

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluar el efecto de la fibra sobre la respuesta ovárica estimulada con hormona foliculoestimulante en vaquillas Holstein mestizas alimentadas con forraje de diferente edad fenológica

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


Autores:

Adriana Mercedes Boni Curillo

Jaime Ernesto Pacheco Estrella

Director:

Jorge Bolívar Dután Sanango

ORCID:  0000-0002-8741-9028

Cuenca, Ecuador

2024-01-23

Resumen

El estudio se ejecuto en la hacienda Juticaray, situada en el sector de Surampalti, cantón Déleg, provincia del Cañar a una altura de 3230 metros sobre el nivel del mar. El trabajo valoró el efecto de la administración de 125 Unidades Internacionales (UI) de hormona Foliculo-estimulante (FSH) vía epidural en ocho vaquillas Holstein mestizas que fueron alimentadas con forrajes de 28 y 42 días de edad fenológica, sobre la respuesta ovárica, cuantificando el número de folículos antrales (FA) observados el día de la aspiración ecoguiada (OPU), el número y la calidad de complejos cúmulo ovocitos (COC´s) recuperados. En el experimento se establecieron 4 tratamientos: T0 = pradera de 28 días; T1 = pradera de 28 días + 125 UI de FSH; T 2= pradera de 42 días; T3 = pradera de 42 días + 125 UI de FSH. La pradera contenía un 80,1% 7,4% y 6,4% de gramíneas, leguminosas y malezas, respectivamente. El análisis químico determino que la fibra bruta en las praderas de 28 y 42 días fue similar ($P>0,05$), por tal motivo a estas edades fenológicas la fibra no ejerce algún efecto sobre la respuesta ovárica; sin embargo, el forraje de 28 días tuvo mayores porcentajes de humedad($88,3\pm 0,70$) y proteína($21,3\pm 0,81$) comparada con el forraje de 42 días($84,9\pm 0,55$ y $17,6\pm 0,86$ respectivamente) ($P<0,05$), esto contribuyó directamente en el desarrollo folicular del tratamiento 3, donde presento un mayor número de folículos entre 4-8mm(116 (74,4%)). El promedio de folículos visualizados fue de $19,9 \pm 6,68$ folículos, de estos se aspiró un 76,9% ($15,3 \pm 7,11$ folículos aspirados), obteniendo un porcentaje de recuperación del 59,2% de COC´s ($11,8 \pm 7,53$ COC´s), de estos el 54,2% fueron clasificados como aptos y el 45,7% no aptos. El T3 tuvo un 19,1% más de recuperación que el tratamiento 2 y un 22,1% con respecto al T1. Adicionalmente, T3 proporcionó 3 veces más COC´s considerados aptos comparados con los obtenidos en T2. En conclusión, aplicar 125 UI influyó en el número de folículos que llegan a ser aspirados, el número y la calidad de COC´s recuperados, sin importar la edad fenológica de la pastura con la que fueron alimentadas las vaconas.

Palabras clave: forraje, complejo cúmulo ovocito, vaconas, gonadotropinas



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The study was carried out on the Juticaray farm, located in the Surampalti sector, Déleg canton, Cañar province at an altitude of 3230 meters above sea level. The work evaluated the effect of the administration of 125 International Units (IU) of Follicle-stimulating hormone (FSH) epidurally in eight crossbred Holstein heifers that were fed with pastures of 28 and 42 days of phenological age, on the ovarian response, quantifying the number of antral follicles (AF) observed on the day of the ultrasound-guided aspiration (OPU), the number and quality of cumulus oocyte complexes (COC's) recovered. In the experiment, 4 treatments were established: T0=28-day meadow; T1=28-day pasture + 125 IU of FSH; T2=42-day meadow; T3=42-day meadow + 125 IU of FSH. The meadow contained 80.1% grasses, 7.4% legumes and 6.4% weeds. The chemical analysis determined that the crude fiber in the 28- and 42-day pastures was similar ($P>0.005$); However, the 28-day pasture had higher percentages of moisture (88.3 ± 0.70) and protein (21.3 ± 0.81) compared to the 42-day pasture (84.9 ± 0.55 and 17.6 ± 0.86 respectively) ($P<0.05$), this contributed directly to the follicular development of treatment 3, which presented a greater number of follicles between 4-8 mm (116 (74.4%)). The average number of follicles visualized was 19.9 ± 6.68 follicles, of which 76.9% were aspirated (15.3 ± 7.11 follicles aspirated), obtaining a recovery percentage of 59.2% of COC's (11.8 ± 7.53 COC's), of which 54.2% were classified as suitable and 45.7% as unsuitable. T3 had 19.1% more recovery than treatment 2 and 22.1% over T1. Additionally, T3 provided 3 times more COC's considered fit compared to those obtained in T2. In conclusion, applying 125 IU influenced the number of follicles that were aspirated, the number and quality of COC's recovered, regardless of the phenological age of the pasture with which the cows were fed.

Keywords: fodder, oocyte cumulus complex, cows, gonadotropins



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción.....	13
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Revisión de Literatura.....	16
3.1 Edad fenológica de los pastos.....	16
3.2 Concepto de la fibra de una pradera	16
3.3 La fibra en los rumiantes: importancia.....	17
3.4 Cómo afecta la fibra, proteína en la fertilidad del animal?	17
3.5 Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	18
3.6 Ciclo estral de la hembra bovina	19
3.6.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	19
3.6.2 Dinámica Folicular	21
3.7 Sincronización de la onda folicular	21
3.7.2 Progesterona.....	22
3.8 FSH/LH.....	22
3.9 Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía	23
3.9.1 La aspiración folicular ecoguiada: Técnica.....	23
3.10 Clasificación Complejos Cumulo Ovocito.....	23
4. MATERIALES Y METODOS	25
4.1 Materiales.....	25
4.1.1 Materiales biológicos.....	25
4.1.2 Materiales químicos	25
4.1.3 Materiales de campo	25
4.1.4 Materiales de laboratorio.....	25
4.2. METODOLOGIA	26
4.2.1. Área de estudio	26
4.2.2. Unidades experimentales.....	26
4.2.3 Diseño experimental.....	27

4.2.4 Valoración del número y tamaño de folículos.....	29
4.2.5 Valoración de los COC's.....	30
4.3 Análisis Estadísticos	30
5. Resultados y Discusión	31
Conclusiones.....	38
Recomendaciones	40
Referencias	41
Anexos	47

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la Anatomía del Aparato reproductor de la hembra Bovina.....	18
Figura 2: Activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Sintex, 2005).	20
Figura 3: Ilustración Dinámica Folicular (Ayala et al., 2019)	21
Figura 4:Imágenes microscópicas. Clasificación de ovocitos (Zárate, 2006).	24
Figura 5:Mapa Satelital de la hacienda particular Juticaray (Google Maps 2023).....	26
Figura 6:Protocolos de los tratamientos 0 (T0) y 1 (T1) desarrollados en praderas con fibra de 28 días de edad fenológica.	28
Figura 7:Protocolos de los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3) desarrollados en praderas con fibra de 42 días de edad fenológica.	29

Índice de tablas

Tabla 1 . Porcentaje de la composición botánica del forraje utilizado en la alimentación de las vaquillas	31
Tabla 2 : Composición química media del forraje de edad fenológica de 28 y 42 días.....	32
Tabla 3 : Media y desviación estándar general del número de folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC´s), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio	33
Tabla 4 : Media y error estándar de los folículos visualizados y aspirados, complejos cúmulo ovocito (COC´s), aptos, no aptos recuperados y porcentaje de recuperación en el total COC´s en cada sesión de OPU realizada en el estudio en cada uno de los tratamientos	34
Tabla 5 : Porcentaje de folículos de cada grupo (<4mm; entre 4-8mm; >8mm) presentes en cada uno de los tratamientos en todas las sesiones de OPU realizadas en el estudio.....	37
Tabla 6 : Porcentaje de COC´s aptos presentes en los folículos clasificados como <4mm; entre 4-8mm; >8mm, presentes en cada uno de los tratamientos	38

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada en primer lugar a mis hijos Noemí y Daniel que han sido mi principal motivación para superarme cada día más y de esta manera poder tener un mejor futuro.

A mi esposo Jaime por ser un pilar fundamental en mi vida por apoyarme y darme ánimos para seguir en los estudios cuando yo me rendía, y siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos y brindarme su cariño y amor.

A mis padres Alfonso y Guadalupe, mis hermanas y de más familiares por brindarme su apoyo incondicional, por su paciencia y consejos que me han ayudado a ser una mejor persona.

Gracias a todos

Adriana

Dedicatoria

Este trabajo de tesis va dedicado a mis pequeños hijos Noemí Yulissa y Daniel Alfonso, a mi amada esposa Adriana Mercedes, por estar siempre apoyándome en todo momento y por toda su paciencia, amor y comprensión.

También se lo dedico a mis queridos padres Jesús Alfonso y María Eloísa por todo sus enseñanzas y apoyo incondicional para poder culminar mis estudios.

Se la dedico a todos mis familiares y amigos que de una u otra forma fueron un apoyo fundamental en cada una de las etapas académicas.

Jaime

Agradecimientos

En primer lugar, quiere agradecer a Dios por darme las fuerzas necesarias para continuar a pesar de las adversidades, por guiarme en el camino correcto y darme la sabiduría necesaria para ir mejorando día a día.

Al mismo tiempo quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Jorge Dután por su tiempo y dedicación que nos ha brindado. También quiero agradecer al Dr. Adrián por ser quien nos facilitó con las vaquillas para el estudio. Y también un agradecimiento al Doctor Luis Ayala, Ing. Pedro Nieto y al Dr. Andrés Jácome por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Adriana

Agradecimiento

Agradezco a Dios por brindarme la salud y las fuerzas para lograr terminar una etapa académica, también quiero agradecer al Dr. Jorge Dután por aceptar el reto de ser el director de esta tesis, y también quiero agradecer al Dr. Luis Ayala, Ing. Pedro Nieto y Dr. Andrés Jácome por su apoyo fundamental durante el desarrollo de este trabajo.

A demás, quiero agradecer a mi esposa, a mis hijos, a mis padres y demás familiares por todos los sacrificios que han tenido que pasar, para lograr culminar esta etapa de mi vida, ya que siempre han sido un pilar fundamental en mi vida académica.

Jaime

Lista de abreviaturas

DIV= Dispositivo Intravaginal

BE = Benzoato de estradiol

P4 = Progesterona

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

CC = Condición corporal

MS = Materia seca

ELN= Extracto libre de nitrógeno

FDN = Fibra detergente neutra

FDA = Fibra detergente acida

LDA = Lignina ácido detergente

FSH = Hormona folículo estimulante

LH = Hormona Luteinizante

IATF= Inseminación artificial a tiempo fijo

PIVE = Producción de embriones in vitro

OPU = Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía

UI = Unidades internacionales

COC's = Complejo cúmulos ovocitos

FA= Folículos antrales

mm/Hg= milímetros de mercurio

Introducción

Los cambios en la dieta alimenticia influyen directamente sobre la condición corporal y la fertilidad, específicamente sobre la función ovárica (Adamiak et al., 2005), ya que la energía juega un papel fundamental durante el desarrollo de las estructuras anatómicas del aparato reproductor de la hembra bovina, participa, controla y regula su funcionamiento, específicamente la parte endocrinológica como la formación y liberación de hormonas vinculadas con la reproducción, el desarrollo folicular y la calidad del ovocito (Webb et al., 2004). Por tales motivos una relación inadecuada de fibra va a limitar la producción de energía por medio de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) los cuales se verán afectados en su producción por una elevada cantidad de fibra en la dieta (Angeles, 2013).

Existe evidencia científica que demuestra que dietas con altos niveles de energía facilitan la disponibilidad de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) intrafolicular, esto aumenta la sensibilidad de los folículos a la FHS, lo cual sumado al aumento periférico de insulina e IGF-1 influyen en el desarrollo del folículo dominante, sin embargo, esta descrito que grandes cantidades de proteína provocan disminución de la calidad de ovocito por aumento de la concentración plasmática de urea (Armstrong et al., 2001).

Por tal motivo, en ganaderías en estabulación completa se proporciona suficiente energía y nutrientes para cubrir todas las demandas metabólicas que ocurren en las diferentes etapas de la vida del animal (crecimiento, gestación y producción, Opsomer et al., 2017). Esto permite que bovinos como los holstein presenten un 36,5% más de folículos antrales (FA) en los ovarios ($27,2 \pm 12,2$ folículos; (Furukawa et al., 2020), en comparación a las vaquillas de este genotipo que son alimentados al pastoreo ($17,26 \pm 4,47$ folículos; Ayala et al., 2022).

En ganaderías ubicadas en el centro sur del Ecuador la recría es alimentada al pastoreo con mezclas forrajeras de gramíneas, leguminosas y malezas (82, 7,4 y 11,1%, respectivamente; Nieto et al., 2017). Estas dietas no cubren las necesidades nutricionales (agua, materia seca, proteínas, fibra, vitaminas y minerales) y durante su asimilación modifican las concentraciones de metabolitos en sangre, efecto que interviene sobre los parámetros reproductivos en bovinos de interés lechero (Rodas et al., 2017). Además, se ha demostrado una reducción en el recuento de folículos antrales (RFA) en los ovarios (Ayala et al., 2019), factor que influye negativamente en los resultados obtenidos al aplicar biotécnicas reproductivas como la superovulación (SOV), la aspiración ecoguiada (OPU) y la producción de embriones *in vitro* (PIVE).

Para mejorar los resultados de la OPU se han probado protocolos de sincronización de la onda folicular (Ayala et al., 2020), con la adición de gonadotropinas (FSH) para estimular el

ovario y homogenizar el tamaño de los folículos y la calidad de los complejos cumulo ovocito (COC's) obtenidos mediante esta biotécnica (Seneda et al., 2020). Sin embargo, la hormona es escasa y costosa, factor que eleva el precio del producto final (embrión), por lo cual este grupo de investigación en trabajos preliminares se viene empleando la vía epidural para la administración de la FSH como factor de estimulación ovárica, en busca de mejorar la respuesta en cuanto al número y calidad de ovocitos recuperados por OPU, basado en trabajos que obtuvieron resultados alentadores al utilizar esta vía como Sakaguchi et al., (2018) y Chumchai et al., (2021).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la fibra sobre la respuesta ovárica estimulada con hormona foliculoestimulante en vaquillas Holstein mestizas alimentadas con forrajes de diferente edad fenológica

2.2 Objetivos Específicos

- Analizar la composición química del forraje con dos edades fenológicas diferentes.
- Determinar el número y tamaño de folículos antrales presentes en el día de OPU, luego de la estimulación ovárica con 125 UI de FSH por vía epidural en vaquillas mestiza Holstein, alimentadas con forrajes con nivel bajo y alto de fibra.
- Evaluar la cantidad y calidad de COC´s recuperados en las sesiones de OPU, en vaquillas mestizas Holstein con o sin estimulación ovárica, alimentadas con forraje con nivel bajo y alto de fibra.

3. Revisión de Literatura

3.1 Edad fenológica de los pastos

La edad fenológica de los pastos nos va permitir conocer cuál es el momento en la que se puede consumir el pasto por el animal, y de esta manera poder ser utilizada la materia seca digerible. Para poder saber cuál es la edad fenológica del pasto se debe de tomar en cuenta el número de hojas verdes que se encuentra en el rebrote del pasto (Cascantes et al., 2016). Se puede describir como las diferentes fases fenológicas de una pastura a las siguientes; germinación, floración y aprovechamiento. Siendo estas condicionadas por las condiciones climáticas presentes en la zona de cultivo, estas últimas van a modificar los días de duración de cada una de las etapas, siendo más cortas en invierno y más largas en verano (Nawecha, 2013).

El estado fenológico en el cual se encuentre una pastura va a influir directamente sobre su calidad y la cantidad de nutrientes (minerales, proteína, vitaminas, lípidos, etc.), ya que mientras una pastura en etapas tempranas su contenido nutricional es elevado, mientras que su contenido de fibra es menor, y, a medida que la pastura envejece estas proporciones se invierten, siendo la fibra en mayor cantidad en comparación a sus nutrientes, por tal motivo el estado adecuado para su aprovechamiento es cuando la pastura tiene sus tres hojas verdaderas (Oña, 2018)

3.2 Concepto de la fibra de una pradera

La fibra es un componente que forma la estructura de la pared celular de las plantas, y estimula el proceso de rumia; tiene menor porcentaje de digestibilidad del total del alimento a ser digerido en el rumen (Cruz & Sánchez, 2000). La fibra está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina; sin embargo, desde un punto de vista químico la fibra es un conjunto de componentes que funcionan como un todo. Siendo la fibra el único componente con capacidad de ser digerida por los procesos de fermentación microbiana de la celulosa y la hemicelulosa, sin embargo, este concepto ha evolucionado a través del tiempo, donde en sus inicios hacía referencia a las partes no nutritivas de un alimento (Hernández, 2010). La fibra que se encuentra contenida en una pastura está expresada por la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente acida (FDA) qué paso con la LAD.

La FDN nos permite determinar la capacidad de ocupación que tiene una pastura en el tracto gastrointestinal, esto se refiere al llenado físico de un animal al consumir materia seca (MS), por consiguiente, la FDA es la fracción que se correlaciona negativamente con la digestibilidad de un pasto y su capacidad de aporte de energético, así el contenido de FDA nos permite determinar el aporte energético de un forraje (Cruz & Sánchez, 2000).

3.3 La fibra en los rumiantes: importancia

La fibra es vital en el funcionamiento ruminal, ya que contribuye al llenado y a la estimulación de las contracciones ruminales; además, mantiene el pH ruminal entre 5,5 y 6,8 por acción de la estimulación salivar durante el proceso de rumia. Como nutriente va a depender del porcentaje de fibra de la pastura, pues potreros con altos niveles de fibra se ve afectada su digestibilidad, el aporte energético y digestión de otros nutrientes (Hernández, 2010). La fibra es fermentada de forma lenta en el rumen por acción de bacterias celulolíticas, estas bacterias llegan a producir glucosa como un producto intermedio y el acetato como un producto final (Angeles, 2013).

3.4 Cómo afecta la fibra, proteína en la fertilidad del animal?

La proporción de fibra que contiene una pradera está destinada directamente a la alimentación de los bovinos y se relaciona con el aporte de energía que aporta esta fibra, por lo tanto, cuanto mayor sea el aporte de fibra mayor será el aporte energético de una pradera o viceversa (Cruz & Sánchez, 2000).

La proteína es un nutriente importante para la alimentación del animal, pero debe ser de calidad y en cantidad adecuada; además, hay que considerar que un bovino necesita proteína degradable y proteína digestible en intestino. Un exceso o una falta de proteína en el bovino tiene un efecto negativo en la fertilidad. Sin embargo, el exceso de proteína será excretado o convertida en urea en el hígado del animal, además, representa una pérdida energética para su transformación y eliminación de hasta un 10% de EB, parte de la urea puede ser reciclada hacia el rumen en forma de $\text{NH}_3\text{-H}$, así mismo, su exceso puede ser perjudicial para el funcionamiento normal del útero y oviductos, causando disminución de la fertilidad (Meléndez & Bartolomé, 2017).

Una dieta con exceso de proteína tendrá un efecto negativo sobre la fertilidad a través de sus metabolitos (BUN y urea), en forma directa elevando la concentración de urea en el tracto reproductor llegando a causar un ambiente no adecuado para la correcta implantación del embrión. Y de manera indirecta al tener problemas en el funcionamiento endócrino, metabólico, energético, mineral e inmunitario (Rúgeles, 2017). Existe evidencia científica que ha demostrado que las vaquillas alimentadas con exceso de proteína y luego inoculadas GnRH presentaron menor producción de progesterona, a causa de un exceso de urea o amoniaco durante el desarrollo del cuerpo lúteo (Cappa, 1993).

3.5 Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra bovina está compuesto de ovarios, oviductos, cuernos uterinos, útero, cérvix, vagina y la vulva, como se observa en la figura 1. Ciertos órganos internos se encuentran sostenidos por el ligamento ancho que se forma del peritoneo y se va a dividir en mesovario, mesosalpinx y mesometrio (Rangel et al., 2009).

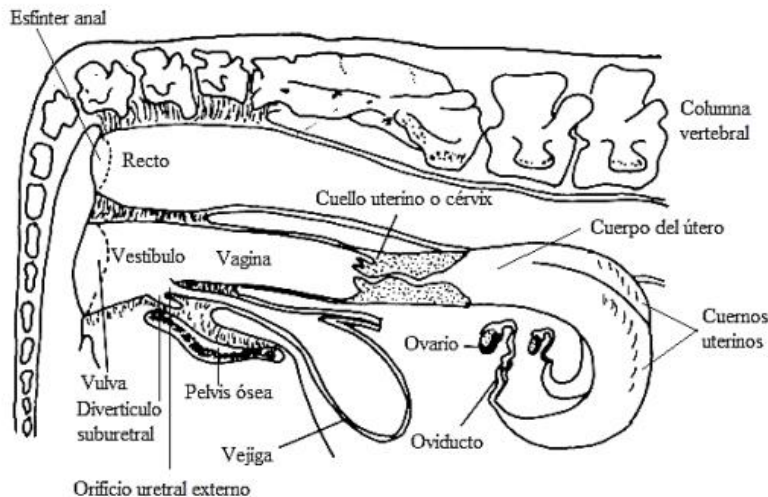


Figura 1: Esquema de la Anatomía del Aparato reproductor de la hembra Bovina

Ovarios

Los órganos más importantes del aparato reproductor de la hembra bovina son los ovarios, los cuales son los encargados de producir óvulos y también de la producción de hormonas como los estrógenos y progesterona, en los ovarios vamos a encontrar dos estructuras que son los folículos y el cuerpo lúteo (Rangel et al., 2009). Los ovarios son de forma ovalada y el tamaño depende de la edad, estado físico y del ciclo estral, en vaquillas el tamaño de los ovarios va a ser más pequeños que en vacas. El peso del ovario oscila entre 6,15 g a unos 20 g, el derecho es más grande que el izquierdo debido a la función fisiológica (Sequeria, 2013).

Oviducto

El oviducto es una estructura que está conformada por varias partes, la más cerca al útero se llama Istmus, la parte más alta del oviducto que se encuentra cerca del ovario se llama Ámpula y es en donde va a ocurrir la fertilización y la porción que se encuentra al final del oviducto se llama Infundíbulo y se encuentra rodeando los ovarios (Nebel & DeJarnette, 2011).

Útero

El útero es un órgano tubular que une el oviducto con el cérvix, este consta de tres partes que son los cuernos, el cuerpo y el cérvix, el útero está compuesto de tres capas que son el endometrio, miometrio y perimetrio. Entre las funciones del útero se encuentra la regulación de la vida del cuerpo lúteo mediante la producción de prostaglandina, transporte de espermatozoides, capacitación de los espermatozoides, lugar de la gestación (Mancheno, 2022).

Vagina y Vulva

La vagina de la vaca es un órgano que se ubica detrás del cuello uterino hasta la vulva, este mide de 15 a 30 cm, la vagina tiene glándulas que van a producir moco el cual lubrica la vagina y va a limpiar cualquier cuerpo extraño. La vulva por su parte es el orificio sexual externo y está compuesta de dos labios, y delante de la unión de los labios en el piso vulvar está el clítoris (Gonzalez, 2016).

3.6 Ciclo estral de la hembra bovina

El ciclo estral son los eventos que suceden entre un celo y otro celo, en la especie bovina dura 18 a 24 días, con un promedio 21 días. Durante este periodo se suscitan algunos cambios hormonales y conductuales por acción del eje hipotálamo, hipófisis y ovarios (Carvajal et al., 2020). La ovulación se produce 30 horas en promedio luego del inicio del celo, a continuación, se forma el cuerpo lúteo (metaestro), El cuerpo lúteo en el diestro permanece funcional, si no existe una gestación el endometrio va a secretar prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) la cual es la encargada de provocar luteólisis y a continuación hay reinicio del ciclo estral. (Hernández, 2016).

3.6.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

En la base del cerebro se encuentra el hipotálamo, en este lugar se produce la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se transporta por los capilares del sistema hipofisario y llega a la adenohipófisis estimula la síntesis y liberación de las hormonas Folículo-estimulante (FSH) y Luteinizante (LH) expresada en la figura 2 (Sintex, 2005). Estos cambios están regulados por factores ambientales, nutricionales y por la condición corporal del animal (Franco et al., 2012). El crecimiento folicular dentro de los ovarios va a iniciar por acción de la FSH, la actúa sobre los folículos que tienen receptores FSH provocando un crecimiento de un grupo de folículos con tamaño $<4\text{mm}$ (fase de reclutamiento), a continuación, un solo folículo adquiere dominancia, por acción del incremento de los estrógenos y la inhibina, acción que conlleva a la atresia de los folículos subordinados y la constante disminución de la FSH. El folículo que se convirtió en dominante continua su desarrollo impulsado por acción de la LH, si este folículo coincide con la etapa de diestro atresia y por consiguiente disminuyen los

estrógenos e inhibina, dando lugar a un nuevo incremento de FSH y el reinicio de una nueva onda folicular (Hernández, 2016).

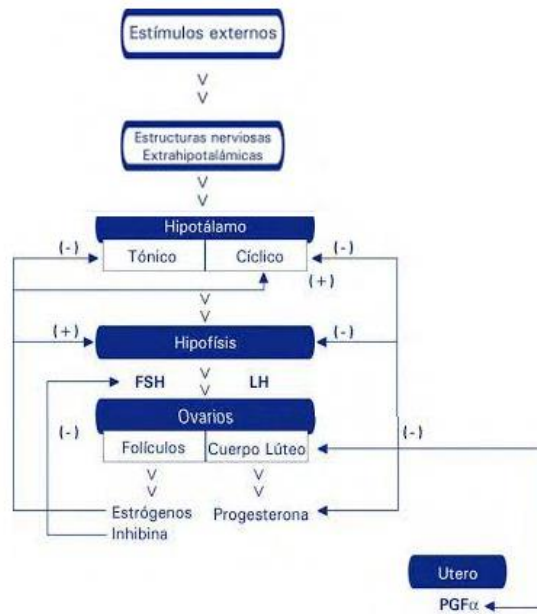


Figura 2: Activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (Sintex, 2005).

2.6.2 Dinámica Folicular

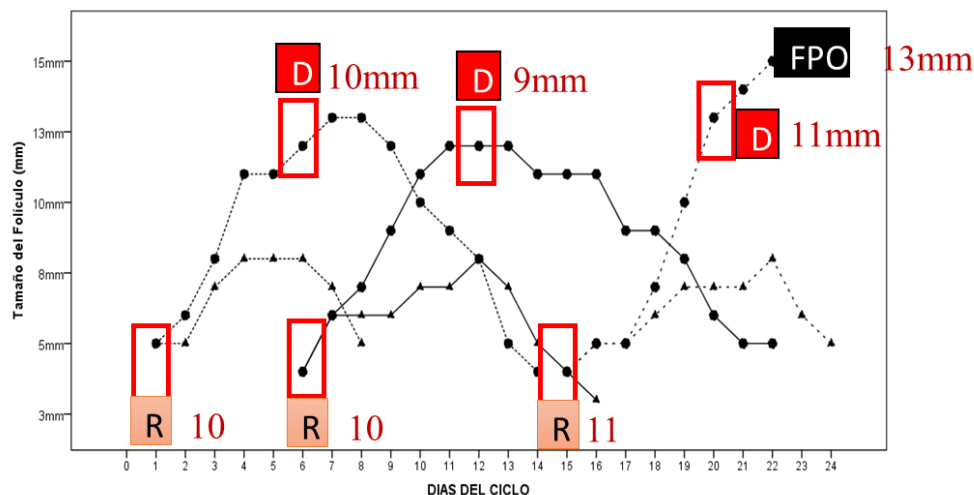


Figura 3: Ilustración Dinámica Folicular (Ayala et al., 2019)

Al proceso en el cual un grupo de folículos antrales < 3 mm se ponen a disposición para iniciar su crecimiento continuo y termina en ovulación o en regresión se le conoce como dinámica folicular, en el bovino existen animales con dos a tres ondas foliculares, como se puede visualizar en la figura 3 (Espinoza et al., 2007). La onda folicular tiene tres fases:

Reclutamiento; un pool de 8 a 11 folículos inicia su proceso de desarrollo, gracias a que son sensibles a la FSH, la hormona permite el crecimiento en promedio de 1,1 mm por día durante la primera onda de crecimiento folicular (Tovío & Duica, 2012).

Selección; el primer folículo que adquiere receptores LH continua su desarrollo y bloquea el desarrollo del resto de folículos que terminan en atresia, cuando sucede se le conoce como fase de desviación (Espinoza et al., 2007).

Dominancia; el folículo dominante por un lado inhibe un nuevo proceso de reclutamiento evitando de esta manera la formación de una nueva cohorte de folículos, y esta inhibición se mantiene hasta que el folículo dominante desaparezca ya sea porque sufra atresia u ovule (Rippe, 2009).

3.7 Sincronización de la onda folicular

Mediante la utilización de hormonas exógenas como el estradiol y progestágenos se puede sincronizar el reinicio de la onda folicular. La progesterona en combinación con los estrógenos inhibe la acción de la FSH provocando atresia del folículo dominante y reinicio de la nueva

onda en un lapso de tiempo de 4 días en promedio (Sarmiento & Naulaguari, 2019). El protocolo contempla la utilización de 4mg de BE intramuscular más la aplicación del dispositivo intravaginal de progesterona el día cero.

3.7.1 Benzoato de estradiol

Los precursores de los estrógenos son los andrógenos producidos en la teca interna, estos pasan a la membrana basal y llegan a las células de la granulosa donde actúa la FSH transformando los andrógenos en estrógenos. La función principal de los estrógenos exógenos es desencadenar la luteólisis cuando es administrado sobre la mitad del ciclo, cuando es aplicado en conjunto con progestágenos este va a suprimir la onda folicular que se está desarrollando, permitiendo el reinicio de una nueva onda folicular en los 3 a 4 días posteriores (De Especialidades Veterinarias, 2005).

3.7.2 Progesterona

Hormona esteroide secretada por el cuerpo lúteo, pero también por la placenta, juega un papel importante en la parte reproductiva y en el mantenimiento de la gestación. La concentración de progesterona sérica va a depender de la relación entre la producción y el metabolismo de esta. Otra función de la progesterona se relaciona con el crecimiento del folículo, estudios han demostrado que concentraciones elevadas de P4 mejora la tasa de concepción en los protocolos de IATF (Ferreira, 2016). La progesterona a nivel de hipotálamo tiene un efecto de feed back negativo en el centro tónico. La inhibina va a disminuir la secreción de gonadotropinas especialmente la FSH, generando de esta manera un feed back negativo a nivel hipofisario (Samaniego, 2017).

3.8 FSH/LH

La hormona folículo-estimulante (FSH) es la principal hormona que se utiliza para el proceso de superovulación o para la estimulación ovárica. La FSH aplicada exógenamente en folículos en reclutamiento permite que varios folículos antrales sean seleccionados y alcancen la dominancia y de esta manera se pueda contar con un gran número de folículos listos para ovular (Bautista, 2019). La FSH es importante en el proceso de la ovogénesis y la espermatogénesis; también, aumenta la actividad de la inhibina y de esta manera controla su propia síntesis (Madrid et al., 2014). La hormona LH por su parte cumple un papel de esteroideogénesis ovárica, la ovulación y la formación y del mantenimiento del cuerpo lúteo. Estas hormonas son secretadas en forma pulsátil y son reguladas por dos sistemas: el tónico y el cíclico, y es el segundo el encargado de producir la ovulación (de Especialidades Veterinarias, 2005)

3.9 Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) fue utilizada por primera vez en a finales de 1980 en los bovinos en los Países Bajos, pero esta técnica se empezó a utilizar de manera rutinaria en la década de los 90 (Ruiz, 2010). La técnica OPU ha incrementado su uso rutinario desde su implementación dentro de la reproducción bovina, esto permite conocer la procedente en un 100% de las crías (Galli et al., 2001). Una gran ventaja de la OPU es que puede ser empleada en hembras en distintas etapas fisiológicas e incluso en hembras que no responden a la superovulación hormonal, en terneras y novillas desde el 6to al 8vo mes (Ruiz, 2010).

Inicialmente los protocolos para la OPU no contemplaban la estimulación hormonal; sin embargo, permitía hacer dos veces por semana, mejorando el porcentaje de recuperación de ovocitos ya que no existía un desarrollo folicular dominante al aspirar los folículos visibles. (Held & GmbH).

3.9.1 La aspiración folicular ecoguiada: Técnica

La aspiración folicular se realiza con un equipo de ultrasonografía, que cuenta con un transductor sectorial, una bomba de aspiración y una guía para la aguja de punción. La sonda que se utiliza en la OPU es una sectorial, la aguja normalmente es 20G. Por uno de los extremos el sistema de succión está conectado a una bomba de vacío, lo que permite que el contenido folicular llegue directamente al recipiente de recolección, para luego ser analizada al microscopio las estructuras aspiradas (Nava y Hernández , 2005)

3.10 Clasificación Complejos Cumulo Ovocito

Los COC's recuperados en la OPU son clasificados para que los considerados aptos puedan ser llevados al protocolo de producción de embriones *in vitro* (PIVE), de esta forma poder garantizar una adecuada sobrevivencia. La clasificación de los COC's se basa en 4 componentes importantes: las características del núcleo, las del citoplasmáticas, el aspecto de la corona radiada y la expansión de las células del cúmulo (Zárate, 2006).

El primer aspecto que se evalúa es la morfología del citoplasma y las características de las células del cúmulo (Martínez, 2013). Así: COC's de tipo A aquellos que presentan un citoplasma homogéneo y transparente, con células del cumulo con más de capas (> 4) y de forma compacta. El COC's de tipo B presenta un citoplasma homogéneo, pero con algunas zonas periféricas oscuras y sus células del cumulo se encuentran varias capas, pero en un extremo no existe células del cúmulo (1-3). El tipo C posee un citoplasma irregular con varias zonas oscuras y con un cumulo denudado, finalmente, el tipo D presenta un citoplasma

irregular con muchas zonas oscuras y con las células del cumulo completamente expandidas, como se observa en la figura 4 (Zárate, 2006).

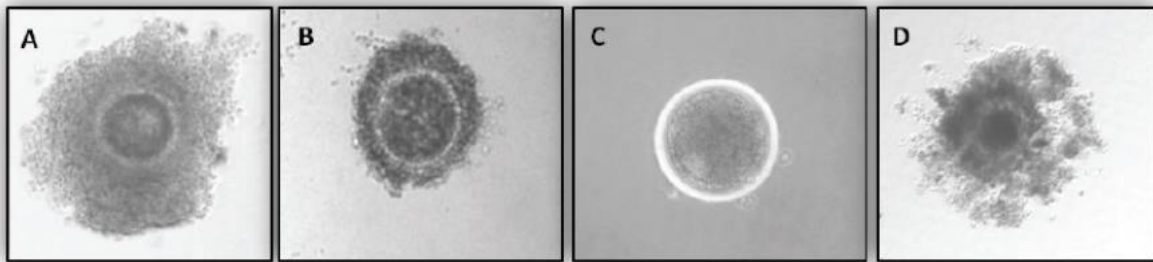


Figura 4: Imágenes microscópicas. Clasificación de ovocitos (Zárate, 2006).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales biológicos

- Hormonas
 - Folículo-estimulante (Pluset®, Calier, Buenos Aires Argentina)
 - Benzoato de estradiol (Sincroben®, Bimeda®, Monte Mor Brasil)
 - Cloprostenol (Estrogest, Livisto, Zaragoza El Salvador)
- Vaconas de raza mestizas Holstein

4.1.2 Materiales químicos

- Alcohol 70%
- Gel
- Lidocaína (Roxicaina® 2%)
- Xilacina (Overxil 2%)
- Implantes de progesterona (Biprogest, Bimeda®, Monte Mor Brasil)
- Heparina (Heparina Sódica)

4.1.3 Materiales de campo

- Ropa de trabajo de campo
- Guantes de auscultación y chequeo palpación
- Jeringas plásticas de 1,3,5,10,20,50
- Pañitos húmedos
- Aplicador de implantes de progesterona
- Agujas desechables 18 G 1 ½, 21G 1 ½
- Tubos Falcón™ 50ml
- Equipo de ultrasonido Aloka®ProSound2 Vet
- Transductor sectorial
- Bomba de aspiración
- Sistema de Guía de Aguja
- Filtro Emcon

4.1.4 Materiales de laboratorio

- Puntas de pipeta
- Pipeta
- Placas Petri cuadradas
- Placas Petri 90 mm,30 mm

- Estéreo microscopio
- Plancha de calefacción

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo entre los meses de julio y octubre del 2023 en una granja particular ubicada en la provincia del Cañar, altitud 3230 m.s.n.m., con temperatura que oscilan entre los 13 a 15°C.



Figura 5: Mapa Satelital de la hacienda particular Juticaray (Google Maps 2023)

4.2.2. Unidades experimentales

Para el estudio fueron destinadas un total de 8 vaquillas Holstein mestizas, edad entre 15-24 meses, con un peso promedio de $347,9 \pm 8,38$ kg, condición corporal de $2,7 \pm 0,03$ (CC), en una escala de 1 a 5 (1 muy flaca, 5 muy gorda), según lo descrito por Hoedemaker et al. (2009).

Durante el experimento las vaquillas permanecieron en un mismo grupo, y se alimentaron (pastoreo) con una mezcla forrajera de gramíneas y leguminosas en primera instancia de edad fenológica de 28 días y luego las vaquillas consumieron esta misma mezcla forrajera, pero con una edad fenológica de 42 días. las vaquillas tuvieron agua ad *libitum*.

4.2.3 Diseño experimental

El experimento fue dividido en dos fases de alimentación en la misma pradera, la primera: forraje de 28 días de edad fenológica y la segunda, forraje de 42 días. En el estudio se probaron cuatro tratamientos: T0 = fibra de 28 días de edad fenológica (n=8), T1 = fibra de 28 días de edad fenológica + administración de 125 UI de FSH (n = 8), T2 = fibra de 42 días de edad fenológica (n = 8), T3 = fibra de 42 días de edad fenológica + administración de 125 UI de FSH (n = 8). Las variables valoradas fueron:

- Composición botánica de los forrajes
- Análisis químico de los forrajes
- Número y tamaño de folículos presentes en los ovarios
- Número y calidad de los COC's recuperados por OPU

Metodología:

Para determinar la proporción de gramíneas y leguminosas, contenido nutricional y niveles de fibra, se procedió a realizar aforo del potrero y análisis químico de cada uno de los potreros en estudio (28 d y 42 d), la determinación de materia seca se realizó en el laboratorio de bromatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y el análisis químico de las muestras en un laboratorio particular. Para la estimación de la franja diaria se basó en el método de la estimación de la oferta diaria de la pradera, lo que corresponde a la cantidad de forraje disponible (Kg de MS) por animal al inicio del pastoreo (Canto et al., 2012).

Protocolos de los tratamientos:

Protocolo del tratamiento cero (T0)

Luego de los 12 días de adaptación, estas vaquillas recibieron el día cero 0,4 mg de Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (Fig. 1).

Protocolo del tratamiento 1 (T1)

Luego de un receso de 12 días, las 8 vaquillas alimentadas con fibra de 28 días, recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). El día 4 del protocolo se administró 125 UI de FSH (Pluset), vía epidural. La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (Fig. 1).

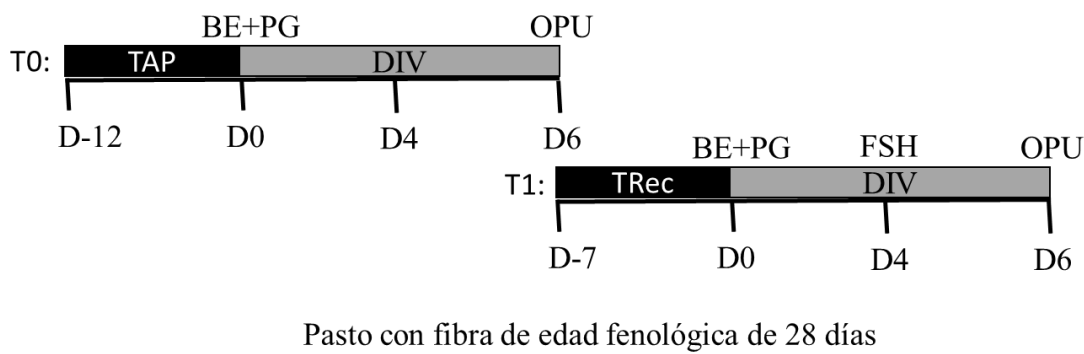


Figura 6: Protocolos de los tratamientos 0 (T0) y 1 (T1) desarrollados en praderas con fibra de 28 días de edad fenológica. TAP = tiempo de adaptación de las vaquillas al forraje previo a las sesiones de OPU. BE = Benzoato de estradiol. PG = prostaglandina. DIV = dispositivo intravaginal de progesterona. OPU = Sesión de aspiración ecoguiada. Trec = tiempo de receso entre sesiones de OPU. FSH = hormona foliculoestimulante.

Protocolo del tratamiento 2 (T2)

Cuando el forraje tuvo fibra de 42 días de edad fenológica se ingresó a las 8 vaquillas, al potrero y se les brindó 12 días de periodo de acostumbamiento, el siguiente día fue considerado día cero del protocolo y recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (Fig. 2).

Protocolo del tratamiento 3 (T3)

Luego de un receso de 12 días, las vaquillas ingresaron al tratamiento 3, en el día cero recibieron 0,4 mg Benzoato de Estradiol (IM), más 25 mg de Prostaglandina (IM) y se aplicó un dispositivo intravaginal de 0,9 g de progesterona (CIDR). El día 4 del protocolo se administró 125 UI de FSH vía epidural. La OPU fue realizada el día 6 del protocolo (Fig. 2).

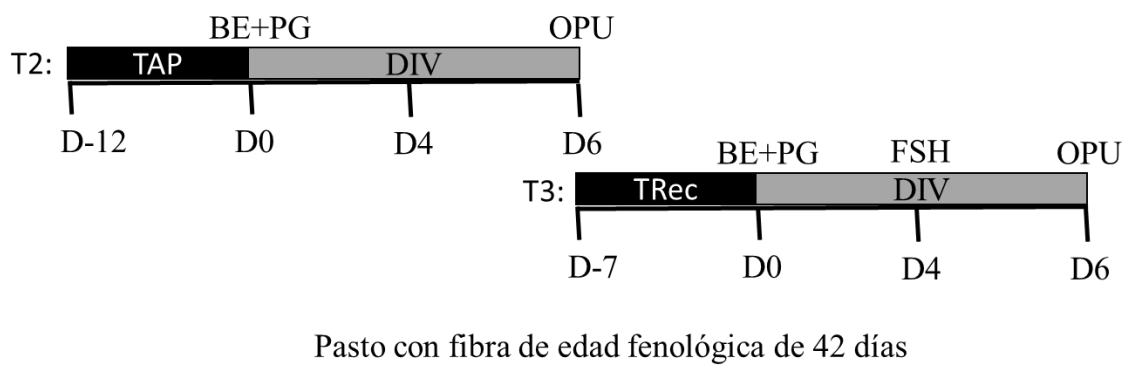


Figura 7: Protocolos de los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3) desarrollados en praderas con fibra de 42 días de edad fenológica. TAP= tiempo de adaptación de las vaquillas al forraje previo a las sesiones de OPU. BE=Benzoato de estradiol. PG=prostaglandina. DIV=dispositivo intravaginal de progesterona. OPU=Sesión de aspiración ecoguiada. TRec=tiempo de receso entre sesiones de OPU. FSH=hormona folículoestimulante.

4.2.4 Valoración del número y tamaño de folículos

La determinación del número de folículos se realizó previo a cada sesión de OPU (día 6), de acuerdo a la metodología descrita por Ayala et al. (2019), quienes indican que se debe realizar un barrido latero media, dorso ventral del ovario derecho y luego el izquierdo, para determinar el número y el tamaño de cada uno de los folículos existentes en los ovarios. Con la información obtenida se formaron grupos: G1=folículos < 4 mm; G2=folículos entre 4-8 mm; G3=folículos >8 mm.

Aspiración ecoguiada (OPU):

Preparación de las vaquillas para las sesiones de OPU

Las vaquillas fueron colocadas en una manga (Brete PLUS, Ecuador) cumpliendo las normas de bioseguridad, tanto del operador como del animal. La parte posterior de la vaquilla fue lavada con agua y amonio cuaternario al 10 %. Luego se aplicó por vía epidural (última sacra y primera coccígea) una mezcla de lidocaína al 2 % (Roxicaina®) y xilacina al 2 % (Overxil)

Los ovarios se visualizaron mediante ecografía (Prosound 2, Aloka, Japón) y se contaron todos los folículos con diámetro entre 4 y 8 mm. Luego se procedió a la aspiración transvaginal de los folículos utilizando un escáner de ultrasonido portátil (Prosound 2, Aloka, Japón), equipado con un transductor sectorial de 5 megahertz (MHz) ensamblado en un soporte de sonda. Para la punción se utilizó una aguja hipodérmica desechable (1,2 x 75 mm) conectada en un extremo a un tubo cónico de 50 mL y el otro a una bomba de vacío (WTA BV 003D, Brasil) con una presión regulada a 70 mm de mercurio (mm/Hg).

4.2.5 Valoración de los COC's

La búsqueda y clasificación de los COC's se realizó en un estereoscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), en base a los criterios previamente descritos Ayala et al. (2020). Brevemente, COC's de calidad A: apariencia compacta, con múltiples capas (más de 4 capas) de células de cúmulo, citoplasma granular uniforme y transparente; calidad B: con 1 a 3 capas de células del cúmulo que cubrían la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granuloso; calidad C: parcial o totalmente desnudos, citoplasma con áreas oscuras irregulares; calidad D: células del cúmulo completamente expandidas y decoloradas. Finalmente, los COC's fueron agrupados en aptos (calidad A y B) y no aptos (calidad C y D) según lo descrito por Ayala et al. (2020).

4.3 Análisis Estadísticos

En el software Excel fueron procesados los datos inicialmente y luego estos fueron analizados en el programa estadístico SPSS®. La normalidad de los datos se probó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para establecer la diferencia entre la composición química de la pradera se utilizó la prueba de T de Student. Para evaluar el número de folículos antrales presentes en la OPU, así como, la cantidad y calidad de COC's recuperados se utilizó un ANOVA unidireccional y para comparar medias la prueba de Tukey al 5%. Para determinar el porcentaje de folículos de diferentes tamaños presentes en el momento de la OPU se utilizó la prueba de Chí cuadrado.

5. Resultados y Discusión

Resultados de la composición botánica de los forrajes

En el análisis de la composición botánica de los forrajes utilizados en la alimentación de las vaquillas en el experimento, se estableció la presencia de un 80,1% de gramíneas y dentro de estas se encontraron Ray Grass (*Lolium spp*), Holco (*Holcus lanatus*) y Poa (*Poa pratensis*); además, en menor proporción se determinó la presencia de leguminosas (*Trifolium repens*: 7,4%) y un 6,4% de malezas (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de la composición botánica del forraje utilizado en la alimentación de las vaquillas

Descripción	Porcentaje
<i>Lolium spp</i>	47,2%
<i>Pennisetum clandestinum</i>	17,8%
<i>Holcus lanatus</i> :	12,6%
<i>Trifolium repens</i>	7,4%
<i>Poa pratensis</i> :	2,5%
Malezas:	6,4%
Materia Muerta:	6%

Esta mezcla de gramíneas y leguminosas en proporciones similares es común en praderas mejoradas de ganaderías lecheras de la región centro sur del Ecuador; así en el año 2017 se determinó que las pasturas mejoradas en las ganaderías ubicadas en la provincia del Azuay presentaron un 85,5% de gramíneas, 6,7% de leguminosas y 7,7% de malezas (Nieto et al., 2017).

Resultados del análisis químico del forraje a diferentes edades fenológicas (28 y 42 días)

La diferencia primordial en la composición química del forraje de 28 días frente al de 42 días estuvo en el mayor porcentaje de humedad que presentó este forraje (28 días), factor que conlleva a poseer menor porcentaje de materia seca, pero con un porcentaje de proteína más elevado en comparación al forraje de 42 días. Además, en el forraje de 28 días se observó mayor porcentaje de cenizas, pero menor porcentaje de materia orgánica, con diferencia estadística ($P < 0,05$) de estos componentes nutricionales entre los forrajes de 28 y 42 días (Tabla 2). La fibra bruta presentó porcentajes similares en las diferentes praderas, al igual que el porcentaje de grasa. El porcentaje de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente

ácida (FDA) y la Lignina detergente ácida (LDA) también, fueron similares en los dos tipos de praderas analizadas ($P>0,05$).

Tabla 2: Composición química media del forraje de edad fenológica de 28 y 42 días.

	Forraje 28 días	Forraje de 42 días	<i>P</i> valor
<i>Humedad (%)</i>	88,3±0,70	84,9±0,55	0,002
<i>Materia seca (%)</i>	11,6±0,73	15,1±0,55	0,002
<i>Proteína (%)</i>	21,3±0,81	17,6±0,86	0,008
<i>Fibra Bruta (%)</i>	29,1±0,54	30,7±0,69	0,093
<i>Grasa (%)</i>	2,1±0,21	1,8±0,08	0,150
<i>Cenizas (%)</i>	13,5±0,31	11,6±0,38	0,002
<i>Materia Orgánica (%)</i>	86,5±0,31	88,5±0,47	0,003
<i>ELN (%)</i>	33,93 ±0,68	38,43 ±0,68	0,004
<i>FDN (%)</i>	48,6±1,24	52,2±1,24	0,086
<i>FDA (%)</i>	28,9±1,29	33,2±1,29	0,091
<i>LDA (%)</i>	4,1±0,24	4,7±0,24	0,111

ELN= Extracto libre de nitrógeno FDN=fibra detergente neutra. FDA=fibra detergente ácida. LDA=lignina detergente ácida. Prueba de T de Student

Estos resultados demuestran que los forrajes de edades fenológicas entre 28 y 42 días tienen características nutricionales muy similares en cuanto a FDN; FDA; LDA; Grasa y Fibra bruta, difiriendo en el porcentaje de humedad; materia seca; cenizas materia orgánica y básicamente proteína. Esta particularidad nos lleva a decir que de acuerdo a la necesidad y época del año se puede utilizar en forma adecuada el forraje entre este rango de tiempo sin tener mayor variación en su composición química.

Sin embargo, existen ganaderías en la zona centro sur del Ecuador en las cuales la rotación de los potreros se realiza a los 35 y 70 días (Nieto et al., 2017), por lo que se debería ampliar el estudio a esos días de rotación del potrero.

Resultados generales

En las 32 sesiones de OPU se visualizó un promedio de $19,9 \pm 1,18$ folículos/ sesión, de estos se llegó a aspirar una media de $15,3 \pm 1,25$ folículos/sesión, con una media de recuperación de $11,8 \pm 1,33$ COC´s/sesión, (59,2%). Al clasificar los COC´s recuperados se determinó una media de $6,4 \pm 0,89$ COC´s aptos/sesión y $5,3 \pm 0,65$ no aptos/sesión (Tabla 3).

Tabla 3: Media y desviación estándar general del número de folículos visualizados, aspirados, complejos cúmulo ovocito recuperados (COC´s), aptos, no aptos y porcentaje de recuperación en el total de sesiones de OPU realizadas en el estudio

	Sesiones	X	DE	Mínimo	Máximo
<i>Folículos visualizados</i>	32	19,9	6,68	9	34
<i>Folículos aspirados</i>	32	15,3	7,11	6	31
<i>COC´s recuperados</i>	32	11,8	7,53	4	25
<i>% de recuperación</i>	32	59,2			
<i>COC´s aptos</i>	32	6,4	5,06	1	18
<i>COC´s no aptos</i>	32	5,3	3,67	1	14

X=media. DE error estándar. COC´s= complejo cúmulo ovocito.

El número de folículos antrales (FA) el día de la OPU (día 6 del protocolo) mostro valores concordantes ($17,26 \pm 0,38$ folículos) a los reportados por Ayala et al. (2022) en el genotipo Holstein criado en condiciones de manejo similares al del presente estudio y que fueron valorados el día del reinicio de la onda folicular. Valores que son corroborados ($19,3 \pm 0,75$ folículos) por estudios realizados en Farías et al. (2023) al establecer el número FA presentes al inicio de un protocolo de SOV en vacas de genotipo Holstein y el trabajo realizado por Dután et al. (2023) en vaquillas Holstein al valorar el número de FA el momento de la OPU determino 17,3 folículos.

El porcentaje de recuperación obtenido en el presente experimento del 59,2% fue superior (53,23%) al reportado por Dután et al. (2023) al realizar OPU en vaquillas Holstein; sin embargo, estuvo por debajo del porcentaje de recuperación reportado por Egashira et al. (2019) en sesiones de OPU en vacas negro japonesas.

Media del número de folículos, calidad de los complejos cúmulo ovocitos (COC´s) recuperados en las sesiones de OPU en cada uno de los tratamientos

Al analizar el número de folículos antrales (FA) visualizados el día de la OPU en los cuatro tratamientos se pudo observar que los resultados fueron ($P > 0,05$) similar estadísticamente ($T_0 = 20,6 \pm 2,45$ folículos; $T_1 = 21,1 \pm 2,13$ folículos; $T_2 = 16,3 \pm 2,21$; $T_3 = 21,6 \pm 2,56$ folículos).

Estos resultados indican que la fibra de la pastura de 28 días (T0) y la fibra del pastura de 42 días (T1) no influyeron sobre el número de FA visualizados el día de OPU, presentando valores similares estadísticamente ($P>0,05$) en los dos tratamientos ($T0=20,6 \pm 2,45$ folículos y $T2=16,3 \pm 2,21$ folículos). Esto confirma que el número de FA en los bovinos es una característica fisiológica repetible y heredable en cada una de las ondas foliculares, particularidad que es propia de cada animal (Alward et al., 2023). Igual sucede con los tratamientos T1 y T3 en los cuales los animales adicionalmente recibieron 125 UI de FSH vía epidural, como factor estimulador del ovario, a pesar de la adición de esta hormona no se vio incrementado el número de FA en estos tratamientos presentes en cada onda folicular (Tabla 4). Estos resultados tienen lógica ya que la función que cumple la FSH es estimular el desarrollo de los FA que poseen receptores FSH y se encuentran presentes en los ovarios en un momento de terminado (Giraldo et al.,2017).

Tabla 4: Media y error estándar de los folículos visualizados y aspirados, complejos cúmulo ovocito (COC's), aptos, no aptos recuperados y porcentaje de recuperación en el total COC's en cada sesión de OPU realizada en el estudio en cada uno de los tratamientos

	T0	T1	T2	T3
<i>Folículos Visualizados</i>	20,6±2,45	21,1±2,13	16,3±2,21	21,6±2,56
<i>Folículos aspirados</i>	12,3±1,95a	17,8±2,36ab	10,9±2,05a	19,3±2,69b
<i>COC's aptos</i>	3,8±0,67a	8,3±1,63ab	3,4±1,68a	10,34±2,20b
<i>COC's no aptos</i>	6,8±1,42	4,0±1,03	5,4±1,41	5,3±1,36
<i>Total colectados</i>	10,5±2,07	12,1±2,49	8,8±2,41	15,8±3,35
<i>% de recuperación</i>	51%	57,3%	54%	73,1%

Tratamientos: T0= testigo forraje de 28 días. T1=125 UI de FSH vía Epidural. T2=Testigo forraje 42 días. T3= 125 IU FSH vía Epidural. Prueba de Tukey al 5%. Letras diferentes indica diferencia estadística entre columnas (tratamientos).

Además, el número de FA visualizados el tratamiento testigos T2 en el cual las vaquillas que consumieron el forraje de 42 días ($16,3 \pm 2,21$ folículos) fueron concordantes con los descritos en vaquillas de genotipo Holstein mestizas criadas en el trópico alto ($17,31$ folículos) dos días posteriores al reinicio de la onda folicular (Dután et al., 2022). Sin embargo, las vaquillas que consumieron forraje de 28 días (T0; tabla 4) presentaron valores superiores, esto podría estar relacionado con el mayor porcentaje de proteína que poseía el forraje de 28 días ($21,3 \pm 0,81$ %) frente al forraje de 42 días ($17,6 \pm 0,86$ $17,6 \pm 0,86$), esto ratifica que la proteína influye directamente sobre la producción de la hormona Folículo-estimulante endógena del animal generando mayor crecimiento de los folículos en etapa de reclutamiento y selección (Flórez, 1994).

Cuando las vaquillas en estudio fueron sometidas a estimulación ovárica con 125 UI de FSH presentaron un número de FA superiores visualizados T1 ($21,1 \pm 2,13$) y T3 ($21,6 \pm 2,56$), aunque no hubo diferencia estadística pero si una tendencia, lo cual coincide con los resultados descritos en el estudio realizado en vacas negras japonesas donde se visualizaron $22,1 \pm 10,5$ folículos 72 horas post estimulación (Sakaguchi et al., 2018), esto demuestra estimular con FSH mejora el crecimiento de los folículos permitiendo una mejor visualización de los folículos antrales (Ayala et al., 2020).

El número de FA que fueron aspirados en los cuatro tratamientos no mostraron diferencia estadística entre estos ($P > 0,05$). Además, el número de FA observados en los tratamientos testigos de los forrajes de 28 días y los de 42 días ($T_0 = 12,3 \pm 1,95$ folículos; $T_2 = 10,9 \pm 2,05$ folículos respectivamente), no se vieron influenciados por la fibra de mayor o menor edad fenológica. Sin embargo, fueron casi la mitad de los establecidos en los tratamientos que recibieron FSH ($T_1 = 17,8 \pm 2,36$ folículos y $T_3 = 19,3 \pm 2,69$ folículos). Esta particularidad lleva a pensar que la FSH permite un mejor crecimiento de los FA alcanzando este mayor tamaño que facilita su aspiración mediante la técnica de OPU, como es recomendado en varios trabajos por Ruiz et al. (2014).

Además, los folículos aspirados en los tratamientos testigos ($T_0 = 12,3 \pm 1,95$ folículos; $T_2 = 10,9 \pm 2,05$ folículos) del presente estudio concuerdan con los resultados obtenidos en novillas de genotipo Holstein que fueron de 14,4 folículos aspirados (Cizmeci et al., 2022). Por su parte cuando las vaquillas recibieron estimulación con FSH se logró aspirar en $T_1 = 17,8 \pm 2,36$ folículos y en $T_3 = 19,3 \pm 2,69$ folículos, valores que concuerdan con lo obtenido en vacas adultas estimuladas con FSH por vía intramuscular en las cuales se llegaron a aspirar 20,4 folículos (Morera et al., 2022).

La aplicación de 125 UI de FSH vía epidural en vaquillas que fueron alimentadas con forraje de 42 días permitió una recuperación de un 19,1% más de COC's que su testigo (T_2) y de un 15,8% con relación a las vaquillas que si bien recibieron 125 UI de FSH fueron alimentados con forraje de 28 días (T_1). Pero algo muy importante es que al administrar 125 UI de FSH a las vaquillas que consumieron forraje de 42 días (T_3) se obtuvo 3 veces más COC's aptos para la PIVE en comparación con su testigo (T_2 ; $P < 0,05$); sin embargo, aplicar 125 UI a las vaquillas que consumieron forraje de 28 días también permitió mejorar los COC's aptos para la PIVE en proporciones similares estadísticamente que los de T_3 , por lo tanto, se considera que el administrar 125 UI mejora per se el número de folículos aspirados y la calidad de COC's recuperados ($P < 0,05$).

Por su parte en la recuperación de COC's muestra un incremento significativo cuando las vaquillas son estimuladas con FSH ($T_3 = 73,1\%$), porcentaje que concuerda con los resultados

(80,4%) obtenidos por Samaniego (2017) cuando estimularon los animales con FSH vía muscular. Sin embargo, cuando los animales no reciben FSH previo a la OPU (T2= 54%), los valores obtenidos fueron (55,7%) similares a los obtenidos por Alvarado, (2017).

Resultados del número de folículos y calidad de los COC's de acuerdo al tamaño de los folículos presentes en el momento de la OPU

Los folículos observados en el momento de la OPU en cada uno de los tratamientos (T0; T1; T2; T3) fueron clasificados en tres grupos: grupo 1 (< 4 mm); Grupo 2 (4-8 mm) y grupo 3 (> 8 mm). Al analizar esta información se determinó que los animales que consumieron forraje de 28 días y no recibieron hormona (testigo = T0) mostraron mayor porcentaje de FA en los grupos 1 (39,8%) y 2 (48,2%) frente al grupo 3 (12%). Esta tendencia de presentar mayor porcentaje en el grupo de FA < 4 mm y entre 4-8 mm también fue reportado por Egashira et al. (2019) quienes determinaron porcentajes del 91,6% en el grupo clasificado por ellos como < 5mm; 6,3% en el grupo entre 5-8 mm y 2,1% en FA >8 mm. Esto demuestra que realizar OPU en la fase de selección permite aspirar folículos con tamaños que oscilan entre 4-8mm.

Sin embargo, cuando se administró 125 UI de FSH vía epidural en una sola dosis a los animales que consumieron forraje de 28 días (T1) el porcentaje de FA fue similar en los grupos 1 (46,2%), 2 (45%) y 3 (8,9%) a los observados en el tratamiento 0 (testigo 28 días). Esto lleva a pensar que la estimulación con 125 UI de FSH en una sola dosis vía epidural en animales que consumen un forraje con alto porcentaje de proteína ($21,3 \pm 0,81\%$; Tabla 2) no influye positivamente el crecimiento de los FA, seguramente porque la dosis fue muy baja para provocar un efecto sostenido de crecimiento folicular.

Un resultado muy interesante fue observado en las vaquillas alimentadas con forraje de 42 días (T2) que no recibieron FSH, en estos el porcentaje de FA en el grupo 1 (< 4mm; 76,2%) fue 3,4 veces más que el grupo 2 (4-8 mm; 22,3%) y 5,8 veces más comparado con el grupo 3 (>8mm; 1,5%). Este resultado difiere con los porcentajes observados en el tratamiento control del forraje de 28 días (T0), en el cual tanto el grupo 1 y 2 los porcentajes fueron similares y se encontraban alrededor del 45%, en cambio este tratamiento (T2) básicamente el mayor porcentaje se encontró en el grupo 1 (<4 mm), es decir folículos más pequeños. Esta particularidad podría estar ligada al menor porcentaje de proteína que registro este forraje de 42 días ($17,6 \pm 0,86\%$) frente al de 28 días ($21,3 \pm 0,81\%$) y como está descrito bajos niveles de proteína están relacionados con problemas reproductivos por fallas en la producción hormonal de las gonadotropinas y dentro de estas la FSH, que es la hormona encargada del desarrollo del folículo antral (Blauwiel et al., 1986).

Tabla 5: Porcentaje de folículos de cada grupo (<4mm; entre 4-8mm; >8mm) presentes en cada uno de los tratamientos en todas las sesiones de OPU realizadas en el estudio.

	<4 mm	4-8 mm	>8 mm
T0	66 (39,8%)b	80 (48,2%)b	20 (12,0%)a
T1	78 (46,2%)b	76 (45,0%)b	15 (8,9%)a
T2	99 (76,2%)c	29 (22,3%)b	2 (1,5%)a
T3	32 (20,5%)b	116 (74,4%)c	8 (5,1%)a

Grupos de folículos: Grupo 1 =<4 mm. Grupo 2 = entre 4-8mm. Grupo 3=>8mm, organizados con la información obtenida en los tratamientos: T0= testigo forraje de 28 días. T1=125 UI de FSH vía Epidural. T2=Testigo forraje 42 días. T3= 125 IU FSH vía Epidural. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Letras diferentes indican diferencia entre filas.

Finalmente, las vaquillas de T3 que recibieron 125 UI de FSH y que fueron alimentados con forraje de 42 días presentaron su mayor porcentaje de FA en el grupo 2 (4-8mm; 74,4%), es decir 3 veces más folículos que en el grupo 1 (< 4mm; 20,5%), esto lleva a pensar que la dosis de FSH (125 UI) en vaquillas que consumen forraje con menor cantidad de proteína si influye positivamente en el desarrollo de los folículos a diferencia de lo observado con el tratamiento T1 en el cual no mostro funcionalidad la administración de FSH. Por lo tanto, administrar FSH a vaquillas que consumen forraje con edad fenológica mayor, con menor cantidad de proteína permite estimular el ovario de mejor manera y obtener un 75% de FA con un tamaño entre 4-8 mm, medida que es recomendada para que sean aspirados en el 6 día de un protocolo de OPU (Ruiz et al., 2013).

Resultados del porcentaje de COC´s obtenidos en cada uno de los grupos

Al analizar el porcentaje de COC´s aptos obtenidos en los grupos 1; 2 y 3 de los tratamientos T0; T1; T2 y T3 se detalla en la tabla 6. En las vaquillas que consumieron un forraje de 28 días (T0) y no recibieron FSH (testigo) se observó que mientras mayor tamaño presentaba el folículo mayor porcentaje de COC´s aptos se obtenían (grupo 1=13,6%; grupo 2=22,5%; grupo 3=25%); sin embargo, solo 1 de cada cuatro COC´s fueron aptos en los grupos 2 y 3. Esto podría estar relacionado con el porcentaje elevado de proteína que contenía el forraje de 28 días, factor que predispone la biodisponibilidad de la IGF, lo cual aumenta la sensibilidad de los folículos a la FSH permitiendo un crecimiento de los folículos que poseen receptores FSH, si bien esto permite un buen desarrollo del folículo lo cual fue visto en la tabla 5; sin embargo, los altos niveles de proteína que presentaron el forraje de 28 días disminuyó la calidad de ovocito por aumento de la concentración plasmática de urea (Armstrong et al., 2001).

Al administrar 125 UI de FSH vía epidural a las vaquillas que consumieron forraje de 28 días se observó que se duplicó el porcentaje de COC´s recuperados en el grupo 2 (48,7%) del tratamiento 1 (Tabla 6), respecto al mismo grupo del tratamiento testigo (T0=22,5%); así como en los grupos 1 y 3. Esto demuestra que el administrar FSH (Pluset) que tiene una composición de 50% FSH y 50% LH permite estimular el ovario para que los folículos alcancen tamaños entre 4 y 8 mm, principalmente 8 mm en el cual ya han alcanzado capacidad ovulatoria (Ginther, 2019).

Las vaquillas del tratamiento 2 vuelven a mostrar un descenso en su porcentaje de COC´s aptos recuperados en el grupo 2 (10,3%), manteniéndose alto en los grupos 1 (23,2% y 3 50%). Sin embargo, muestra un incremento considerable en el tratamiento 3 (vaquillas que recibieron 125 UI de FSH y que consumieron forraje de 42 días), llegando a obtenerse sobre el 50% de COC´s aptos en los grupos 1 y 2 y un 37% en el grupo 3, concluyendo que la administración de FSH a las vaquillas que consumen forraje de 42 días permite un crecimiento sincrónico del folículo y del ovocito.

Tabla 6: Porcentaje de COC´s aptos presentes en los folículos clasificados como <4mm; entre 4-8mm; >8mm, presentes en cada uno de los tratamientos

	<4 mm	4-8 mm	>8 mm
T0	13,6%	22,5%	25%
T1	26,9%	48,7%	53,3%
T2	23,2%	10,3%	50%
T3	59,4%	50%	37,5%

Grupos de folículos: Grupo 1=<4mm. Grupo 2= entre 4-8mm. Grupo 3=>8mm, organizados con la información obtenida en los tratamientos: T0= testigo forraje de 28 días. T1=125 UI de FSH vía Epidural. T2=Testigo forraje 42 días. T3= 125 IU FSH vía Epidural.

Los porcentajes de COC´s aptos recuperados en los diferentes grupos están dentro de los reportado en otros trabajos realizados en condiciones medioambientales similares de trópico alto (61,1%) en vaquillas Criollas (Ayala et al., 2018).

Conclusiones

- La composición química del forraje de 28 y 42 días de edad fenológica, presentan valores similares de FDN, FDA, LDA, grasa y fibra bruta, sin embargo, existe una diferencia en proteína, materia seca y humedad, por lo cual se debería ampliar el estudio en cuanto a los días de rotación del potrero para de esta forma tener forrajes

que presenten diferentes niveles de fibra y de esta manera poder determinar si existe un efecto sobre la respuesta ovárica.

- Cuando las vaquillas consumen forrajes de 42 días de edad fenológica presentan mayor número de folículos visualizados y su tamaño es superior el momento de la OPU.
- Pero si, además, de alimentar a las vaquillas donadoras con forrajes de 42 días de edad fenológica y se estimula los ovarios con 125 UI de FSH administrada vía epidural en una sola dosis, se mejorará el número de COC's recuperados y clasificados como aptos para la producción de embriones *in vitro*.

Recomendaciones

- Realizar nuevas investigaciones incluyendo praderas que tengan una mayor edad fenológica (70 días) para de esta forma poder determinar la incidencia de la fibra sobre la actividad ovárica.
- Replicar esta investigación en vacas que se encuentren en producción, ya que son animales que tiene otros requerimientos nutricionales en especial la energía y la proteína.

Referencias

- Adamiak, S. J., Mackie, K., Watt, R. G., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of reproduction*, 73(5), 918-926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>
- Angeles, S. (2013). Fermentacion ruminal, tamaño de la partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. *Sitio Argentino de Produccion Animal*. https://doi.org/https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/104-fermentacion_ruminal.pdf
- Armstrong, D. G., McEvoy, T. G., Baxter, G., Robinson, J. J., Hogg, C. O., Woad, K. J., . . . Sinclair, K. D. (2001). Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1624-1632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1624>
- Ayala, L. E., Pesantez, J. L., Rodas, E. R., Dután, J. B., Calle, G. 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4135>
- Ayala, L., 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). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.17009>
- Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, G., . . . Perea, F. (2018). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>
- Bautista, V. (2019). *Repositorio Espe*. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/18787/T-ESPE-039101.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Canto , F., Torres , A., & Moscoso , C. (2012). Mejorando la deficiencia de utilizacion de la pradera. Calculo de la franja de pastoreo . *INIA REMEHUE*(106), 1-4.
- Cappa, V. (1993). Alimentacion y fertilidad en los bovinos (y III). *Revista Mundo Ganadero* , 48-57.
- Carvajal , A. M., Martínez, M. E., & Tapia , M. (2020). *INIA*. https://puntoganadero.cl/imagenes/upload/_5f739ec4a0051.pdf
- Cascantes , S., Harrington , A., Noguera, L., & Villalobos , V. (2016). Pastoreo bajo concepto de edad fenologica con pasto kikuyo en la finca lechera La Concordia . *Proleche* , 1-7. <https://doi.org/http://proleche.com/recursos/documentos/congreso2016/Poster3.pdf>
- Chumchai, R., Ratsiri, T., Ratchamak, R., Vongpralub, T., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. (6 de Octubre de 2021). *Animal Reproduction*. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0053>
- Cruz, M., & Sánchez, J. (2000). *Universidad de Costa Rica*. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/nutrianimal/article/download/10317/9708/14671>
- de Especialidades Veterinarias , L. (2005). Fisiologia reproductiva del bovino. (1-4).
- De Especialidades Veterinarias, L. (2005). Manejo farmacologico del ciclo estral del bovino. *Producción animal*. https://doi.org/https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/72-manejo_farmacologico_ciclo_estral_bovino.pdf
- Durocher, J., Morin, N., & Blondin, P. (2006). Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*, 65(1), 102-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.009>
- Dutan , J., Samaniego , J., Perea, F., Hernandez-Fonseca, H., Pesantez, J., Jácome, A., . . . Ayala, L. (2023). Relacion de la hormona anti-mulleriana con la cantida y la calidad de ovocitos colectados por aspiracion ecoguiada en vaquillas Holstein. *Revista Cientifica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 1(XXXIII), 1-7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33202>
- Espinoza Villavicencio, J. L., Ortega Pérez , R., Palacios Espinoza , A., Valencia Méndez , J., & Aréchiga Flores , C. F. (2007). Crecimiento Folicular ovarico en animales domenticos una revision. *Interciencia*, 32(2), 93-99.

- Estrella Bermeo, C. A., & Suconota Pizarro, A. G. (2018). *Dspace Universidad de Cuenca*.
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo%20de%20titulacion.pdf>
- Fernández Tubino, Á. (2003). *Dinámica Folicular: Funcionamiento y Regulación*. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-5.
- Ferreira, E. (2016). La importancia de la Progesterona. *Entorno Ganadero*, 1-3.
https://doi.org/https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/249-importancia_progesterona.pdf
- Flórez, H. (1994). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA*.
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/34772>
- Franco, J., & Uribe Velásquez, L. F. (2012). *Scielo Colombia*.
<http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v11n1/v11n1a06.pdf>
- Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., Ueda, K., & Nagano, M. (2020). Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 10(7).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *PubMed*, 55(1341-57), 6. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00486-1)
- Gonzalez, K. (2016). *Anatomía Y fisiología Reproductiva de la Vaca*. *Gestion Pecuaria*.
- Held, E., & GmbH, M. (s.f.). *Ovum Pick-Up y Producción In Vitro de embriones bovinos*. *Minitube international AG*, 2-4.
- Hernández Cerón, J. (28 de Noviembre de 2016).
https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf
- Hernández Cerón, J. (28 de noviembre de 2016).
https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf
- Hernández Guzmán, S. (OCTUBRE de 2010). *UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO*. <https://docplayer.es/2393791-Santiago-hernandez-guzman.html>

- Ireland, J., Zielak-Steciwko, A., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., . . . Evans, A. (2009). Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of reproduction*, 80(5), 954-964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073791>
- Madrid, S., López, A., & Echeveria, J. (2014). Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in Antioquia Holstein cattle. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 69(1), 7793-7801. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rfna.v69n1.54747>
- Mancheno, C. (2022). La anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho y la hembra. En C. Mancheno, *Principios de fisiología reproductiva animal* (págs. 18-21). La Caracola.
- Martínez Martínez, Y. (Junio de 2013). *Universidad de Oviedo*. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/17398/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf;jsessionid=B5FE0B42859F0873828B66CBB0C7507E?sequence=1>
- Meléndez, P., & Bartolomé, J. (2017). Avances sobre nutrición y fertilidad en ganado lechero: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(4), 407-417. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4160>
- Monteiro, F. M., Batista, E. O., Vieira, L. M., Bayeux, B. M., Accorsi, M., Campanholi, S. P., . . . Baruselli, P. S. (2017). Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, 90(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>
- Morera Jiménez, A., Velasco García, E., Heras, S., Romero Aguirregomez Corta, J., & Ruiz, S. (2022). *Anales de Veterinaria de Murcia*. 36. <https://doi.org/https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
- Nava, H., & Hernández, H. (2005). Aspiración Folicular. *Manual de Ganadería doble propósito*, 611-614. https://doi.org/http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo3-s8.pdf
- Naweche, R. (2013). Estudio fenológico y bromatológico de tres pastos panicum maxicum (Tanzania), Brachiaria brizantha (Marundu) y brachiaria híbrida CIAT 36087 (Mulatoli)

- y la aceptabilidad en el pastoreo con ganado bovino. *Universidad Estatal Amazonica*.
<https://doi.org/https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/61>
- Nebel , R., & DeJarnette, M. (2011). Anatomia y fisiologia de la reproduccion bovina. *SELECT SIRES INC*, 6, 1-6.
- Oña, C. (2018). Determinacion del periodo optimo de cosecha de mezclas forrajeras en base al valor nutritivo. *Pontificia Universidad Catolica del Ecuador*.
<https://doi.org/https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/228/1/1.INFORME%20FINAL%20TESIS%20CARLA%20O%20C3%91A.pdf>
- Palma, G. A. (2008). *Bioteecnologias de la reproducción*.
http://www.reprobiotec.com/libro_verde/cap_01.pdf
- Rangel , L., Alarcon , M., Galina , C., Hernandez, J., Porras , A., Valencia , J., . . . Paramo , R. (2009). *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM*.
https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Reproduccion%20Animal.pdf
- Rippe, C. (2009). *The Dairy Cattle Reproducton Council*.
<https://www.yumpu.com/es/document/view/41167224/el-ciclo-estral-dairy-cattle-reproduction-council>
- Robalino, N. (2010). Influencia de la fertilizacion y el intervalo de pastoreo en el contenido de FDN y energia en una mezcla forrajera. *Escuela politecnica del Ejercito*.
- Rúgeles, C. (2017). Interrelaciones entre nutricion y fertilidad en bovinos. *MVZ-Cordova*, 6(1), 24-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.21897/rmvz.1062>
- Ruiz López , S. (2010). Ovum Pick Up (OPU) en bovinos Aplicaciones en Bioteecnologias de la Reproduccion. . *ResearchGate*, 31(31), 58-62.
- Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). *Journal of Reproduction and Development*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6189567/>
- Samaniego, J. X. (2017). *Dspace Universidad de Cuenca*.
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>

Sarmiento Quito, S. X., & Naulaguari Tintín, M. (2019). *Repositorio Institucional Universidad de Cuenca*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31787/1/Trabajo-de-titulaci%C3%B3n.pdf>

Sequeria, L. (2013). *Cenida*. <https://cenida.una.edu.ni/textos/nl53t683c.pdf>

Sintex. (2005). *Sitio Argentino de Producción Animal*. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/71-fisiologia_reproductiva_del_bovino.pdf

Tovío Luna, N. I., & Duica Amaya, A. (2012). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Revista Spei Domus*, 8(17), 38-47.

Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G., & Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science*, 82(E-Suppl), E63-E74. https://doi.org/https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE63x

ZárateGuevara, O. E. (Diciembre de 2006). *Repositorio Institucional de la Universidad Veracruzana*.

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/9755/maestria%20Oscar%20Zarate%20Guevara.pdf;jsessionid=01C47FC8490C60617ABA0917B007A9EC?sequence=2>

Anexos



Anexo A: Vaquillas de Estudio



Anexo B: Aplicación de hormonas para la sincronización



Anexo C: Colocación de DIV



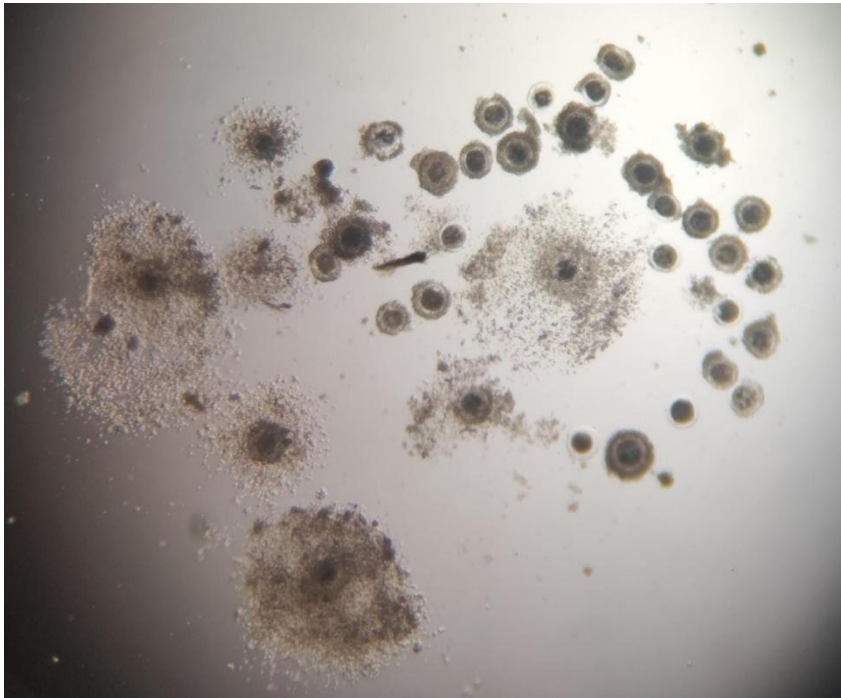
Anexo D: Pluset listo para la aplicación



Anexo E: Valoración de los folículos antes de la OPU



Anexo F: COC's recuperados de T1



Anexo G: COC's recuperados de T3