



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

***Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales***

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

**Autores:**

Walter Xavier Ordóñez Parra

CI: 0302480215

xavierord51@gmail.com

Paúl Fernando Chiza Espinoza

CI: 0302720248

paul211995@gmail.com

**Director:**

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga PhD.

CI: 0102635463

**Cuenca, Ecuador**

30-marzo-2022

**Resumen:**

En el experimento se ejecutaron dos ensayos, el primero evaluó la aparición de la nueva onda folicular posterior a una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) más implante de progesterona (CIDR® Progesterona activa 10%, 1,9 g) y 150 µg prostaglandina (PGF2α), en 8 vaquillas de raza Holstein mestiza con alto y bajo recuento de folículos antrales (RFA). Cada 24h se evaluó ecográficamente el desarrollo del folículo dominante (FD) y el día de la aparición de la nueva onda folicular, además, se valoró los niveles séricos de hormona Anti-mülleriana (AMH). En el ensayo dos se usó la información del primero, respecto al día de reinicio de onda folicular, y se valoró el efecto del protocolo sobre el número de folículos antrales entre 4 y 8 mm observados el día de la aspiración folicular guiada por ultrasonografía u *Ovum pick up* (OPU), así como el número y calidad de COC's en donadoras de alto y bajo RFA. Los animales fueron tratamiento (con BE) y testigo (sin BE) en un momento determinado, organizándose en tratamiento T1=Alto RFA con BE; T2=Alto RFA sin BE; T3=Bajo RFA con BE y T4=Bajo RFA sin BE. La combinación de Be + P4 provocó el reinicio de la onda folicular en todas las vaquillas a los  $3,8 \pm 0,25$  días. El porcentaje de recuperación de COC's del T1 ( $81,2 \pm 4,64$ ) fue mayor en comparación con T2 ( $65,1 \pm 5,99$ ); T3 ( $60,3 \pm 5,9$ ) y T4 ( $58,6 \pm 10,23$ ). La cantidad de COC's aptos para la producción de embriones *in vitro* (PIVE) en T1 fue mayor en comparación con T2, T3 y T4 ( $P < 0,05$ ). Se concluye que el tratamiento T1=Alto RFA con BE permitió obtener mayor cantidad y calidad de COC's recuperados en las sesiones de OPU.

**Palabras clave:** Onda folicular. Vaconas. Hormona Anti-mülleriana. Sincronización

**Abstract:**

In the experiment two assays were executed, the first one evaluated the appearance of the new follicular wave after a 2 mg dose of estradiol benzoate (EB) plus progesterone implant (CIDR® Active Progesterone 10%, 1,9 g) and 150 µg prostaglandin, in 8 Holstein mixed breed heifers with high and low antral follicle recount (AFC). Every 24h were evaluated by ultrasound the development of the dominant follicle (DF) and the appearance day of the new follicular wave, besides, serum levels of Anti-müllerian Hormone (AMH) were assessed. In the assay two the information of the first one was used, regarding the restart day of the follicular wave, and the protocol effect was assessed on the antral follicles number between 4 and 8 mm observed on the *Ovum pick up* (OPU) day, as well as, the number and quality of COC's in donors with high and low AFC. The animals were treatment (with EB) and control (without EB) at a certain time, organizing in treatment T1= High AFC with EB; T2= High AFC without EB; T3=Low AFC with EB and T4= Low AFC without EB. The EB + P4 combination produced the restart of the follicular wave in all heifers at 3,  $8 \pm 0,25$  days. The COC's recovery percentage of T1 ( $81, 2 \pm 4, 64$ ) was higher compared to T2 ( $65,1 \pm 5,99$ ); T3 ( $60,3 \pm 5,9$ ) and T4 ( $58,6 \pm 10,23$ ). The amount of COC's suitable for the production of *in vitro* embryos (PIVE) in T1 was higher compared to T2, T3 y T4 ( $P < 0, 05$ ). It is concluded that treatment T1= High AFC with EB allowed to obtain higher quantity and quality of COC's recovered in the OPU sessions.

**Keywords:** Follicular wave. Heifers. Anti-müllerian Hormone. Synchronization



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
a. <b>Objetivo General</b> .....	<b>21</b>
b. <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
c. <b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. Aparato reproductor de la hembra bovina.</b> .....	<b>22</b>
3.1.1. Vulva .....	22
3.1.2. Vestíbulo .....	23
3.1.3. Vagina .....	23
3.1.4. Cérvix .....	23
3.1.5. Útero .....	23
3.1.6. Oviductos .....	23
3.1.7. Ovarios.....	24
<b>3.2. Dinámica folicular</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3. Recuento de folículos por ultrasonografía</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4. Hormona Anti-mülleriana (AMH)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.5. Selección de donadoras mediante determinación de hormona Anti-mülleriana (AMH).</b> .....	<b>28</b>
<b>3.6. Protocolos de sincronización del ciclo estral para Ovum Pick Up (OPU)</b> .....	<b>28</b>
3.6.1. Benzoato de Estradiol y Progesterona .....	29
3.6.2. Prostaglandina F2 alfa .....	29
<b>3.7. Ovum Pick Up (OPU)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.8. Evaluación de los COC´s</b> .....	<b>31</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>



<b>4.1. Materiales .....</b>	<b>33</b>
4.1.1. Materiales Biológicos .....	33
4.1.2. Materiales Químicos .....	33
4.1.3. Materiales de campo.....	33
4.1.4. Materiales de Laboratorio .....	34
<b>4.2. Métodos y técnicas empleadas .....</b>	<b>35</b>
4.2.1. Área de estudio.....	35
4.2.2. Diseño experimental .....	36
4.2.3. Determinación de variables en el experimento 1.....	37
4.2.4. Determinación de variables experimento 2 .....	38
4.2.5. Análisis estadístico .....	41
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. Resultados del objetivo 1 .....</b>	<b>42</b>
5.1.1. Día de reinicio de la onda folicular:.....	42
5.1.2. Comportamiento del folículo dominante y el cuerpo lúteo post-protocolo de reinicio de onda folicular:.....	43
<b>5.2. Resultados del objetivo 2 .....</b>	<b>44</b>
5.2.1. Valores medios del número de folículos antrales con medidas entre 4-8mm presentes en los cuatro tratamientos:.....	45
5.2.2. Valoración de la calidad de los ovocitos recuperados.....	48
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aparato reproductor de la hembra bovina. ....	22
<b>Figura 2.</b> Desarrollo folicular.....	25
<b>Figura 3.</b> Clasificación morfológica de los COC's.....	32
<b>Figura 4.</b> Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental "NERO" .	35
<b>Figura 5.</b> Protocolo de valoración de reinicio de la nueva onda folicular .....	37
<b>Figura 6.</b> Protocolo de sesiones de OPU en los grupos de alto y bajo recuento de folículos antrales tratamiento (RFA) .....	40
<b>Figura 7.</b> Valores medios y error estándar del día de reinicio de la onda folicular en el grupo de alto y bajo recuento de folículos antrales; así como en forma general .....	42
<b>Figura 8.</b> Valores promedios del tamaño del folículo dominante y del cuerpo lúteo, en los días de valoración del protocolo, hasta el día de reinicio de la nueva onda folicular .....	44
<b>Figura 9.</b> Valores medios de los folículos antrales con medidas entre 4 y 8mm, presentes el día de la sesión de OPU en cada uno de los tratamientos ...	46
<b>Figura 10.</b> Valores medios del total de complejos cumulus ovocitos recuperados (COC's) en las sesiones de OPU en cada uno de los tratamientos.....	47
<b>Figura 11.</b> Valores medios del total de complejos cumulus ovocitos recuperados (COC's) en las sesiones de OPU (en cada uno de los tratamientos). .....	48



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Protocolo de evaluación del efecto del Benzoato de estradiol (BE) en los animales de alto y bajo recuento de folículos antrales (RFA).....	39
<b>Tabla 2.</b> Valores medios y error estándar de folículos aspirados, complejos cumulus ovocitos (COC's) recuperados del total de sesiones de OPU realizadas.....	45
<b>Tabla 3.</b> Valores medios y error estándar de los complejos cumulus ovocitos (COC's) aspirados, recuperados y cada uno de los tipos de COC's obtenidos.....	49



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

**OPU=** Ovum pick up

**BE=** Benzoato de estradiol

**COC's=** Complejo cumulus ovocito

**P4=** Progesterona

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

**RFA=** Recuento de folículos antrales

**AMH=** Hormona Anti-mülleriana

**CL=** Cuerpo lúteo

**FD=** Folículo dominante

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





## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Walter Xavier Ordóñez Parra en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 30 de marzo de 2022



---

Walter Xavier Ordóñez Parra

C.I: 0302480215



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Paúl Fernando Chiza Espinoza en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 30 de marzo de 2022



---

Paúl Fernando Chiza Espinoza

C.I: 0302720248




## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Walter Xavier Ordóñez Parra, autor del trabajo de titulación ***“Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales”***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 30 de Marzo de 2020



Walter Xavier Ordóñez Parra

C.I: 0302480215



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Paúl Fernando Chiza Espinoza, autor del trabajo de titulación ***“Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales”***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 30 de Marzo de 2020

Paúl Fernando Chiza Espinoza

C.I: 0302720248



## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a Dios Padre Todo Poderoso, por haberme guiado a lo largo de mi carrera, por darme las fuerzas para salir adelante en momentos difíciles, te agradezco por todas las bendiciones y haber echo de mí una persona de bien.

A mis padres por la confianza, el apoyo y el gran esfuerzo que han realizado a lo largo de mi educación, gracias por estar siempre a mi lado, por todos sus sabios consejos, siempre les viviré agradecidos.

A mis hermanas que son lo más preciado para mí, gracias por apoyarme y confiar en mí.

A mi compañero de tesis y mejor amigo Paúl Chiza, gracias por tu apoyo incondicional a lo largo de nuestra carrera y este trabajo, gracias por haber confiado en mí.

Finalmente, un agradecimiento sincero para mis amigos de la Universidad por su amistad y por todos los momentos inolvidables que compartimos día a día.

**Walter Xavier Ordóñez Parra**



## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por brindarme sabiduría y perseverancia para la culminación de este trabajo y por brindarme valor y fortaleza para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco infinitamente a mis padres, hermanos, demás familiares y amigos cercanos por su apoyo, dedicación, consejos y la paciencia que tuvieron todos estos años, y por ser la fortaleza en mis momentos de dificultad, gracias por cada momento, sin ustedes no sería nada.

A mi compañero de tesis y gran amigo Xavier Ordóñez, gracias por estar ahí en todos los momentos, por ser un apoyo incondicional a lo largo de este trabajo y haber confiado en mí.

Finalmente, un agradecimiento sincero para mis amigos de la Universidad por su amistad y por todos los momentos inolvidables que compartimos día a día.

**Paúl Fernando Chiza Espinoza**



## **AGRADECIMIENTOS.**

A nuestro director, profesor y amigo Dr. Luis Ayala quien bajo su tutela nos supo guiar por el camino de la sabiduría, gracias a sus consejos, apoyo incondicional, ideas y sobre todo su tiempo brindado para que esta tesis sea un sueño cumplido, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, no existe palabras para agradecerle lo que ha hecho por nosotros y habernos brindarnos la oportunidad de trabajar con usted.

A los Doctores José Luis Pesantez, Jorge Dutan, Xavier Samaniego, Fernando Perea, por la ayuda brindada en estos meses de trabajo, que con su apoyo fueron pilares fundamentales a lo largo de esta tesis, gracias por su buena voluntad.

Al personal docente y administrativo de manera especial al Dr. Gonzalo Castro y Dr. Jaime Loja de la Granja de Nero de la Universidad de Cuenca por abrirnos las puertas para trabajar con los animales, gracias por brindarnos su confianza.

A todos nuestros compañeros, amigos quienes en su momento nos ayudaron en la realización del trabajo de campo, siempre estaremos agradecidos en ustedes por su buena voluntad.

**Xavier Ordóñez y Paúl Chiza**



## DEDICATORIA

A mis padres Antonio y Elizabeth, esta tesis va dedicada para ustedes, por ser un pilar fundamental lo largo de mi carrera, gracias por todos los consejos brindados y apoyarme en los momentos más difíciles, por haberme enseñado muchos valores, el respeto y la humildad. Dios le pague por todo el amor y el cariño, los quiero mucho.

Johana y Paola, hermanas mías, gracias por el apoyo brindado, siempre estarán en mi corazón, todos mis logros serán de ustedes.

A mis abuelitos allá en el cielo Homero, Humberto y Teresa, les agradezco mucho por haberme apoyado cuando estaban a mi lado, espero que juntos estén gozando de la gloria de Dios, los extraño.

A mi abuelita Zoila por sus consejos y esfuerzo brindado, gracias a usted puedo decir que soy una buena persona. Dios le Bendiga mamita para que pueda estar muchos años más mi lado.

A todos mis familiares, que de una u otra manera me han apoyado para culminar mi carrera universitaria.

Al doctor Luis Ayala, por ser una gran persona y un buen amigo, gracias por brindarme su amistad, por su paciencia, apoyo y sabiduría durante este trabajo.

A todos mis amigos sin excluir a ninguno, de manera especial a Doménica, Juan, Paola, Ángel, Fabricio, Klever, Génesis y a grandes personas Ricardo y Paúl amigos que me brindaron su apoyo durante este proceso y con quienes compartí gratos recuerdos y experiencias.

Con mucho cariño para ustedes.

**Walter Xavier Ordóñez Parra**





## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mis padres: Eduardo y Estrella, hermanos: Cristian, Alex, Josué, Cristian y Sophia, y de manera especial a mi abuelita Carmen, por haberme apoyado en cada uno de mis pasos y enseñarme buenos valores, por la motivación constante que permitieron que hoy en día sea la persona que soy y por su amor incondicional.

Al doctor Luis Ayala por ser un gran ser humano y un excelente guía, por su paciencia, apoyo y sabiduría transmitida durante todo este trabajo.

A mis mejores amigos Diana, Jessica, Genesis, Genaro, Daniel y Xavier, por su amistad y cariño sincero e incondicional, por compartir momentos significativos conmigo y por siempre escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Fabricio, Klever, Juan, Doménica, Paúl, Ángel, Carolina, Evelin, Paola, Katherine, Francisco, Daniela y Ricardo, grandes amigos que me brindaron su afecto y apoyo durante todo este proceso y con quienes compartí gratos recuerdos y experiencias.

Con mucho cariño para ustedes.

**Paúl Fernando Chiza Espinoza**



## 1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años las biotecnologías reproductivas asociadas al ganado vacuno, como la producción de embriones *in vitro* (PIVE) han mostrado progresos significativos (Ferré et al., 2020); es así que a inicios del siglo la aspiración folicular guiada por ultrasonografía u *Ovum pick up* (OPU por sus siglas en inglés) ha sido una herramienta que ha permitido la recuperación de ovocitos *in vivo* en vacas donantes para la PIVE (Chaubal et al., 2006).

Esta biotécnica reproductiva es empleada en animales en diferentes estados fisiológicos (hembras posparto y gestantes hasta 3 meses), en vacas con trastornos reproductivos (quistes foliculares, oclusión del cérvix, etc.) y vaquillas pre-púberes (Kjelland et al., 2020). A pesar de los grandes avances en la combinación de OPU-PIVE, el porcentaje de embriones transferibles en los últimos treinta años no ha superado el 35-40% de efectividad (Lonergan & Fair, 2016). Es así, que varios estudios se han centrado en buscar estrategias que permitan mejorar y optimizar la PIVE bovina en programas a gran escala.

Una de estas estrategias se encuentra direccionada a la evaluación de la variabilidad individual que presentan las donadoras en cuanto al número de folículos antrales disponibles el momento de la OPU, ya que esta condición influye sobre la disponibilidad de COC's a ser aspirados por esta biotecnología (Ireland et al., 2011). Por lo tanto, seleccionar en forma adecuada donadoras con un alto recuento de folículos antrales (RFA) previo a la aplicación de la técnica de OPU es fundamental (Ginther, 2016).

En la actualidad la ecografía transrectal es la técnica utilizada para identificar y seleccionar donantes con un alto RFA en el marco de programas de reproducción asistida en bovino (Singh et al., 2004). Sin embargo, es una técnica que requiere equipos costosos e instalaciones adecuadas que faciliten la valoración cuidadosa de las imágenes obtenidas (Perry & Cushman, 2016), además, es necesario realizar varias exploraciones ecográficas durante el ciclo estral para determinar con exactitud el RFA (Ginther, 2016), lo que implica un manejo complicado de los animales, y según la características de manejo de



nuestras ganaderías, a veces imposible realizar ecografías seriadas para determinar el RFA (Requelme & Bonifaz, 2012).

Una alternativa a la técnica de ultrasonografía que ha resultado muy eficaz es la cuantificación de la hormona Anti-mülleriana (AMH, del inglés *Anti-müllerian Hormone*), glicoproteína de 140 kDa, de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), producida específicamente por las células de la granulosa de folículos pequeños, en crecimiento (Monniaux et al., 2010). Se ha demostrado que esta hormona tiene una relación directa con el RFA en vacas *Bos indicus* (Silva et al., 2014) y *Bos taurus* (Souza et al., 2015), así como en animales criadas en el trópico bajo y mantenidos en condiciones de producción intensiva (Sakaguchi et al., 2019), lamentablemente, no se ha encontrado información publicada sobre esta relación.

Otros factores como el tamaño del folículo dominante, la fase de la onda folicular en la cual se realiza la OPU, la categoría zootécnica del animal y el grupo genético (Sartori et al., 2001; Neglia et al., 2003) influyen en la baja cantidad y calidad de ovocito obtenidos por OPU, debido a que más del 85% de los folículos aspirados presentan algún grado de atresia (Hendriksen et al., 2000). Además, la presencia del cuerpo lúteo (CL) durante la OPU reduce el espacio para el desarrollo de los folículos y complica la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Salverson et al., 2002).

Para evitar esta gran heterogeneidad de los folículos aspirados, se busca realizar la sesión de OPU en un momento determinado del ciclo estral, mediante la aplicación de diversos protocolos de sincronización del reinicio de la onda folicular (Ayala et al., 2020).

Una alternativa en países en los cuales está permitido el uso del benzoato de estradiol (BE), es la utilización de esta hormona combinado con progesterona para provocar la atresia del folículo dominante y la aparición de una nueva onda folicular en promedio 3,2 días pos aplicación del protocolo (Ayala et al., 2020), además, es un tratamiento barato y de fácil uso en campo.



Sin embargo, hay poca información del uso de estas hormonas como factor de reinicio de la onda folicular previo a las sesiones de OPU, que determinan que la aplicación de BE permite obtener mayor número de embriones transferibles comparado con los protocolos de reinicio de la onda convencionales (Hidaka et al., 2018), además, estos autores recomiendan continuar con los estudios sobre la aplicación de esta hormona previo a la OPU para obtener datos más contundentes. Otro inconveniente que puede afectar los resultados obtenidos durante las sesiones de la OPU es la presencia del cuerpo lúteo, estructura altamente vascularizada (Argudo et al., 2020), que al ser atravesada por la aguja de punción muchas veces taponada la vía de aspiración, de allí que se considera interesante el aplicar prostaglandina, hormona luteolítica que genera la lisis del cuerpo lúteo en 24 horas en promedio.



## 2. OBJETIVOS.

### a. Objetivo General

Evaluar un protocolo hormonal como factor de reinicio de la onda folicular previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales, sobre la cantidad y calidad de COC´s recuperados

### b. Objetivos Específicos

- Seleccionar vaquillas de alto y bajo recuento de folículos antrales mediante la medición de los niveles séricos de hormona Anti-mülleriana (AMH).
- Evaluar la aparición de una nueva onda folicular post aplicación del protocolo hormonal (benzoato de estradiol + progesterona)
- Valorar el efecto del benzoato de estradiol más progesterona sobre la cantidad y calidad de COC´s recuperados en donadoras con alto y bajo RFA.

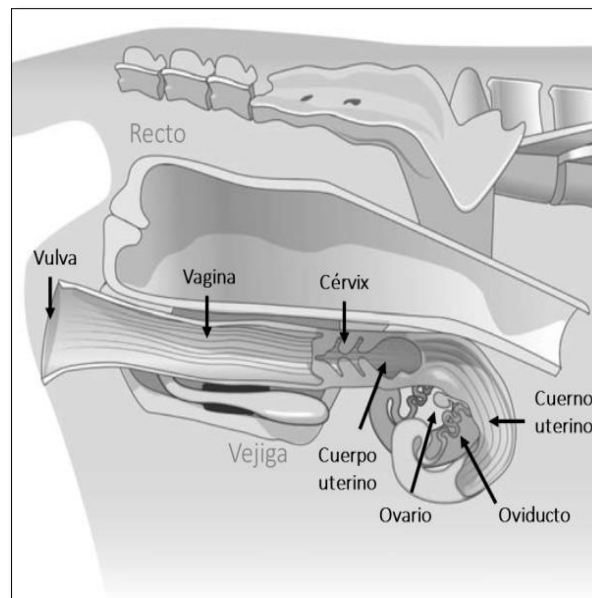
### c. Hipótesis

La administración de un protocolo hormonal basado en benzoato de estradiol más progesterona antes de la aspiración folicular guiada por ultrasonografía mejora la cantidad y calidad de COC´s recuperados en vaconas Holstein mestizas

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Aparato reproductor de la hembra bovina.

El aparato reproductor de la hembra está constituido por órganos internos (vestíbulo, vagina, cérvix, útero, oviducto, ovarios) y órganos externos (labios vulvares y clítoris), posicionados pelvi-abdominal a excepción de la vulva (Avila, 2006). También, existen estructuras anatómicas como la vejiga y el recto que sirven de guía para posicionar las estructuras del aparato reproductor.



**Figura 1.** Aparato reproductor de la hembra bovina.

**Fuente:** (Inatec, 2016).

##### 3.1.1. Vulva

Es la apertura externa del aparato reproductor de la hembra bovina. Está conformado por los labios vulvares derecho e izquierdo, los cuales miden aproximadamente 12 cm de longitud (Sánchez, 2014). La vulva alberga en su comisura ventral el clítoris, que es el homólogo femenino del pene, el cual está conformado de cuerpos cavernosos muy bien irrigados e innervados (Inatec, 2016).



### **3.1.2. Vestíbulo**

El vestíbulo es un área pequeña en la vaca que se origina en la abertura uretral y termina caudalmente para mezclarse con los labios de la vulva (Hopper, 2015).

### **3.1.3. Vagina**

Está ubicada en la cavidad pelviana horizontalmente y paralela al recto, por encima de la vejiga (Porras, 2009). El tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 centímetros, dependiendo del desarrollo corporal y el estado reproductivo de la hembra. Las paredes de la vagina son elásticas y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor. La vagina está localizada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero (Gonzalez, 2016)

### **3.1.4. Cérvix**

Conocida también como cuello uterino mide de 8 a 10 cm, forma parte del útero y es una estructura cilíndrica con bordes internos en forma de anillos (generalmente son tres) tomando la apariencia de un esfínter (Sánchez, 2014). Este diseño le facilita la protección hermética del útero del medio ambiente exterior. Durante el celo, la musculatura lisa del cérvix se relaja bajo la influencia de estrógenos (Kelly, 2014).

### **3.1.5. Útero**

Ubicado en la cavidad abdominal, órgano bicornual consta de un cuerpo y dos cuernos (derecho e izquierdo); los cuales conectan al oviducto con el cérvix (Porras, 2009). Su interior está recubierto por tres capas musculares: endometrio, miometrio y adventicia, de su interior a su capa más externa, respectivamente (Inatec, 2016). La función principal del útero es proveer el ambiente óptimo para el desarrollo fetal.

### **3.1.6. Oviductos**



Estructura tubular que conecta el útero con el ovario, cuya función es la captación del ovocito y brindar el entorno para la fertilización de este (Porras, 2009). Conformado por tres segmentos: istmo, ampulla o ampolla e infundíbulo, esta última rodea al ovario. Su forma de embudo recepta al ovocito después de la ovulación, sirve de reservorio de espermias hábiles y es el sitio donde ocurre la fecundación (Kelly, 2014).

### 3.1.7. Ovarios

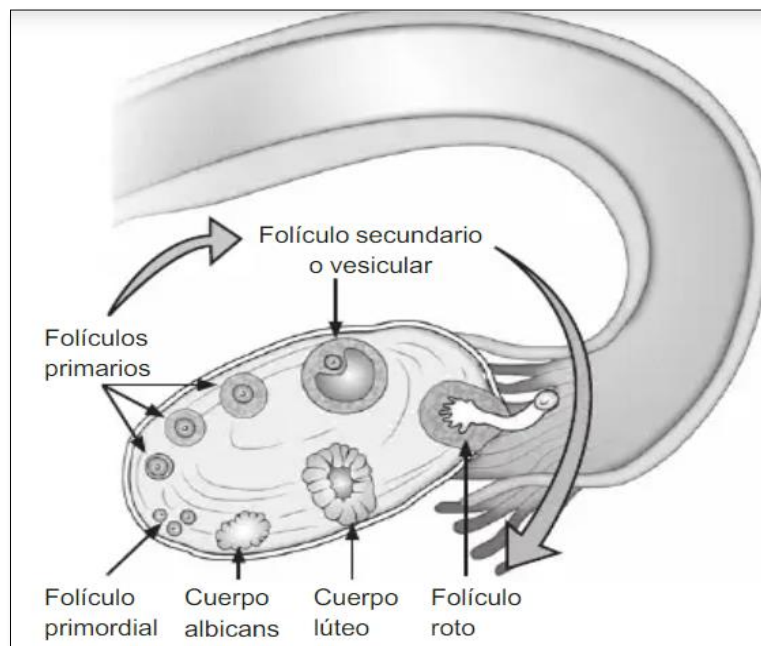
Órganos reproductores primarios con función dual, que producen ovocitos y hormonas sexuales (estrógeno, progesterona, entre otros); su tamaño y forma varían de acuerdo con la edad (Inatec, 2016). Producen ovocitos en etapas prenatales, los cuales son responsables de su maduración y del crecimiento folicular, las células de la teca y de la granulosa producen estrógenos y progestágenos a partir de la molécula de colesterol, las cuales son esenciales para el desarrollo folicular, la expresión de la conducta sexual, acción luteínica y el mantenimiento de la gestación. El ovario está compuesto por médula (parte interna) y corteza (parte externa), recubierta por la túnica albugínea, bajo esta capa se encuentra el parénquima que lo componen los folículos ováricos compuestos por células de la teca y granulosa los cuales rodean al ovocito, están localizados en la cavidad abdominal unido al peritoneo de revestimiento.

Asimismo, la presencia de folículos o cuerpo lúteo (CL) en el ovario depende de la etapa del ciclo estral en el que se encuentre el animal (Porras, 2009). Usualmente se pueden encontrar varios folículos en cada ovario que varían de tamaño, siendo estos la unidad estructural y funcional de los ovarios, cuyo interior contienen líquido donde se hallan los ovocitos en desarrollo (Kelly, 2014).

Al nacimiento, el ovario de una ternera tiene en promedio 150.000 folículos primordiales en estado de reposo, los cuales permanecen estables hasta cerca del cuarto año de vida cuando comienzan a descender. De éstos algunos crecen y únicamente el 0,05% alcanzan el estado preovulatorio (Peña et al., 2007).



El CL surge sobre el sitio de la ovulación, donde anteriormente ocupaba el folículo dominante. Puede ser palpado después del quinto día del ciclo como una estructura redonda y firme, en forma de corona, la cual sobresale del ovario (Porrás, 2009). Secreta progesterona que inactiva la actividad sexual y prepara al útero para permitir la implantación del embrión y de mantener la gestación (Rippe, 2009).



**Figura 2.** Desarrollo folicular

**Fuente:** (Inatec, 2016).

### 3.2. Dinámica folicular

La dinámica folicular tiene como finalidad el desarrollo de un folículo preovulatorio, a través de un proceso de crecimiento y regresión de los folículos antrales (Colazo & Kastelic, 2014). En el ganado bovino el ciclo estral está compuesto por una, dos o tres ondas foliculares, aunque algunos autores hablan de hasta cuatro ondas, la primera onda folicular se presenta el día de la ovulación o también conocido como el día 0, que consiste en una cohorte de folículos antrales que tienen un diámetro de 3 a 6 mm, en el cual solo uno de ellos será el dominante mientras que los demás serán los subordinados y



sufrirán un proceso de atresia, la segunda oleada de folículos en vacas de dos ondas se presenta al día 10, las de tres ondas entre los días 8 a 9 y en aquellas vacas de cuatro ondas se presenta entre los días 15 a 16 (Salinas, 2011).

Goodman & Hodgen (1983), propusieron que para describir el desarrollo de los folículos antrales se deben presentar dentro una onda folicular las fases de reclutamiento, selección, dominancia. Sin embargo, a la fecha se conoce que una onda de crecimiento folicular está compuesta de cuatro etapas: reclutamiento, selección, desviación y dominancia (Del Valle, 2008).

**Reclutamiento:** Es el desarrollo de una nueva cohorte o grupo de folículos que comienzan a madurar bajo la influencia de gonadotropinas, también se dice que un folículo antral se encuentra en la fase de reclutamiento cuando tiene un diámetro de 2 a 4 mm y después de varios días (2 a 4 días) llegara a 6 a 9 mm (Rippe, 2009).

**Selección:** En esta fase un folículo (6 a 9 mm) es elegido para llegar a ser dominante y el resto de folículos sufrirán un proceso de atresia, situación que se atribuye a la disminución de la FSH por parte del folículo dominante actuando sobre los subordinados (Palma, 2008).

**Desviación:** Esta fase ocurre cuando se inicia la diferencia en el crecimiento de los dos folículos más grandes de una cohorte. Es a partir de este momento que el folículo dominante y el primer folículo subordinado divergen gradualmente en diámetro (Del Valle, 2008).

**Dominancia:** El folículo dominante alcanza un diámetro de mayor o igual a 10mm (Del Valle, 2008) y genera un efecto de inhibición para que no se forme una nueva cohorte de folículos, con la ovulación o atresia de este folículo se genera un segundo pico de FSH permitiendo así el inicio de una nueva onda folicular (Rippe, 2009).

**Atresia:** Se presentará solo en aquellos folículos no ovulatorios y en el folículo dominante que no llega a ovular por un efecto de bloqueo de la progesterona (Palma, 2008).

### 3.3. Recuento de folículos por ultrasonografía



La presencia de varios folículos (entre 5 a 40) de 3-5 mm de diámetro indica la emergencia de una nueva onda folicular. La ovulación se confirma por la desaparición de un gran folículo ( $\geq 10$  mm), o se presume que ha ocurrido si hay un pequeño CL y por lo general una ausencia de folículos grandes (Colazo & Kastelic, 2014).

El número de folículos antrales es una característica variable en el ovario bovino, pero existe una alta repetibilidad en el recuento folicular en el mismo individuo. Se evalúa mediante ultrasonografía y no varía de forma independiente debido a la estación, número de ondas foliculares por ciclo estral o el estado de lactancia. Un recuento de folículos antrales (RFA) bajo ( $\leq 15$  folículos) se ha asociado con varios aspectos negativos de la fertilidad, como ovarios pequeños y una pequeña cantidad de folículos y ovocitos morfológicamente sanos en el ovario, rendimiento reproductivo deficiente al final de la temporada de reproducción, capacidad de respuesta reducida al tratamiento de superovulación y una pequeña proporción de embriones transferibles, concentraciones bajas de progesterona circulante y hormona Anti-mülleriana y reducción del grosor del endometrio (Amaro et al., 2020).

### **3.4. Hormona Anti-mülleriana (AMH)**

La AMH es una glicoproteína producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos en crecimiento y sus receptores se expresan en las células de los ovocitos, la granulosa y la teca. Sus funciones son: la inhibición del crecimiento folicular primordial de la reserva ovárica, evitando su agotamiento prematuro y la modulación del desarrollo folicular.

La AMH se correlaciona con el tamaño de la reserva ovárica, puede usarse para predecir la fertilidad, longevidad reproductiva (Alcívar & Arteaga, 2019). Se ha identificado esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos (Baruselli et al., 2015).

Así, la relación entre el recuento de folículos antrales (RFA), niveles de hormona Anti-mülleriana, el rendimiento reproductivo y la eficiencia de las



biotecnologías reproductivas en bovinos ha sido objeto de numerosos estudios (Sakaguchi et al., 2019)

### **3.5. Selección de donadoras mediante determinación de hormona Anti-mülleriana (AMH).**

Se ha encontrado que en los rumiantes la concentración de hormona Anti-mülleriana disminuye marcadamente cuando incrementa el tamaño del folículo, teniendo grandes concentraciones de AMH en folículos entre 3-7 mm y bajas concentraciones en folículos >7 mm de diámetro (Mossa et al., 2017). Para determinar la concentración sérica de hormona Anti-mülleriana, la técnica de ELISA tipo sándwich es la de mayor utilidad; esta técnica utiliza dos anticuerpos reactivos con diferentes epítopes del antígeno que se pretende determinar (Abbas et al., 2012).

Para realizar la técnica se prepara la superficie del pocillo una cantidad conocida del anticuerpo para identificar el antígeno buscado. Luego se agrega un anticuerpo específico primario que cumple la función de “emparedar” el antígeno. Se agrega anticuerpos secundarios ligados a enzimas para que se unan al anticuerpo primario. Posterior a esto se realiza un lavado para eliminar el anticuerpo-enzima conjugado sin consolidar. Finalmente se agrega el sustrato que se convierte en un color que se puede cuantificar (Gan & Patel, 2013).

### **3.6. Protocolos de sincronización del ciclo estral para Ovum Pick Up (OPU)**

El número de folículos disponibles para la aspiración folicular presenta grandes variaciones dependiendo de la fase del crecimiento folicular, siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación. Es por esto que los protocolos permitan sincronizar la onda folicular de modo que se pueda realizar la aspiración al inicio de esta, como son el empleo de frecuencias de aspiración más corta y pre estimulación hormonal usando benzoato de estradiol y progesterona inyectables, que son sujeto a la investigación de Solís et al. (2012) donde obtuvieron COC's aptos para la



fecundación *in vitro*, pero no encontraron diferencias significativas para número de folículos aspirados, número de COC's obtenidos y calidad de COC's recuperados, independientemente del método de sincronización de la onda folicular utilizado (punción folicular o sincronización hormonal).

Actualmente, la OPU es un procedimiento estandarizado que permite la obtención de ovocitos en cualquier momento del ciclo estral. Sin embargo, con el objetivo de aumentar las tasas de recuperación y calidad embrionaria, ha sido necesario la modificación de protocolos hormonales a fin de obtener grupos ovocitarios más homogéneos y de mejor calidad. La mayoría de los protocolos apuntan a sincronizar la emergencia de la onda folicular y a estimular el final del crecimiento folicular y tal vez inclusive favorecer la maduración de los ovocitos (Vasquez, 2016).

### **3.6.1. Benzoato de estradiol y progesterona**

El estradiol o uno de sus ésteres se han utilizado con éxito para sincronizar la aparición de ondas foliculares (Sá Filho et al., 2011). El tratamiento con estradiol exógeno durante la fase lútea induce la atresia del folículo dominante, muy probablemente al suprimir la LH y la FSH (Bó & Mapletoft, 2014; Romero et al., 2014). Todos estos sucesos biológicos, inducen la emergencia de una onda folicular sincrónica (Bó & Mapletoft, 2014).

El uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotrofinas (Chaubal et al., 2006). El protocolo más utilizado, consiste en administrar 2 mg de BE por vía intramuscular en el momento de la inserción del dispositivo intravaginal con P4 (día 0), para sincronizar el desarrollo folicular (Gimenes et al., 2008).

Los estrógenos exógenos como el BE administrados cuando existen altos niveles de progesterona inducen la regresión de un posible cuerpo lúteo en formación y la atresia del folículo dominante, dado que son potentes agentes luteolítico en los primeros días del ciclo (Romero et al., 2014).

### **3.6.2. Prostaglandina F2 alfa**



La PGF2 $\alpha$  es luteolítica natural en el ganado; la luteólisis comienza 4-6 días antes de la ovulación, el cuerpo lúteo maduro posee un circuito de retroalimentación positiva que involucra oxitocina lútea y factor de necrosis tumoral que provoca la liberación endometrial de PGF2 $\alpha$  y sostiene el proceso de luteólisis. Existe un claro equilibrio de causa y efecto entre el efecto luteotrófico de los pulsos de LH endógena y el efecto luteolítico de los pulsos de PGF2 $\alpha$ ; los pulsos repetidos de PGF2 $\alpha$  del útero superan finalmente los efectos rescatantes de la LH para completar la luteólisis (Hopper, 2015).

La capacidad de la PGF2 $\alpha$  para inducir la regresión lútea está influenciada por la etapa del ciclo estral en el momento de la inyección. Los animales de ciclo temprano (días 5-9) responden menos a PGF2 alfa que los animales de ciclo tardío (días 13-17) mientras que los animales de ciclo medio (días 10-12) tienen una respuesta intermedia (Salverson et al., 2002).

Se ha propuesto una rápida disminución del flujo sanguíneo lúteo como una de las principales acciones luteolíticas de la PGF2 $\alpha$ . En la vaca, el aumento de la liberación uterina de PGF2 $\alpha$  observado en los días 17-18 del ciclo normal se ha asociado con la luteólisis. Una inyección de una dosis luteolítica de PGF2 $\alpha$  análogo a la vaca en la etapa media del ciclo estral aumenta la producción intralútea de sustancias vasoactivas como la endotelina-1 y angiotensina II, los cuales juegan un papel importante en la cascada luteolítica (Acosta et al., 2002).

### **3.7. Ovum Pick Up (OPU)**

Es un procedimiento no invasivo por el cual se recolectan ovocitos de folículos antrales en animales vivos. Es una técnica muy utilizada en vacas adultas de varios estados fisiológicos: cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación, los que no responden a estímulos hormonales y nulíparas con un adecuado peso corporal. La recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, además permite la disminución del intervalo generacional que incrementa la eficiencia productiva (Pelaez, 2011).



La optimización de OPU está basado en la frecuencia de muestreo, recolección de una a dos veces por semana mejoró significativamente el número de ovocitos recolectados, ya sea en animales estimulados con eCG antes PMSG o en animales no estimulados. Dando como resultado un aumento en la frecuencia de las ondas foliculares o detección del ciclo estral, la maduración del folículo y la ovulación (Boni, 2012)

### **3.8. Evaluación de los COC's**

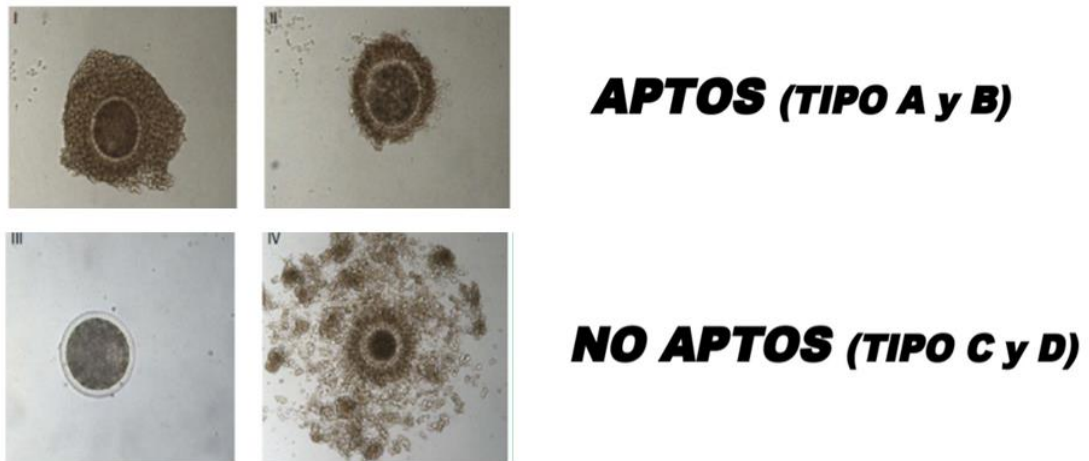
No todos los ovocitos recolectados por OPU de donantes son adecuados para su procesamiento en un sistema *in vitro*. El estado reproductivo del donante, el tamaño y la edad de los folículos individuales y la técnica OPU pueden afectar el tipo y la calidad de los ovocitos que se recuperan. En aplicaciones comerciales de FIV, los ovocitos generalmente se clasifican en uno de cuatro tipos, de los cuales solo los tipos I y II tienen una posibilidad realista de convertirse en embriones (Hasler, 2007).

El fundamento de la evaluación morfológica se basa en la observación de las características visibles de los ovocitos mediante el uso de un estereoscopio, considerando la compactación y cantidad de las células del cumulus, la homogeneidad del citoplasma y la integridad de la zona pelúcida (Leibfried & First, 1979).

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

Otra forma de clasificar a los ovocitos de acuerdo con su calidad se basa en la evaluación de su diámetro. Se sabe que la capacidad del ovocito bovino para reanudar y completar la meiosis *in vitro* está relacionada con su tamaño.

Los ovocitos menores de 110  $\mu\text{m}$  de diámetro tienen una capacidad reducida para reanudar la meiosis (Lechniak et al., 2002). Los ovocitos pequeños por lo tanto tienden a seguir un camino anormal de la maduración meiótica, lo que resulta en trastornos en el proceso de maduración y como consecuencia un potencial de desarrollo reducido de los embriones derivados de pequeños ovocitos (Majerus et al., 1995).



**Figura 3.** Clasificación morfológica de los COC's

**Fuente:** (Hasler, 2007)





## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Materiales biológicos**

- Vaquillas Holstein mestizas
- Muestras de sangre
- Complejos cumulus ovocitos (COC's)

#### **4.1.2. Materiales químicos**

- Benzoato de estradiol (Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador)
- Prostaglandina (Sincromic, Perú Vet, Lima Perú)
- Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR® Progesterona activa 10%, 1,9 g, Zoetis, Quito, Ecuador)
- Gel lubricante
- Alcohol 70%
- Kit de Elisa Bovine AMH ELISA. AL-114 (Ansh Labs. Webster. Texas. USA)
- Heparina (Heparina sódica 25,000 UI/5ml)
- Medio de recolección PBS (VIGRO® Complete Flush)
- Lidocaína (Roxicaina® 2%)
- Xilacina (Dormi-XYL® 2)
- Ringer Lactato 1000ml

#### **4.1.3. Materiales de campo**

- BD vacutainer – soporte para agujas
- Agujas vacutainer (20 G x 1,5mm)
- Tubos vacutainer 3k EDTA 4 ml
- Cooler
- Jeringas de 1, 3, 5, 10, 20 ml.
- Agujas desechables 18G y 20G (NIPRO)
- Tubos Falcón™ 50 ml
- Equipo de ultrasonido ALOKA® ProSound2 Vet



- Transductor lineal
- Transductor sectorial
- Porta sonda de ultrasonido
- Bomba de Aspiración (BV 003D, WTA®, Brasil)
- Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 18G y 20 G
- Set de mangueras
- Dispositivo para insertar los implantes de progesterona
- Guantes de inspección y chequeo ginecológico.
- Recipientes de lavado
- Torundas de alcohol
- Sustancias Jabonosas
- Toallas húmedas desechables
- Overol y botas
- Registros y plantillas de campo

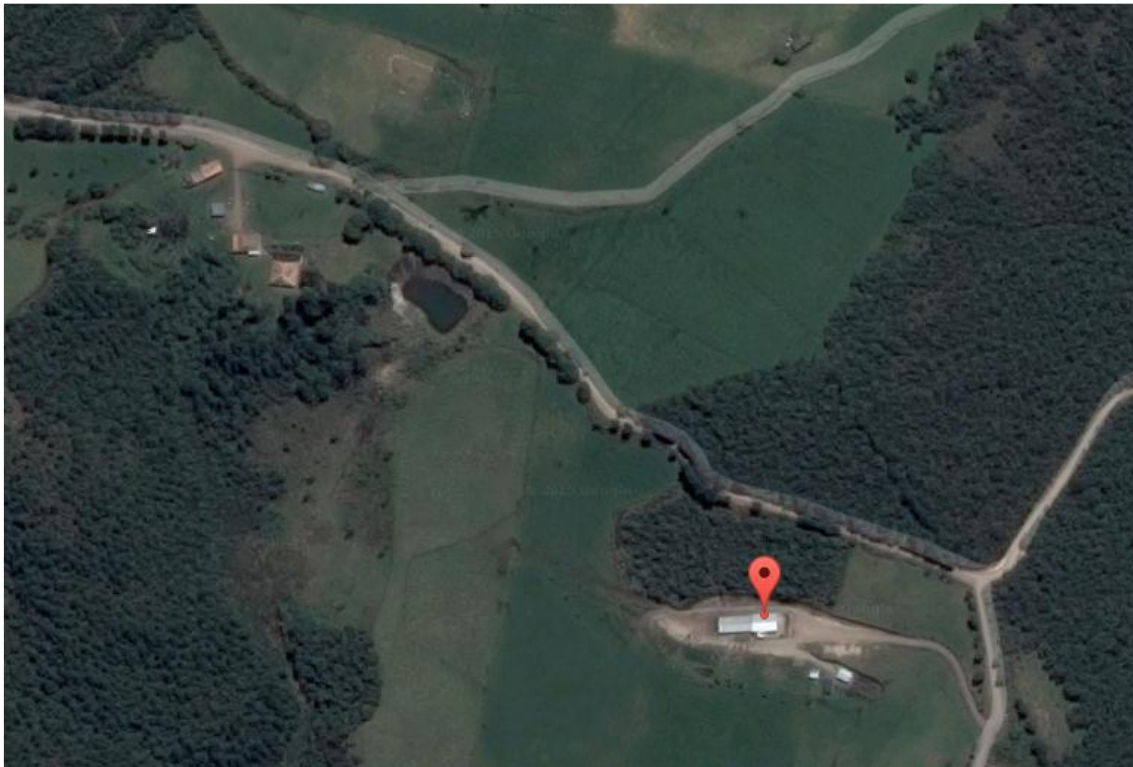
#### **4.1.4. Materiales de laboratorio**

- Micropipetas
- Puntas de pipetas automáticas
- Capilares
- Pipetas automáticas
- Placas Petri cuadriculadas
- Estéreo microscopio
- Filtro celular de 100  $\mu\text{m}$
- Tubos can 1ml
- Tubos Falcón <sup>™</sup> 50 ml
- Baño María
- Platina de calefacción
- Gradilla de laboratorio
- Lector de placas de ELISA

## 4.2. Métodos y técnicas empleadas

### 4.2.1. Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en la Granja experimental “Nero”, de la Universidad de Cuenca, ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, Parroquia Baños, sector Nero ( $2^{\circ}57'32.4''S$   $79^{\circ}06'13.2''W$ ), que se encuentra a una altitud de entre 2500 y 3100 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 7 - 8 °C y una precipitación pluvial que varía de 500-1000 milímetros (mm) anuales.



**Figura 4.** Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Experimental “NERO” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca

**Fuente:** Google Maps, 2021



#### 4.2.2. Diseño experimental

Para el estudio fueron seleccionadas un total de 8 vaquillas de raza Holstein mestizas, criadas en la granja experimental de Nero, perteneciente a la Universidad de Cuenca, ubicada sobre los 2.500 msnm, en sistemas pastoriles controlados. Estos animales fueron seleccionados en base a dos criterios:

- a) En primera instancia se determinó el número de folículos antrales  $>2\text{mm}$  existentes en los dos ovarios en un momento desconocido del ciclo estral, de acuerdo a lo descrito por Ayala et al. (2019). Con esta metodología se clasificaron en grupo 1=animales con  $>25$  folículos antrales (Alto RFA;  $n=4$ ) y en grupo 2 animales con  $<15$  folículos antrales (Bajo RFA;  $n=4$ ).
- b) Una vez realizado los grupos anteriores, el día del reinicio de la nueva onda folicular se tomaron muestras de sangre y se determinó la concentración plasmática de hormona Anti-mülleriana (grupo 1=  $>350$  pg/ml=Alto RFA y grupo 2=  $< 170$  pg/ml=Bajo RFA)

Estas 8 vaquillas en conjunto presentaron una edad media de  $21,9 \pm 0,85$  meses, peso de  $399,9 \pm 33,58$  kg, condición corporal promedio  $2,75 \pm 0,09$ , en una escala de 1-5 según lo descrito por Amaro et al. (2020). Los animales fueron diagnosticadas sanos (sin problemas reproductivos y con ciclicidad manifiesta).

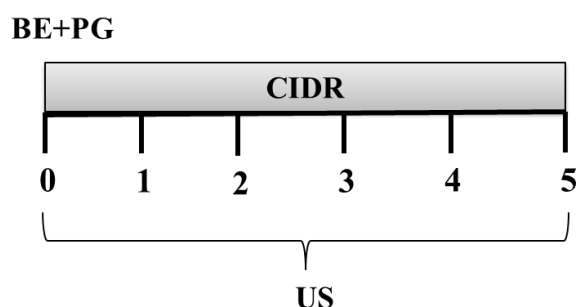
Las vaquillas de alto RFA (grupo 1;  $n=4$ ) y las de bajo RFA (grupo 2;  $n=4$ ), presentaron valores medios de edad de  $22,5 \pm 1,5$  y  $21,3 \pm 0,95$  meses; peso medio de  $441,0 \pm 58,51$  y  $358,8 \pm 26,92$  y CC  $2,8 \pm 0,13$  y  $2,6 \pm 0,13$  respectivamente, valores similares sin diferencia estadística entre los grupos ( $P>0,05$ ).

Todos los animales fueron alimentados con una mezcla forrajera de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), ray gras inglés (*Lolium perenne*) e italiano (*Lolium multiflorum*) y suplementado con concentrado a razón de 2,5 Kg/animal (**Anexo 1**), más 100g/animal de sales minerales (**Anexo 2**), 30 días antes de iniciar con el experimento los animales fueron desparasitados, vitaminados y mineralizados según lo que indica el (**Anexo 3**).

### 4.2.3. Determinación de variables en el experimento 1

#### **Protocolo de sincronización de la onda folicular:**

Para generar el reinicio de una nueva onda folicular el día 0 se aplicó 150 µg de PGF2α (Sincromic, Perú Vet, Lima Perú) vía IM; un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona (CIDR® Progesterona activa 10%, 1,9 g, Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), el implante fue retirado el día que se produjo la aparición de la nueva cohorte de folículos <4mm (**Fig.5**).



**Figura 5.** Protocolo de valoración de reinicio de la nueva onda folicular. BE= benzoato de estradiol (2 mg día 0) + aplicación de 150 µg de prostaglandina (Sincromic) y un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona (CIDR Progesterona activa 10%, 1,9 g)

#### **Determinación de los niveles de la hormona Anti-mülleriana (AMH):**

A las 8 vaquillas previamente seleccionadas se les tomó muestras de sangre (4ml) por venopunción de la arteria o vena coccígea en tubos al vacío con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (sistema vacutainer, Becton Dickinson, Meylan, Francia), en el día de reinicio de la nueva cohorte de folículos antrales (día 4 del protocolo de sincronización de la onda folicular, **Figura 5**).

Las muestras fueron colocadas inmediatamente en refrigeración dentro de un recipiente (cooler) con hielo seco, luego llevadas al laboratorio y centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante (0,25 cc) fue colocado en tubos eppendorf y congelado a -20°C hasta el día análisis.



La hormona se evaluó mediante el kit Bovine AMH Elisa AL-114 (Ansh Labs. Webster. Texas. USA), los resultados se expresan en pg/ml.

***Evaluación del comportamiento del folículo dominante y del cuerpo lúteo:***

Desde el día 0, cada 24h hasta el día 5 del protocolo se realizó ecografía transrectal con un equipo de ecografía (ALOKA® ProSound2 Vet), provisto de una sonda lineal, con una frecuencia de 7,5 MHz, basado en la técnica descrita por Ayala et al. (2019), quienes mencionan que se debe valorar los ovarios derecho e izquierdo en ese orden, manteniendo la secuencia dorsal-ventral, lateral-medial, para determinar la ubicación del folículo dominante (FD) y el cuerpo lúteo en uno de los dos ovarios. Una vez ubicadas estas estructuras se tomaron las medidas (ancho x largo dividido para dos) para determinar el tamaño diario.

***Determinación del día de aparición de la nueva onda folicular:***

Esto se realizó en forma retrospectiva al finalizar el monitoreo de la dinámica folicular descrita en el protocolo (**Fig. 5**). Para esto se consideró como día de reinicio de onda folicular, cuando una nueva corte de folículos antrales <4mm fueron observados por ecografía.

**4.2.4. Determinación de variables experimento 2**

***Grupos experimentales:***

Los grupos fueron organizados en base al número de folículos antrales (RFA) y los niveles de AMH.

- G1=vaquillas con alto RFA, n=4, con una media de  $28,8 \pm 1,38$  folículos y una concentración  $435,4 \pm 38,15$  pg/ml de AMH.
- G2=vaquillas con Bajo RFA, n=4, con una media de  $11,8 \pm 1,11$  folículos y una concentración  $145,3 \pm 20,59$  pg/ml de AMH

Cada uno de los 4 animales de estos dos grupos experimentales (G1 y G2) recibieron alternadamente: Benzoato de estradiol 2 mg adicional al dispositivo intravaginal (CIDR Progesterona activa 10%, 1,9 g) y a la prostaglandina



(tratamiento) y, además, sirvieron como testigos (testigo), quedando organizado finalmente 4 grupos de trabajo:

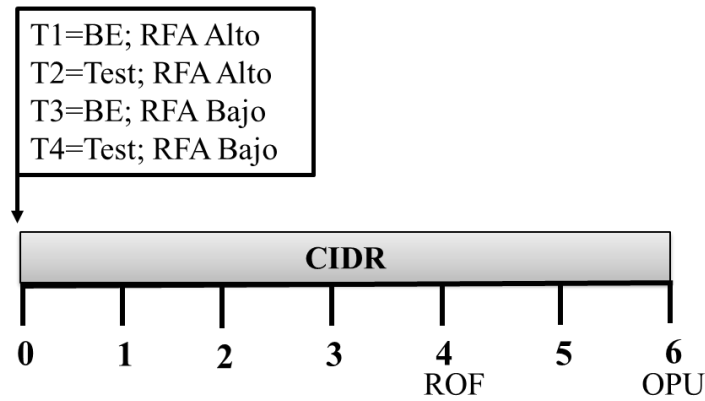
- T1=vaquillas con alto RFA, que recibieron BE
- T2=vaquillas con alto RFA, sin BE (testigo)
- T3=vaquillas con bajo RFA, que recibieron BE
- T4=vaquillas con bajo RFA, sin BE (testigo), descrito en la **tabla 1**

**Tabla 1.** Protocolo de evaluación del efecto del Benzoato de estradiol (BE) en los animales de alto y bajo recuento de folículos antrales (RFA).

	Grupo 1 (Alto RFA)				Grupo 2 (Bajo RFA)			
	Vacona 1	Vacona 2	Vacona 3	Vacona 4	Vacona 1	Vacona 2	Vacona 3	Vacona 4
1era sesión OPU	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)
<i>Intervalo 15 días</i>								
2da sesión OPU	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)
<i>Intervalo 15 días</i>								
3era sesión OPU	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)
<i>Intervalo 15 días</i>								
4ta sesión OPU	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)	Testigo (T2)	BE (T1)

### **Protocolo para la OPU**

De acuerdo a lo descrito en la tabla 1, las vaquillas recibieron sus respectivos tratamientos el día 0 y seis días después se realizó la sesión de OPU. A cada animal se realizaron cuatro sesiones de OPU, estas recibieron en dos sesiones BE y en dos sesiones fueron testigos (Detalle **Tabla 1**).



**Figura 6.** Protocolo de sesiones de OPU en los grupos de alto y bajo recuento de folículos antrales tratamiento (RFA): Todos los grupos (T1; T2; T3 y T4) el día 0 recibieron: PGF2 $\alpha$ = 150  $\mu$ g prostaglandina (Sincromic), un dispositivo intravaginal (CIDR. Progesterona activa 10%, 1,9 g) de progesterona y adicionalmente se les administró BE= 2 mg benzoato de estradiol (Tratamiento) o pasaban a ser testigos (test). ROF=día de reinicio de onda folicular. OPU=día de sesión de OPU.

#### ***Preparación de las vaconas para las sesiones de OPU:***

Previo a las sesiones de OPU, las vaconas fueron inmovilizadas en la manga, luego se realizó el vaciado del recto y se efectuó la desinfección de la zona perianal. A continuación, se ejecutó el bloqueo vía epidural con una mezcla de 0,02 mg/kg de Xilacina al 2% (Dormi-Xyl<sup>®</sup>2) y 0,3 mg/kg de lidocaína al 2% (Roxicaina<sup>®</sup> 2%). Esta mezcla fue aplicada vía epidural en el espacio intervertebral (última sacra y la primera coccígea).

#### ***Valoración de los folículos disponibles en cada sesión de OPU:***

Para la valoración de los folículos antrales con medidas entre 4-8 mm, observados el día de la OPU (día 6) se utilizó un ecógrafo ALOKA<sup>®</sup> ProSound2 Vet, equipado con un transductor sectorial de 5 MHz. Una vez visualizado los ovarios derecho e izquierdo, se procedió a realizar un barrido cráneo-ventral y latero-medial con el fin de cuantificar todos los folículos con tamaño entre 4-8 mm, este valor fue considerado como el número de folículos disponibles para la OPU.





### ***Proceso de aspiración folicular***

Se utilizó un ecógrafo ALOKA® ProSound2 Vet que contenía una guía de punción, esta guía contó con una aguja desechable 1,2x75 mm y un set de tubos; conectados a una bomba de vacío (BV 003D, WTA®, Brasil) con una fuerza de aspiración constante de 60 a 70 mm Hg a una temperatura de 37 °C.

Una vez que el equipo de OPU estuvo preparado y configurado, el casquete que contenía la sonda sectorial y la guía de punción se ingresó por vía vaginal y se procedió aspirar los folículos  $\geq 4$  y  $\leq 8$  mm, uno a la vez. El medio que se usó para la recolección de ovocitos fue PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, P-4417) suplementado con heparina (2,2 U.I/ml).

### ***Evaluación de la cantidad y calidad de los COC's:***

El material obtenido fue inmediatamente llevado al laboratorio en un tubo Falcón de 50 ml con medio de recolección (PBS+heparina) a una temperatura de 37 °C, una vez en el laboratorio se procedió a depurar el material con la ayuda de un filtro celular de 100  $\mu$ m acompañado de PBS previamente calentado a 37°C, luego los COC's fueron transferidos a una placa Petri cuadrada de 95 mm. Mediante el estereomicroscopio se realizó la clasificación morfológica de los COC's teniendo en cuenta los criterios de evaluación de Ayala et al. 2020, quienes consideran aptos para la PIVE a los COC's (A y B) y no aptos a los (C y D)

#### **4.2.5. Análisis estadístico**

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS® versión 25. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilk. La variable reinicio de onda folicular se analizó con la prueba de T de Student. El análisis de los tratamientos 1 (vaquillas con Alto RFA, que recibieron BE), 2 (vaquillas con Alto RFA, que recibieron no BE), 3 (vaquillas con Bajo RFA, que recibieron BE), y 4 (vaquillas con Bajo RFA, que no recibieron BE), fue ejecutado mediante un ANOVA y la comparación de medias en base a la prueba de Tukey al 5%.

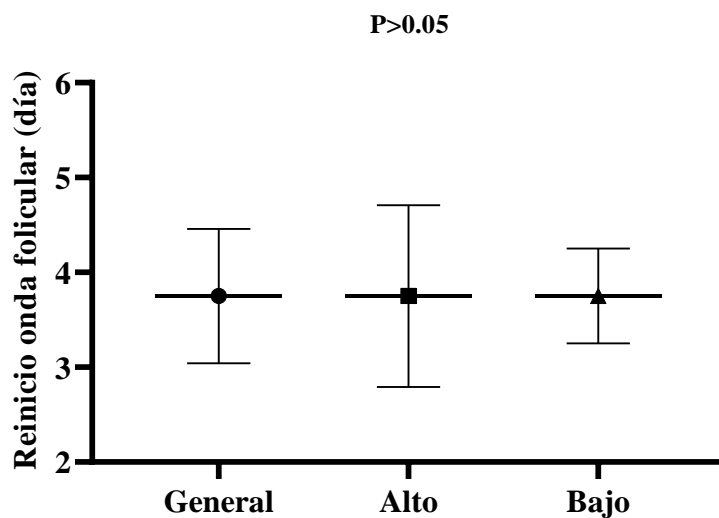
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Resultados del objetivo 1

#### 5.1.1. Día de reinicio de la onda folicular:

La combinación de progestágenos y estradiol permiten la sincronización de la onda folicular en un promedio de  $4,2 \pm 0,2$  días en vacas de leche (Bo et al., 2002). Esto debido a que el estradiol administrado luego de la aplicación de un dispositivo liberador de progesterona suprime el desarrollo del folículo antral dominante, por acción sistémica que implica la supresión de FSH (Bo et al., 1994); sin embargo, una vez que el estradiol se metaboliza la FSH aumenta en la circulación y surge una nueva onda folicular (Bo et al., 2000)

En el presente estudio se determinó reinicio de la onda folicular en todas las 8 vacas Holstein mestizas a los  $3,8 \pm 0,25$  días (**Fig. 7**: grupo general). Y al valorar este reinicio de onda folicular en los grupos 1 (animales con Alto RFA=  $3,8 \pm 0,48$  d) y grupo 2 (animales con Bajo RFA=  $3,8 \pm 0,25$  d) se observó valores similares sin diferencia estadística entre los dos grupos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 7.** Valores medios y error estándar del día de reinicio de la onda folicular en el grupo de alto ( $n = 4$ ) y bajo ( $n = 4$ ) recuento de folículos antrales; así como en forma general ( $n = 8$ ). Prueba de T de Student al 5%.

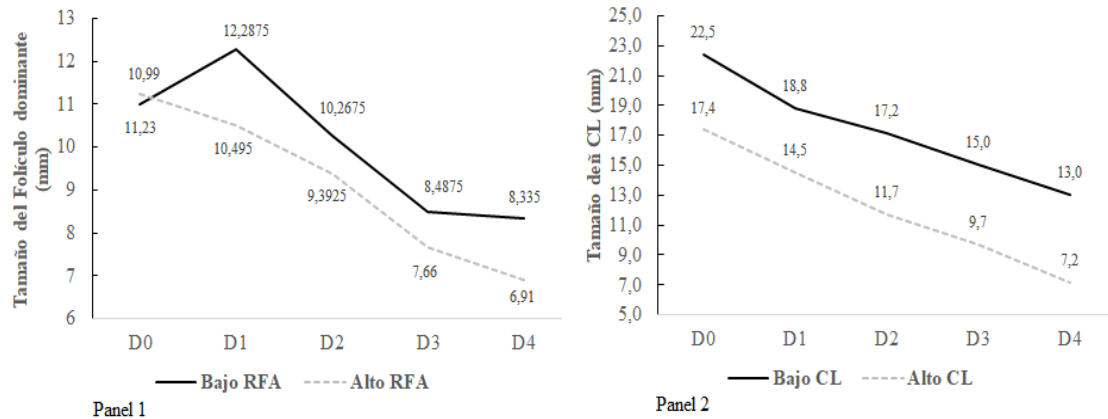
Estos resultados obtenidos son concordantes con los descritos por Ayala et al., (2020), en vaconas Holstein mestizas quienes describieron reinicio de onda a los  $3,2 \pm 0,2$  días al usar 2 mg de benzoato de estradiol más un implante liberador de progesterona el día de inicio del protocolo. En vaconas de carne (Nelore), se encuentra descrito que luego de la aplicación de 5 mg de benzoato de estradiol más un implante auricular liberador de progesterona se presenta reinicio de onda folicular entre 4 a 5 días posteriores al inicio del protocolo (Bo et al., 1994). Sin embargo, en un trabajo reciente se determinó que las vaquillas de genotipo Nelore presentaron reinicio de onda folicular a los  $5,1 \pm 0,4$  días (Silva et al., 2021), esta diferencia en el promedio de días de reinicio de la onda folicular del último estudio y el nuestro estaría ligado a la raza y al sistema de manejo de los animales valorados.

#### **5.1.2. Comportamiento del folículo dominante y el cuerpo lúteo post-protocolo de reinicio de onda folicular:**

Mediante evaluación ecográfica transrectal se determinó que el folículo dominante (FD), en las primeras 24 horas incrementó su tamaño en promedio 0,28 mm para luego disminuir 1,56 mm a día 2; 1,76 mm (día 3) hasta perder su funcionalidad en el día 4 con una disminución de 0,59 mm y dar paso al reclutamiento de una nueva cohorte de folículos  $\leq 4$  mm (**Fig. 8**). Este patrón de comportamiento del FD es similar al descrito por Ayala et al., (2020), quienes observaron un incremento inicial del FD en 0,22 mm para luego disminuir su tamaño. Además, se encuentra descrito que la combinación de estradiol más progesterona permite una acción de atresia folicular más efectiva (Bo et al., 2000).

En esta investigación, se aplicó una dosis de prostaglandina junto al BE y al implante (día 0), con la finalidad de reducir el tamaño o la presencia del CL durante las sesiones de OPU. Se observó que el cuerpo lúteo disminuyó 3,42 mm en las siguientes 24 horas pos tratamiento (**Fig. 8**). Esta estrategia se tomó en base a la función luteolítica de la prostaglandina; además, de las experiencias personales de técnicos que describen que la presencia del CL durante la aspiración folicular requiere mayor cuidado y atención por parte del técnico que

la realiza, ya que esta estructura puede dificultar la manipulación de los ovarios y el acceso a los folículos a aspirar, pudiendo producirse sangrado durante el procedimiento (Seneda et al., 2020).



**Figura 8.** Valores promedios del tamaño del folículo dominante (Panel 1) y del cuerpo lúteo (Panel 2), en los días de valoración del protocolo (D0=día de inicio; D1= día 1; D2=día 2; D3=día 3; D4=día 4), hasta el día de reinicio de la nueva onda folicular, en las 8 vaquillas en estudio.

## 5.2. Resultados del objetivo 2

En el presente estudio se observó una media de  $12,8 \pm 0,80$  folículos entre 4-8 mm en forma general en todas las vaquillas en estudio en el día de la OPU (**Tabla 2**). Con un porcentaje de recuperación de COC's/sesión del 67,2% ( $8,6 \pm 0,81$  folículos), y de estos el 63,8% fueron clasificados como aptos para la producción de embriones *in vitro* (PIVE). Este porcentaje de recuperación de COC's (63,3%) fue similar al descrito en vaquillas Criollas en sistema de manejo similares a las del presente trabajo (Ayala et al., 2018). Sin embargo, se encuentran por debajo del porcentaje de recuperación descrito para vaquillas de raza mestiza cruce entre Simmental y Nelore (Ramos et al., 2010), o el porcentaje de recuperación (78,4%) determinado para vacas negras japonesas (Hidaka et al., 2018).

**Tabla 2.** Valores medios y error estándar de folículos aspirados, complejos cumulus ovocitos (COC´s) recuperados del total de sesiones de OPU realizadas.

	n	X	DE	Mínimo	Máximo
Folículos aspirados (n)	32	12,8	4,52	5	20
COC´s recuperados (n)	32	8,6	4,50	2	20
% de recuperación	32	67,2			
COC´s Aptos (n)	32	5,5	3,65	0	14
% de COC´s aptos	32	63,8			
COC´s no aptos (n)	32	3,1	2,32	0	9
% de COC´s no aptos	32	35,9			

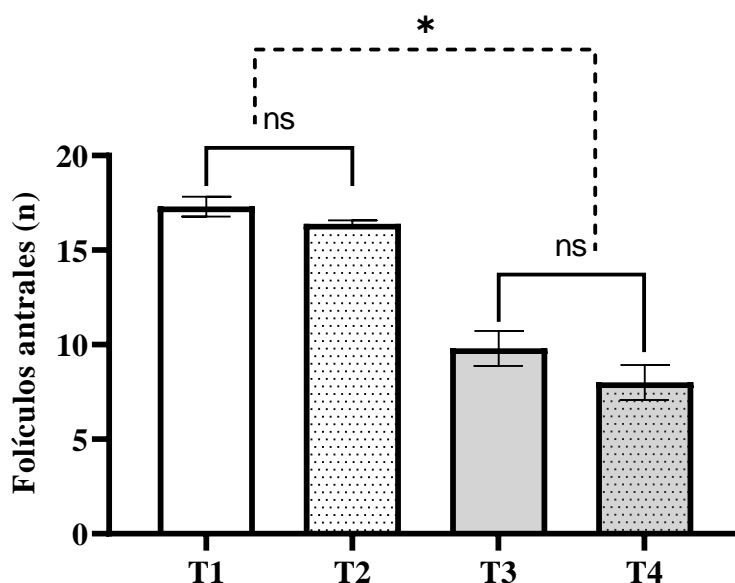
N=número de sesiones. X= media de las variables. DE= desviación estándar. COC´s= complejos cúmulos ovocitos.

### 5.2.1. Valores medios del número de folículos antrales con medidas entre 4-8mm presentes en los cuatro tratamientos:

Al analizar los valores promedios del número de folículos con tamaños entre 4-8 mm presentes en las sesiones de OPU en las vaquillas de T1 ( $17,3 \pm 0,53$  folículos); T2 ( $16,4 \pm 0,18$  folículos); así como los animales de T3 ( $9,8 \pm 0,92$  folículos) y T4 ( $8,0 \pm 0,93$  folículos), se observó que los animales con alto RFA (T1 y T2) presentaron el doble de folículos entre 4-8 mm en día de la aspiración ecoguiada o *ovum pick up* (OPU), en relación a los de bajo RFA (T3 y T4;  $P < 0,05$ ; **Fig. 9**). Este resultado guarda concordancia con lo descrito en vaquillas cruce entre Simmental y Nelore en el cual se determinó que el promedio de folículos observados en la OPU en el grupo testigo ( $15,9 \pm 0,7$  folículos) fue similar al del grupo que recibió BE ( $17,5 \pm 0,7$  folículos) al aspirar una vez por semana, lo cual indica que la aplicación de BE no influye en el número de folículos disponibles en el proceso de aspiración ecoguiada (Ramos et al., 2010), sino más bien esta hormona permite la aparición de una nueva onda folicular (Bo et al., 2000) en un tiempo determinado (en el estudio en 3,75 días en promedio).

En los animales con alto RFA que recibieron o no BE los resultados fueron similares en cuanto al número de COC´s observados durante las sesiones de OPU, por consiguiente, está claro que el BE no influyo sobre la cantidad de COC´s disponibles en el momento de la OPU, ya que esta hormona combinada con la progesterona produce atresia del folículo dominante y la aparición de una

nueva onda folicular (Bó & Mapletoft, 2014) con un determinado número de folículos que es particularidad individual de cada animal (Mossa et al., 2017).



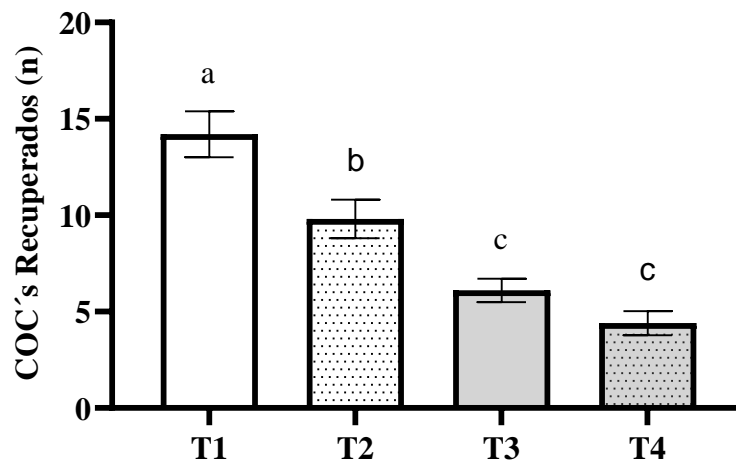
**Figura 9.** Valores medios de los folículos antrales con medidas entre 4 y 8mm, presentes el día de la sesión de OPU en cada uno de los tratamientos:

T1=vaconas con alto recuento de folículos antrales con BE (BE\_Alta).  
T2=vaconas con alto recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Alta).  
T3=vaconas con bajo recuento de folículos antrales con BE (BE\_Bajo).  
T4=vaconas con bajo recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Bajo). Prueba de Tukey al 5%. \*= diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,05$ ).

El grupo que más COC's recupero fue T1 ( $14,2 \pm 1,19$  COC's) comparado con las vaquillas de T3 ( $6,1 \pm 0,61$  COC's) y T4 ( $4,4 \pm 0,63$  COC's). Sin embargo, cuando comparamos con los animales de T2 la diferencia fue menor ( $9,8 \pm 1,0$  COC's) pero significativa estadísticamente ( $P < 0,05$ ; **Fig. 10**).

El hecho de que se obtengan más COC's de los animales con alto RFA contra los de bajo RFA es lógico ya que la disponibilidad de folículos entre 4-8 mm es el doble en los animales de RFA alto (**Fig. 9**), esto se relaciona al hecho de que se produce reinicio de onda folicular, y la aspiración de los folículos se puede

realizar en un momento determinado del ciclo estral (48 horas posteriores al reinicio en fase de selección), lo cual permite tener un grupo de folículos más homogéneos para la aspiración folicular ecoguiada y esto está relacionado con una mejor cantidad y calidad de ovocitos recuperados (Seneda et al., 2001).

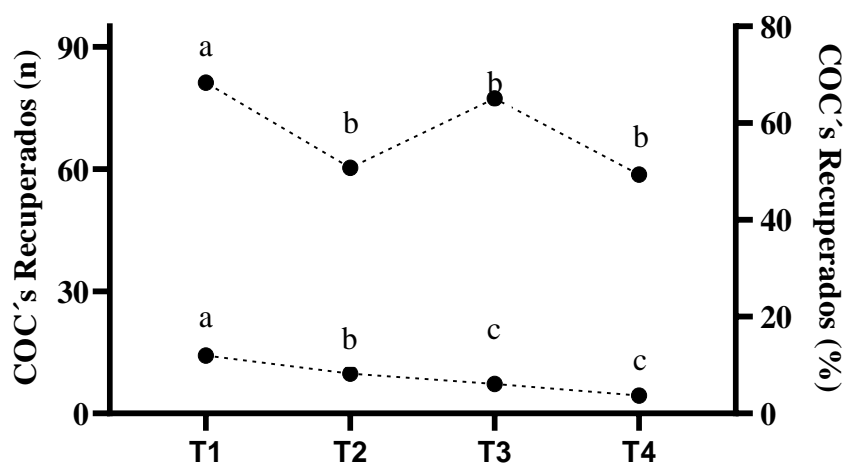


**Figura 10.** Valores medios del total de complejos cumulus ovocitos recuperados (COC's) en las sesiones de OPU en cada uno de los tratamientos: T1=vaconas con alto recuento de folículos antrales con BE (BE\_Alta). T2=vaconas con alto recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Alta). T3=vaconas con bajo recuento de folículos antrales con BE (BE\_Bajo). T4=vaconas con bajo recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Bajo). Prueba de Tukey al 5%. abc= diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,05$ ).

Al analizar el porcentaje de recuperación que se obtuvo en los cuatro grupos en estudio se establece que las vaquillas de alto RFA que recibieron BE presentaron mayor porcentaje de recuperación ( $81,2 \pm 4,64$ ) en comparación con los otros tres grupos BE\_baja ( $65,1 \pm 5,99$ ); Test\_Alta ( $60,3 \pm 5,9$ ); Test\_baja ( $58,6 \pm 10,23$ ) **Figura 11.**

El porcentaje de recuperación del tratamiento 1 fue superior a trabajos donde los animales recibieron sesiones de OPU una vez por semana como el determinado por Chaubal et al. (2007), quienes establecen un porcentaje del 58,9% de

recuperación, o el realizado por Ramos et al. (2010), en vaquillas con valores del 79,9% de recuperación.



**Figura 11.** Valores medios del total de complejos cumulus ovocitos recuperados (COC's) en las sesiones de OPU (en cada uno de los tratamientos: T1=vaconas con alto recuento de folículos antrales con BE (BE\_Alta). T2=vaconas con alto recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Alta). T3=vaconas con bajo recuento de folículos antrales con BE (BE\_Bajo). T4=vaconas con bajo recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Bajo). Prueba de Tukey al 5%. abc= diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,05$ ).

En base a los resultados de la cantidad de folículos disponibles al momento de la OPU y la cantidad de COC's recuperados podemos aseverar que los animales con alto RFA que recibieron BE (T1) posibilitan un mayor porcentaje de recuperación de COC's, lo cual permitirá contar con una mayor cantidad de material genético para la PIVE.

### 5.2.2. Valoración de la calidad de los ovocitos recuperados

Tres de cada cuatro COC's recuperados en los grupos que recibieron BE (T1 y T3) fueron aptos para la PIVE y en los grupos que no recibieron BE (T2 y T4) solo dos de cada cuatro fueron aptos para la PIVE (**Tabla 3**). Además, la cantidad de COC's aptos para la PIVE en T1 fue mayor comparado con los tratamientos





T2, 3 y 4 ( $P < 0,05$ ). De estos los COC's de tipo A y B del tratamiento 1 fueron el doble de los obtenidos en los otros tres grupos en estudio (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Valores medios y error estándar de los complejos cumulus ovocitos (COC's) aspirados, recuperados y cada uno de los tipos de COC's obtenidos.

	<b>BE_Alta (T1)</b>	<b>Testigo_Alta (T2)</b>	<b>BE_baja (T3)</b>	<b>Testigo_Baja (T4)</b>
Total COC's	14,2±1,19a	9,8±1,00b	6,1±0,61c	4,4±0,63c
COC's aptos	10,1±0,77a	4,9±1,20b	4,4±0,68b	2,7±0,73b
% de recuperación aptos	71,1a	50,0b	72,1a	61,4b
COC's Tipo A	5,6±0,75a	2,0±0,78b	2,3±0,45b	1,4±0,46b
COC's Tipo B	4,5±1,00a	2,9±0,74ab	2,1±0,58ab	1,4±0,42b
COC's no aptos	4±0,70ab	5,0±0,87a	1,8±0,53b	1,6±0,49b
% de recuperación no aptos	28,9	50,0	27,9	38,6
COC's Tipo C	1,3±0,37ab	2,9±0,69a	0,8±0,25b	0,5±0,19b
COC's Tipo D	2,8±0,55a	2,1±0,39ab	1,0±0,38b	1,1±0,40ab

T1=vaconas con alto recuento de folículos antrales con BE (BE\_Alta).

T2=vaconas con alto recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Alta).

T3=vaconas con bajo recuento de folículos antrales con BE (BE\_Bajo).

T4=vaconas con bajo recuento de folículos antrales, sin BE (Test\_Bajo). Prueba

de Tukey al 5%. abc= diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,05$ ).

En trabajos que se utilizaron BE para sincronizar la onda folicular previo a la sesión de OPU se obtuvieron porcentajes de COC's aptos para la PIVE del 60% (Cavalieri et al., 2018), o del 70,29% (Ramos et al., 2010), valores que son similares a los obtenidos en el presente trabajo



## 6. CONCLUSIONES

El punto de corte de la hormona Anti-mülleriana para considerar que una vaca de raza Holstein mestizas presente menos de 15 folículos antrales en sus ovarios el día de reinicio de la onda folicular fue de  $<170$  pg/ml y para vacas con un RFA  $>25$  folículos la concentración de la AMH debe ser  $>350$  pg/ml

El reinicio de la onda folicular inducida por un protocolo a base de benzoato de estradiol, progesterona y prostaglandina en vacas Holstein mestizas, bajo sistema de pastoreo fue de 3,75 días.

Sin embargo, el número de folículos antrales presentes en el momento del reinicio de la onda folicular no se ve influenciado por la aplicación del BE en animales con alto RFA.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología. En *Inmunología celular y molecular* (p. Séptima ed., 513-514). Elsevier.

Acosta, T. J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., & Miyamoto, A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 $\alpha$  injection in the cow. *Biology of Reproduction*, 66(3), 651–658. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.651>

Alcívar, E., & Arteaga, M. (2019). Evaluación de los niveles de hormona antimulleriana sobre la dinámica folicular en vaquillas Brahman. In *Espammlf*.

<http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1055/1/TTMAI5.pdf>

Amaro, M. A., Morotti, F., Bayeux, B. M., de Rezende, R. G., Botigelli, R. C., De Bem, T. H. C., Fontes, P. K., Nogueira, M. F. G., Meirelles, F. V., Baruselli, P. S., da Silveira, J. C., Perecin, F., & Seneda, M. M. (2020). Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>

Argudo, D. E., Tenemaza, M. A., Merchán, S. L., Balvoa, J. A., Méndez, M. S., Soria, M. E., Galarza, L. R., Ayala, L. E., Hernández-Fonseca, H. J., Perea, M. S., & Perea, F. P. (2020). Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*, 155, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.044>

Avila, L. (2006). Técnicas bovinométricas para determinar la capacidad reproductiva, productiva de hembras lecheras de la raza Holstein de la región austral. 1–109.

Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, 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. doi:10.15381/rivep.v29i2.13816
- Ayala, L. E., Pesantez, J. L., Rodas, E. R., Dután, J. B., Calle, J. R., Murillo, Y. A., . . . Samaniego, J. X. (2019). Dinámica folicular de vaquillas criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 184-190. doi:10.21071/az.v68i262.4135
- Ayala, L. E., Nieto Escandón, P. E., Rodas Carpio, E. R., Sarmiento Quito, S. X., & Dután Sanango, J. B. (2020). Control de la emergencia de la onda folicular mediante la aplicación de benzoato de estradiol, GnRH y ablación folicular en el metaestro tardío en vaquillas de trópico alto. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(4), e17009. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.17009>
- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., & Souza, A. H. (2015). Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim. Reprod*, 12(3), 487–497.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Caccia, M., Tribulo, H., & Mapletofi, R. J. (1994). Follicular wave dynamics after estradiol-17/3 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *The dogenology*, 41(8), 1555- 1569. doi:10.1016/0093-691X(94)90821-Y
- Bo, G. A., Bergfelt, D. R., Brogliatti, G. M., Pierson, R. A., Adams, G. P., & Mapletoft, R. J. (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science*, 59(3-4), 141-157. doi:10.1016/s0378-4320(00)00140-8
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., . . . Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53-72. doi:10.1016/s0093-691x(01)00657-4



- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle : A 25 year retrospective analysis. *March*, 362–369.
- Cavaliere, F. L., Morotti, F., Seneda, M., Colombo, A., Andreazzi, M., Emanuelli, L., & Rigolon, L. (2018). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 117, 57-60. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.026
- Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Riesen, J. W., Tian, X., & Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65(8), 1631–1648. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
- Chaubal, S. A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E., Rezamand, P., . . . Yang, X. (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU–IVP system. *Theriogenology*, 67(4), 719-728. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.022
- Colazo, M., & Kastelic, J. (2014). Aspectos básicos y aplicados del uso de la ultrasonografía en el manejo reproductivo del ganado bovino. *Theriogenology*, 81(3), 8–10. <https://doi.org/10.13140/2.1.2008.9288>
- Del Valle Diaz T. Dinamica folicular ovarica durante el ciclo estral en vacas de doble proposito. In González C, Madrid N, Soto E. Desarrollo sostenible de la Ganadería Doble Propósito.; 2008. p. 546-554.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked



immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>

Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Carvalho, N. A. T., Torres-Júnior, J. R. S., Souza, A. H., Madureira, E. H., Trinca, L. A., Sartorelli, E. S., Barros, C. M., Carvalho, J. B. P., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 69(7), 852–858. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001>

Ginther, O. J. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 57, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>

Gonzalez. (2016). pdf-reconocimiento-de-estructuras-reproductivas\_compress.pdf.

Goodman, A. L., & Hodgen, G. D. (1983). The ovarian triad of the primate menstrual cycle. In *Recent progress in hormone research* (Vol. 39). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571139-5.50005-7>

Hasler, J. F. (2007). Embryo transfer and in vitro fertilization. In *Comparative Reproductive Biology*. In *Comparative Reproductive Biology*. Ames: Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470390290>

Hendriksen, Sttenweg, & Bevers. (2000). BOVINE FOLLICULAR DEVELOPMENT AND ITS EFFECT ON THE IN VITRO COMPETENCE OF OOCYTES. 1645, 1–76.

Hidaka, T., Fukumoto, Y., Yamamoto, Y., Ogata, Y., & Horiuchi, T. (2018). Estradiol benzoate treatment before ovum pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese Black cattle. *Veterinary and Animal Science*, 5(September 2017), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.02.001>

Hopper, R. (2015). *Bovine Reproduction* (2015 by Jo).

Inatec. (2016). REPRODUCCIÓN ANIMAL. *Inatec*, 4(2), 163–178.



<https://doi.org/10.22579/22484817.629>

Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Mossa, F., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in . *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>

Kelly, G. (2014). Caracterización de las alteraciones del aparato reproductor de la hembra bovina a nivel de camal. 116. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4504/1/20T00582.pdf>

Kjelland, M. E., Ferré, L. B., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Lechniak, D., Kaczmarek, D., Stanisławski, D., & Adamowicz, T. (2002). The ploidy of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*, 57(4), 1303–1308.

Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(1), 76–86.

Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. October, 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>

Majerus, V., Le Gal, F., De Roover, R., Doonay, I., & Massip, A. (1995). Maturation competence in related to prepubertal calves oocyte diameter. *Theriogenology*, 20(96), 385.

Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbiès-Tran, R., Médigue, C., Clément, F., & Fabre, S. (2010). L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 38(7–8), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.05.009>



- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Weber-Nielsen, M., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2017). Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, 154(1), R1–R11. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>
- Neglia, G., Gasparini, B., Caracciolo Di Brienza, V., Di Palo, R., Campanile, G., Presicce, G. A., & Zicarelli, L. (2003). Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, 59(5–6), 1123–1130. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01170-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01170-6)
- Palma, A. (2008). BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN CIENCIA , TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD. September.
- Pelaez, A. (2011). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51–60.
- Peña, J., Agustín Góngora, O., & José EStrada, L. (2007). Growth Factors in the Follicular Development, Embryonic Early and Implantation. Implications in the Production of Bovine Embryos. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 942–954. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682007000100010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682007000100010)
- Perry, G. A., & Cushman, R. A. (2016). Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Professional Animal Scientist*, 32(2), 154–161. <https://doi.org/10.15232/pas.2015-01446>
- Porras, A. (2009). Manual de practicas de reproduccion animal.
- Ramos, A. F., Rumpf, R., Câmara, J. U., Mollo, M. R., Pivato, I., Marques Jr, A. P., & Sartori, R. (2010). Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. *Animal Reproduction Science*, 117(3-4), 201-207. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.04.009
- Requelme, N., & Bonifaz, N. (2012). Caracterización de Sistemas de producción Lechera de Ecuador. *La Granja*, 16(2), 23–47.





- Rippe, C. (2009). El ciclo estral - Engormix. Engormix, March 2015. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/ciclo-estral-t42271.htm>
- Romero, C., Orlando, & Gustavo, A. (2014). Efecto de la aplicación de factores liberadores de gonadotrofinas (GnRH) y Benzoato de estradiol, sobre el desarrollo y tamaño de los folículos en vacas Brahman. 4, 19–28. <https://biblat.unam.mx/hevila/RevistaCITECSA/2014/vol4/no7/4.pdf>
- Sá Filho, M. F., Baldrighi, J. M., Sales, J. N. S., Crepaldi, G. A., Carvalho, J. B. P., Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2011). Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 129(3–4), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.12.005>
- Sakaguchi, K., Yanagawa, Y., Yoshioka, K., Suda, T., Katagiri, S., & Nagano, M. (2019). Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>
- Salinas. (2011). Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. Universidad de Cuenca, 1–128.
- Salverson, R. R., DeJarnette, J. M., Marshall, C. E., & Wallace, R. A. (2002). Synchronization of estrus in virgin beef heifers using melengestrol acetate and PGF<sub>2</sub>α: An efficacy comparison of cloprostenol and dinoprost tromethamine. *Theriogenology*, 57(2), 853–858. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00692-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00692-6)
- Samaniego, Ayala G., L., Jorge, Nieto E., P., Rodas C., R., Dutan S., J., Calle Or., G., Murillo A., Y., Vazquez M., J., Argudo G., D., & Perea G., F. (2017). 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>



- Sánchez. (2014). CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES MACROSCÓPICAS DEL APARATO GENITAL DE HEMBRAS BOVINAS FAENADAS EN EL CAMAL FRIGORÍFICO MUNICIPAL AMBATO". <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/saglikli-beslenme-hareketli-hayat-db/Yayinlar/kitaplar/diger-kitaplar/TBSA-Beslenme-Yayini.pdf>
- Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C. P., Ginther, O. J., & Wiltbank, M. C. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1403>
- Seneda, M. M., Esper, C. R., Garcia, J. M., Oliveira, J. A., & Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 67(1-2), 37-43. doi:10.1016/s0378-4320(01)00113-0
- Seneda, M., Zangirolamo, A., Bergamo, L., & Morotti, F. (2020). Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 150, 180-185. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.01.024
- Silva, K. C., Santos, G. M. G. dos, Siloto, L. S., Santos, J. T. dos, Oliveira, E. R. de, Machado, F. Z., Rosa, C. O., & Seneda, M. M. (2014). The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.016>
- Silva, A. G., Pinto, L. M. F., de Amorim Silva, N., Mattos, A. C. D., Ambrósio, P. H., Duarte, K. M. R., Alvarez, R. H., & Pugliesi, G. (2021). Comparison of three doses of estradiol benzoate for synchronization of follicular wave emergence in suckled *Bos indicus* beef cows. *Animal Reproduction*, 18(3), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0016>
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., & Adams, G. P. (2004). A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62(1–2), 227–243.



<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020>

Solís, A., Guerra, R., Sandoya, G., & De Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *Revista Electronica de Veterinaria*, 13(10).

Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., Dresch, A. R., Verstegen, J. P., Shaver, R. D., & Wiltbank, M. C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 169–178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>

Vasquez, J. (2016). TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR OVUM PICK UP EN VACAS HOLSTEIN CON ADMINISTRACIÓN DE PROPILENGLICOL EN SU DIETA EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA – 2016.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Composición del alimento concentrado

Cada 1000 g contiene	
Ingrediente	Cantidad
Tamo de avena	381 g
Tamo de trigo	286 g
Maíz molido	286 g
Soya	48 g
Melaza	

### Anexo 2. Composición de la sal mineral



Cada 100 g contiene como mínimo	
Componente	Cantidad
Fósforo	2 g
Calcio	14 g
Magnesio	0.100 g
Zinc	0.160 g
Yodo	0.020 g
Cobalto	0.001 g
Potasio	0.001 g
Manganeso	0.002 g
Cobre	0.200 g
Azufre	0.100 g
Sodio	14 g

Cloro	17 g
Hierro	0.100 g
Selenio	0.0002 g
Metionina	Trazas
Lisina	Trazas
Zinc Orgánico	Trazas
Fitasa	Trazas

**Anexo 3. Productos (Desparasitantes, vitaminas y minerales)**



Producto	Principio activo	Nombre comercial	Dosis	Administración
<b>Desparasitante</b>	Fenbendazol	Parafen	5 mg/kg PV	V.O
<b>Vitaminas</b>	Vitamina A,D,E	Lavetec AD3E	5 ml/animal	I.M
<b>Minerales</b>	Yodo	Livanal	10ml /animal	I.M

**Anexo 4. Animales de estudio separados en su respectivo potrero**





### Anexo 5. Plantilla para seguimiento de reinicio de onda folicular

		<b>UNIVERSIDAD DE CUENCA</b>					
		FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS					
		CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA					
<i>"Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales"</i>							
<b>AUTORES:</b>		Paúl Chiza y Xavier Ordoñez			<b>DIRECTOR:</b>		Luis Ayala, PhD.
<b>PLANTILLA PARA SEGUIMIENTO REINICIO DE ONDA FOLICULAR</b>							
FECHA: <input type="text"/>				HORA: <input type="text"/>			
TECNICO A CARGO: <input type="text"/>				TRATAMIENTO: <input type="text"/>			
OD				OI			
	Grupos de folículos			Tamaño	Tamaño		
Día	<4mm	4-8mm	>8mm	F_mayor	CL		
0							
1							
2							
3							
4							
5							


### Anexo 6. Plantilla de registro para aspiración folicular (OPU)

		<b>UNIVERSIDAD DE CUENCA</b>					
		FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS					
		CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA					
<i>"Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de folículos antrales"</i>							
<b>AUTORES:</b>		Paúl Chiza y Xavier Ordoñez			<b>DIRECTOR:</b>		Luis Ayala, PhD.
<b>REGISTRO PARA ASPIRACION FOLICULAR (OPU)</b>							
FECHA: <input type="text"/>				HORA: <input type="text"/>			
DOCTOR A CARGO: <input type="text"/>				TRATAMIENTO: <input type="text"/>			
				REPETICIÓN: <input type="text"/>			
IDENTIFICACIÓN DONANTES			N° DE FOLICULOS >4mm ASPIRADOS			OBSERVACIONES	
N°	ARETE	EDAD	PESO	O. DERECHO	O. IZQUIERDO		
1							
2							
3							
4							
					<b>TOTAL</b>		

### Anexo 7. Plantilla para clasificación de COC'S

N°		TRATAMIENTO	N° Vaquilla	N° DE FOLICULOS 4-8mm ASPIRADOS	CLASIFICACIÓN COC's						OBSERVACIONES
					Aptos			No Aptos			
					A	B	TOTAL	C	D	TOTAL	
1											
2											
3											
4											
					TOTAL			TOTAL			

<b>UNIVERSIDAD DE CUENCA</b>		
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS		
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA		
<i>"Efecto de un protocolo hormonal aplicado previo a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía sobre la calidad y cantidad de ovocitos en donadoras con alto y bajo recuento de foliculos antrales"</i>		
<b>AUTORES:</b>	Paúl Chiza y Xavier Ordoñez	
<b>DIRECTOR:</b>	Luis Ayala, PhD.	
PLANTILLA PARA CLASIFICACIÓN DE COC's		
FECHA:	<input type="text"/>	HORA: <input type="text"/>
TECNICO A CARGO:	<input type="text"/>	REPETICIÓN: <input type="text"/>

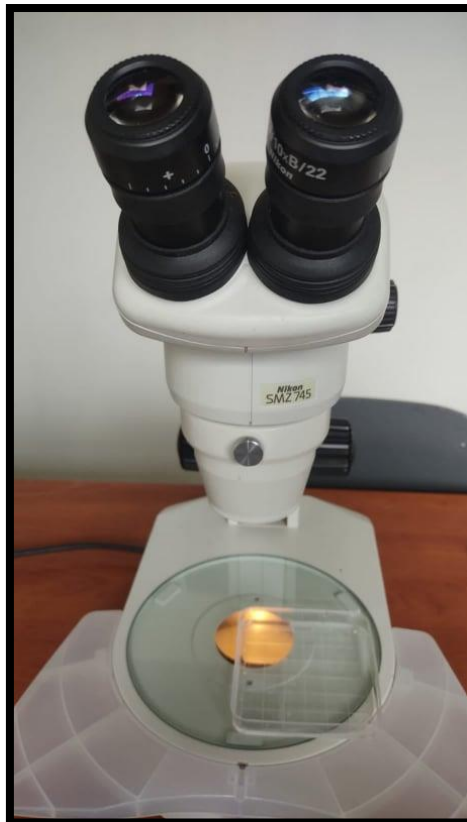
### Anexo 8. Materiales y equipos empleados



Equipo de ultrasonido ALOKA® ProSound2 Vet

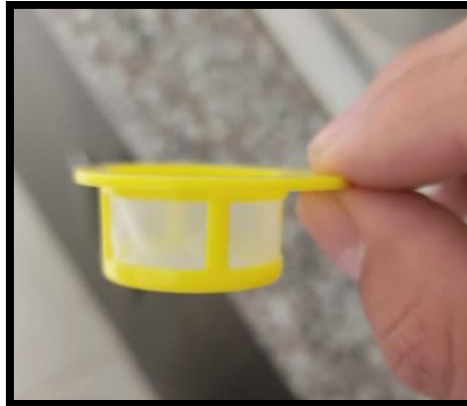


Transductor sectorial



Estereomicroscopio Nikon SMZ 745

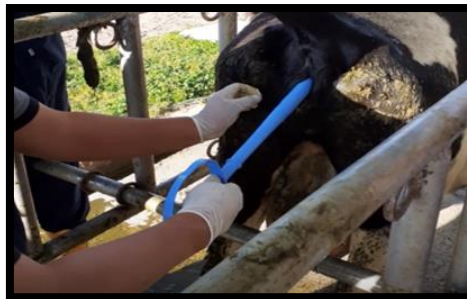




Filtro celular de 100 m

### Anexo 9. Procedimiento para seguimiento de reinicio de onda folicular

1. Colocación del dispositivo intravaginal de liberación de progesterona CIDR® Progesterona activa 10%, 1,9 g.



2. Aplicación de benzoato de estradiol (Gonadiol®) y Prostaglandina (Sincromic)



3. Chequeo ecográfico para seguimiento de reinicio de onda folicular



4. Retiro del dispositivo intravaginal de liberación de progesterona CIDR®  
Progesterona activa 10%, 1,9 g.



### **Anexo 10. Procedimiento para Ovum pick-up**

1. Vaciado del contenido rectal y limpieza de la región perineal



## 2. Bloqueo epidural



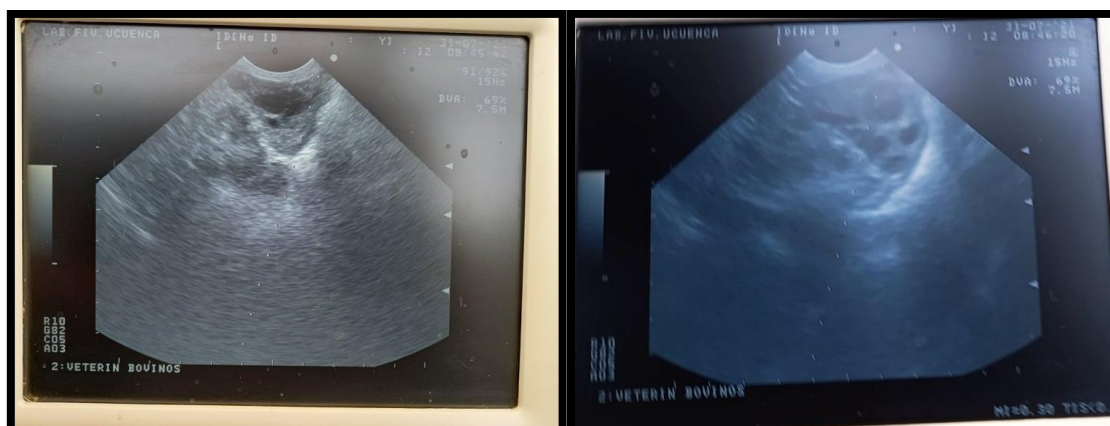
Depilado de la zona lumbosacra



Aplicación de Lidocaína (Roxicaina® 2%) + Xilacina (Dormi-XYL® 2)

## 3. Visualización de los folículos





#### 4. Aspiración Folicular



#### Anexo 10. Procedimiento a nivel de laboratorio

##### 1. Filtrado



## 2. Búsqueda y clasificación de los COC'S

