tejido lúteo y folículo dominante, pero es importante enfatizar que ya existe una diferencia numérica, ya que es notable un mayor porcentaje de estas estructuras mencionadas en el grupo sin tratamiento hormonal (FD = 56,3%; CL = 31,3%).

La inducción de PGF₂ α se empleó al inicio del tratamiento hormonal con el fin de causar luteolisis el cual permite la fácil identificación y aspiración de pequeños folículos antrales debido a la ausencia del parénquima ovárico ocupado por el CL; sin embargo en el presente estudio se determinó su presencia que aunque no muestra diferencias significativas si son de carácter numérico, siendo mayor en el grupo control (31,3%) que el que posee tratamiento hormonal con FSH-rb(14,4%); dichos resultados que son refutados por el estudio realizado por Barboza et al. (2017) en donde encontraron mayor porcentaje de CL en el grupo previamente estimulado (19,7%) frente al control (17,1%).

En cuanto al tamaño del folículo dominante, Solís et al. (2019) realizó un estudio con respecto a la dinámica folicular en vacas sincronizadas, pero no estimuladas

hormonalmente, en donde obtuvo un diámetro del folículo dominante ($12,70 \pm 0,64$) significativamente diferente a nuestra investigación en cuanto al grupo control ($13,4 \pm 0,80$) durante la primera onda folicular.

Tabla 4.- Clasificación de la calidad ovocitaria en vacas tratadas con FHSrb y en no tratadas hormonalmente.

Tratamiento	N	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3	Calidad 4
FSHrb	16	$3,64 \pm 0,76$	$3,27 \pm 1,21$	$1,18 \pm 0,48$	$1,55 \pm 0,48$
Control	16	$3,00 \pm 0,69$	$4,56 \pm 1,33$	$2,00 \pm 0,53$	$1,11 \pm 0,53$

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

De acuerdo con los datos obtenidos en la Tabla 4, no se evidencia diferencias significativas ($p > 0,05$) en los resultados entre los dos protocolos hormonales, pero, si se demuestra una mayor recuperación de ovocitos grado I en aquellas estimuladas con FSHrb; contrario a una investigación realizada por Billon et al, (2018) en vacas pre-estimuladas con FHS, se obtuvo mayor número de ovocitos categoría II (35,14%), seguida de categoría I (29,13%) y finalmente categoría III (21,66%).

Otro estudio realizado por Ayala et al. (2020), observó cómo afecta el intervalo de tiempo en la estimulación ovárica con FSH/LH y en los ovocitos, obteniendo diferencias significativas en vacas estimuladas (I= 3.4 ± 0.45 , II= 3.0 ± 0.81 , III= 1.6 ± 0.64 , IV= 1.8 ± 0.44) en comparación al grupo que no recibió estimulación (I= 0.2 ± 0.45 , II= 0.4 ± 0.81 , III= 2.0 ± 0.64 , IV= 0.5 ± 0.40), en los grupos donde se realizó la OPU 48hs posterior a la aplicación hormonal; por lo que se puede deducir que dichos datos coinciden parcialmente a nuestra investigación debido a que la estimulación mediante hormonas permite recuperar ovocitos de mayor calidad; aunque durante nuestra investigación no se encontraron diferencias significativas, este si se presenta en el estudio antes mencionado.

Estrella et al. (2017), realizó un estudio para evaluar la calidad de ovocitos según el tamaño del folículo del cual son recuperados, estableciendo que los ovocitos de categoría A y B presentan mayor porcentaje (66.0 ± 2.23) y provienen de folículos de 4 a 8 mm; corroborando con nuestra investigación en donde se obtuvo mayor número

de ovocitos en las categorías antes mencionadas, recalcando que el tamaño promedio de los folículos es mayor a 4 mm (FSHrb=5,09 \pm 0,01; Control= 4,35 \pm 0,01).

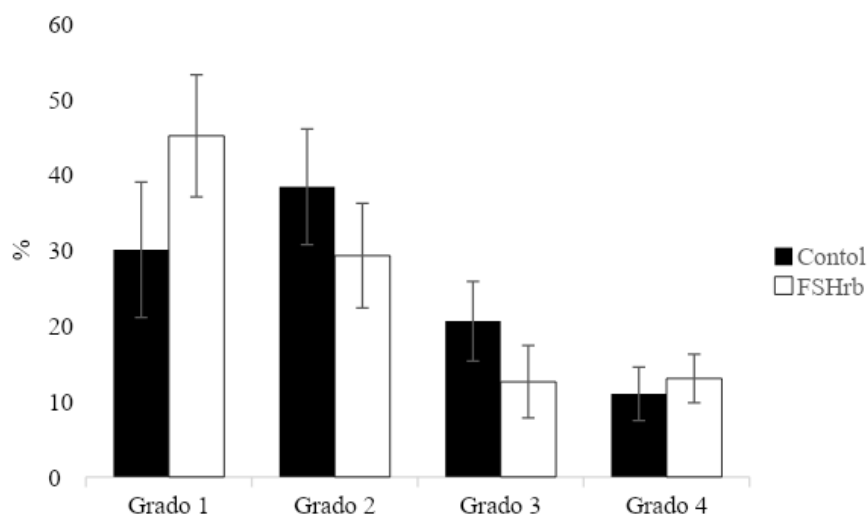


Figura 6.- Esquema general del porcentaje de ovocitos recuperados mediante aspiración folicular (OPU) en bovinos estimuladas hormonalmente (FSHrb) comparado al grupo control.

La figura 6 muestra los datos en base a la Tabla 4 el cual se observa el número de ovocitos según su grado en cada protocolo hormonal; visualizando una mayor cantidad de ovocitos grado I en el protocolo con FHS-rb, dicha cantidad va descendiendo progresivamente en la categoría II y III y manteniéndose en el IV; a diferencia del grupo control en donde el mayor número de ovocitos corresponde a la categoría II. Por lo que se puede deducir una mejor respuesta ovocitaria en vacas pre-estimuladas hormonalmente.

6. CONCLUSIONES

En vista de que han surgido nuevas alternativas para el mejoramiento genético en ganado bovino, siendo estas alternativas la producción de embriones in vitro; la presente investigación realizada mediante el uso de FSHrb en cuanto a la respuesta folicular para posteriormente realizar la aspiración en un dos grupos de estudios donde se hizo uso de un diseño cruzado 4X4, se determinó que dicha hormona no causó resultados estadísticamente significativos en cuanto a la cantidad de los folículos, sin embargo, sus características morfométricas fueron mejores en aquellas tratadas hormonalmente. Por otro lado, en cuanto a la tasa de recuperación ovocitarias y la clasificación de estos, se puede concluir que los resultados obtenidos presentan mucha similitud, pero diferencias numéricas; estos resultados pueden ser debido al tamaño de la muestra experimental debido a que el tratamiento ofrecerá mejores resultados en una población mayor.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aller Atucha, J. F., Callejas, S., & Alberio, R. (2020, septiembre). Calidad morfológica de ovocitos obtenidos in vivo en diferentes ondas foliculares de vacas tratadas con FSH. *Tauro*, 22(87), 24-33. 20.500.12123/7927
- Alvarado, A. E., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillan, V. (2016). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Anales Científicos*, 77(1), 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>
- Alvarado, J., Argudo, D., Iñiguez, U., Bueno, P., Mendez, M., Soria, M., Perea, F., & Galarza, D. (2020). Morphometric and functional analysis of bovine oocytes obtained from abattoir ovaries and by transvaginal follicle aspiration in creole cows of the Ecuadorian Andean highland. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838>
- Arechiga, C., Cortes, Z., Hernandez, P., Flores, G., Rochin, F., & Ruiz, E. (2019). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico Veterinario*, 9. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Ayala, L., Samaniego, J., Argudo, D., Perea, M., Perea, F., Rodas, E., & Nieto, 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). 10.15381/rivep.v31i1.17571
- Ayala, L. E., Pezantes, J. L., Rodas, E. R., Dutan, J. B., Calle, G. R., Murillo, Y. A., Vazquez, J. M., Nieto, P. E., Ortega, V. V., & Samaniego, J. X. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, 68(242), 184-190.
- Barboza, J. C., Machado, R., Maturana, M., Naves, J., Satin, T., Pugliesi, G., & Hoffman, E. (2017, Marzo 1). 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. 10.1016/j.theriogenology.2016.11.016
- Baruselli, P. S., Elliff, F. M., Silva, L. G., Catussi, B. L.C., & Bayeux, B. M. (2019, abril-junio). Estrategia para aumentar la producción de embriones en bovinos. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 43(2), 315-326. [http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20\(RB813\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20(RB813).pdf)
- Baruselli PS, de Abreu LÂ, Catussi BLC, Oliveira ACDS, Rebeis LM, Gricio EA, Albertini S, Sales JNS, Rodrigues CA. (2023 Sep 4). Use of new recombinant proteins for ovarian stimulation in ruminants. *Anim Reprod.*; 20(2):e20230092. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0092. PMID: 37720727; PMCID: PMC10503889.
- Billón, M., Lopes, J., Aguilar, H., & Ruiz, S. (2018). Protocolo de estimulación ovárica para incrementar la calidad de los ovocitos bovinos obtenidos por OPU. *Anales de Veterinaria de Murcia*;, 34, 73-74. <https://www.proquest.com/scholarly-journals/protocolo-de-estimulación-ovárica-para/docview/2500011592/se-2>
- Boeta, M., Balcazar, A., & Cebon, J. L. (2023). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (Segunda Edición ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Boni, R. (2018). Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 9(3), 362-369. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a605af7783717068b46f3>
- Britos, A., Acosta, T. J., Roman, R. D., Gimenez, F. D., & Dominguez, R. A. (2020). Manual de transferencia de embriones. *CONACYT*, 1-31. https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload_editores/u454/Manual_de_transferencia_de_embryones.pdf
- Carvajal, A., & Martinez, E. (2020). El ciclo estral en la hembra bovina y su importancia productiva. *INIA*, 1-4. http://www.puntoganadero.cl/imagenes/upload/_5f739ec4a0051.pdf
- Colazo, M. G., & Mapletoft, R. (2017). Fisiología del ciclo estral bovino. *Ciencia Veterinaria*, 16(2), 31-35. <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1702>
- Dejarnette, M., & Nebel, R. (2018). Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina. *Select Reproductive Solutions*, 1-6. http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/97-fisiologia.pdf
- 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
- Estrella, C., Suconota, A., & Ayala, L. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *MASKANA, Producción animal*. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1499>
- Giraldo, J., Ordoñez, S., Gomez, J., & Restrepo, G. (2017). Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 6(1), 1-9. 10.22507/jals.v6n1a2
- Giraldo, J. J., Ordoñez, S., Gomez, J., & Restrepo, G. (2017, Marzo 20). Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 6(1), 20-28. 10.22507/jals.v6n1a2
- Google Maps. (2023). / . / / - Wiktionary. Retrieved June 22, 2023, from <https://www.google.com/maps/@-2.6572367,-78.9080446,849m/data=!3m1!1e3?authuser=0&entry=ttu>
- Grajales, J., Armas, R., & Solis, A. (2018). Effect of some technical and biological factors on the recuperation rate and oocyte quality obtained by follicular aspiration. *Universidad de Panama*, 1-2. https://www.researchgate.net/profile/Joseph-Grajales-Cedeno/publication/343050604_Effect_of_some_technical_and_biological_factors_on_the_recuperation_rate_and_oocyte_quality_obtained_by_follicular_aspiration/links/5f138a374585151299a6e272/Effect-of-some-te
- Gutierrez, M., Aguilera, C., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F., Cabezas, I., Sanchez, O., Garcia, M., & Rodriguez, L. (2022). Efectos de la FSH bovina recombinante de acción extralarga (bscrFSH) en la superovulación bovina. *MDPI*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/ani12020153>

- Hendriksen, P. J., Steenweng, Harkema, J. C., Merton, J. S., Bever, M. M., Vos, P., & Dieleman, S. J. (2004). Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, *61*(5), 909. 10.1016/s0093-691x(03)00278-4.
- Hinrichs, K., Kenney, D. F., & Kenney, R. M. (1990). Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *theriogenología*, *34*(1), 107-112. 10.1016/0093-691x(90)90581-d
- Idrovo, D. F. (2020). Sincronización de la emergencia para la punción folicular en vacas holstein en producción. *Universidad Católica de Cuenca*.
- Kruij, T. A., Boni, R., Wurth, Y. A., Roelofsen, M. W., & Pieterse, M. C. (1994). Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, *42*(4), 675-684. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90384-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90384-U)
- Looney, C. R., Lindsey, B. R., Gonseth, C. L., & Johnson, D. L. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *theriogenología*, *41*, 67-72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80050-0)
- Mancheno, C. A. (2022). *Principios de Fisiología Reproductiva Animal*. La Caracola Editores. <http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2023-01-18-135653-L2022-028.pdf>
- Marizancen Silva, M. A., & Artunduaga Pimentel, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, *8*(2), 247-259.
- Morera Jimenez, A., Velasco Garcia, E., Heras, S., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (Folltropin) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, *36*, 1-17. 10.6018/analesvet.538651
- Narvaez, H. J. (2020). Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyr y Holstein sobre la técnica de producción in vitro de embriones bovinos. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, *21*(3), 1-10. 10.21930/rcta.vol21_num3_art:1697
- Narvaez, J., Piedra, E., Chacho, M., Jimenez, A., Landi, B., Cabrera, C., Guzman, G., Suquitana, J., Amay, L., Rio, N., Argudo, D. E., & Perea, F. P. (2019). Características morfológicas y foliculares de ovarios bovinos con o sin un cuerpo lúteo. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, *3*(3). <http://www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/138>
- Nava, H., & Hernandez, H. (2005). Aspiración folicular transvaginal. *Programa de Reproducción Bovina*, 611-614. http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo3-s8.pdf
- Noal, B., Missio, D., Roman, I., Alves, N., Claro, I., Brum, D., & Gallas, F. (2018). Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, *195*, 284-290. 10.1016/j.anireprosci.2018.06.006
- Ongaratto, F. L., Rodriguez, P., Tribulo, A., & Bo, G. A. (2015). Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-

- oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. *Animal Reproduction*, 12(4), 876-883. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a602df7783717068b45f3/pdf/animreprod-12-4-876.pdf>
- Osei Apiah, M., Wang, J., & Lu, W. (2020). Microflora en el Tracto Reproductivo del Ganado: Una Revisión. *Agriculture*, 10(6), 232. <https://doi.org/10.3390/agricultura10060232>
- Palma, G. A. (2008). *Biotecnología de la Reproducción* (2da ed.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <http://meran.fcv.unlp.edu.ar/meran/opac-detail.pl?id1=649>
- Presicce, G. a., Neglia, G., Salzano, A., Padalino, B., Longobardi, V., Vecchio, D., De Carlo, E., & Gasparini, 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. 10.1080/1828051X.2019.1684213
- Quispe, C., Ancco, E., Solano, J., Unchupaico, I., & Mellisho, E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
- Rodrigues, C., Castro, A., Catussi, B., Rebeis, L., Pinho, P., Randi, F., & Baruselli, P. (2023). Superstimulation prior to ovum pick-up with a single dose of recombinant FSH improves in vitro embryo production in lactating Holstein cows. *Animal - science proceedings*, 14(3), 484-485. 10.1016/j.anscip.2023.03.087
- Sanchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2019). *Universidad Técnica de Ambato, Sector Ganadero*, 1-5. https://fca.uta.edu.ec/v4.0/images/OBSERVATORIO/diagnosticos/Diagnostico_N20.pdf
- Sanchez, A. O., & Ruiz, S. (2005). Aspiración Folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU), Producción In vitro de embriones (PIV) y semen sexado en la reproducción bovina. *Innovación y Tecnología en la Ganadería Doble Propósito*, 797-805. http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/innovacion_tecno/pdfs/93capitulolxix.pdf
- Solis, A., Armas, R., Morales, J., & Garcia, R. (2019). Estudio de la dinámica folicular en novillas simmental Fleckvieh. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 1(2), 55-66. https://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones_agropecuarias/article/view/497
- Solis, A., Guerra, R., Sandoya, G., & Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10), 1-16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63624631006>
- Trejo Meza, F., Souza, J., Reyes, H., Rodriguez, A., Lucero, F., & Gonzales, A. (2023). Biotecnología de la reproducción en bovinos de carne y su aplicación en el noreste de México: aspiración folicular y fecundación in vitro. *ALPA*, 31. <https://doi.org/10.53588/alpa.310564>
- Vieira, L. M. (2017). Suplementación exógena con gonadotropinas para aumentar la producción in vitro de embriones en doadoras holandesas. *Doctoral Thesis, Faculdade*

de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo.
10.11606/T.10.2017.tde-29032017-115200

Zambrano Neira, D. A., & Neira Sanchez, P. L. (2020). Actualidad en ginecología y
Obstetricia en bovinos.
<https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/8eac119b-9770-4db0-8d75-5810fedfa349/content>

AUTORIZACION

Jennifer Eliana Chauca Guamán portadora de la cédula de ciudadanía N° 0350173571. En calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Estimulación folicular con FSH recombinante bovina previo a la OPU en vacas Holstein”** 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, 15 de junio de 2024



F:

Jennifer Eliana Chauca Guamán

C.I. 0350173571