



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MODALIDAD: PROYECTO DE DESARROLLO

Título:

Efecto de la aplicación de FSH recombinante bovina de Cadena simple (FSH-rCs) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado Bos-Taurus”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Magíster en Ciencias Veterinarias

Autor:

MVZ. Edison Iván Calero Ortiz

Tutor:

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

Co-tutor:

Dr. Manuel García Herreros

LATACUNGA –ECUADOR

2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación **“Efecto de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rCS) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado Bos-Taurus”**

” Presentado por Edison Iván Calero Ortiz, para optar por el título Magíster en Ciencias Veterinarias.”

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, agosto 14, 2024



Dr.Mg. Ph.D. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

CC: 0502236623

APROBACIÓN TRIBUNAL


El trabajo de Titulación: **Efecto de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rcs) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado Bos-Taurus**”, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Ciencias Veterinarias; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.



Dr. Msc. Molina Cuasapas Edie Gabriel
CC: 1722547278
Presidente del tribunal



Dr. Msc. - Arcos Alvarez Cristian Neptali
CC: 1803675634
Lector 2



Dr. Msc. - Beltran Romero Cristian Fernando
CC: 0501942940
Lector 3

DEDICATORIA

Dedicó a Dios y a la Virgencita de Guadalupe por darme salud vida y cuidar de mis pasos en mi diario vivir y así ir cumpliendo mis sueños y anhelos que con mucho esfuerzo y dedicación se van logrando.

A mis padres quien son el pilar fundamental para alcanzar mis logros en mi vida que con sus oraciones y su amor diario me inspiran a ser cada día mejor, a mis hij@s, hermanos y amigos/as que siempre me apoyaron y confiaron en el proceso para lograr dar un paso más en mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente al Dr. Miguel Gutiérrez y al Dr. Manuel García Herreros amigos y colegas que con su conocimiento y apoyo logramos realizar con mucho éxito nuestro trabajo de investigación, que seguro va a aportar con la generación de nuevo conocimiento para las generaciones futuras y el desarrollo tecnológico y productivo del país; al Dr. Luis Vargas, Dr. Edilberto Chacón profesionales que aportaron con su experiencia y fueron parte del trabajo que se realizó para lograr obtener los mejores resultados en nuestro experimento.

A las autoridades de la Universidad Técnica de Cotopaxi, a la facultad de CAREN y CEASA, y de forma particular a la carrera de Medicina Veterinaria quienes me brindaron las facilidades necesarias para realizar mi trabajo de titulación en las instalaciones y en el proyecto Bovino.

A los colegas veterinarios y amigos/as en general que en su momento me extendieron su mano para el desarrollado de este trabajo de investigación, muchas gracias

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Latacunga, agosto 14, 2024



MVZ. Edison Iván Calero Ortiz

C.C 171829879-5

Autor

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, agosto 14,2024



MVZ. Edison Iván Calero Ortiz

C.C 171829879-5

Autor

AVAL DEL VEEDOR

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **Efecto de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rs) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado Bos-Taurus**” contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los miembros del tribunal en la predefensa.

Latacunga, agosto 14, 2024



Dr. MSC. – Molina Cuasapas Edie Gabriel

CC: 1722547278

Presidente del tribunal

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Título: Efecto de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rs) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado Bos-Taurus”

Autor: Edison Iván Calero Ortiz

Tutor: Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

Co-tutor: Dr. Manuel García Herreros

RESUMEN

La aplicación de hormonas convencionales FSH-p en protocolos simplificados para la superestimulación (SOV) ovárica en ganado bovino ha sido limitada. No existen reportes del uso de FSH eficiente en protocolos simplificados para la SOV. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rs / bscrFSH) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado *Bos taurus*. En el estudio se incluyeron 14 vacas multíparas de la raza Holstein friesian sanas (*Bos taurus taurus*), (día ~90 después del parto, peso corporal: 650 ± 50 kg; edad $6 \pm 0,5$ años, puntuación de condición corporal: $3,5 \pm 0,5$), mantenidos en las mismas condiciones de manejo. Los individuos (vacas) fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: grupo control (FSH-rs dosis normal): hormona folículo estimulante recombinante bovina; $n = 7$) y grupo de tratamiento (FSH-rs dosis reducida: hormona folículo estimulante recombinante bovina; $n = 7$). En el grupo control FSH-rs dosis normal, se aplicó un protocolo convencional (una dosis día /decreciente/4 días) y, en el grupo de FSH-rs dosis reducida, un protocolo convencional modificado (2 inyecciones únicas a intervalo de 48 h entre inyecciones/dosis decreciente). Las dosis totales se calcularon según la dosis total recomendada (dosis total 240 ug) (Looney et al., 1988). Para la producción de embriones *in vivo*, el procedimiento convencional de superovulación, la inseminación y los métodos de recolección de embriones descritos por Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Las colectas de embriones se realizaron en los 13, 15 y 17 del protocolo. Mediante ultrasonografía transrectal (transductor lineal de 5 MHz, AloKa SSD500, Japón) se evaluó las estructuras ováricas los días 0, 4, 8, 13, 15 y 17. El análisis de concentración hormonal de estradiol-E2, FSH, LH y progesterona-P4 se realizó mediante ELISA. La clasificación morfológica de

embriones fue acorde a la IETS (Bó and Mapletoft, 2013). En la estadística se usó el paquete de software SPSS ® v.25 (SPSS Statistics para Windows, v. 25.0: IBM Corp., Chicago, IL, EE. UU.). Se aplicó la prueba *t* pareada, ANOVA unidireccional y prueba de Tukey. Para el análisis hormonal se usó medidas repetidas en el modelo general lineal y Shapiro-Wilk y Levene. Para comparar las medias de grupos la prueba *t de Student*, y la prueba de corrección post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Se observó diferencia estadística $p < 0,05$ en la respuesta superovulatoria presentando mayor significancia el ODLy OIL a dosis normal en el día 8 y OIL día 13, y ODL en el día 15 del protocolo. El NFTOTAL fue mayor en el día 8 a dosis normal, con mayor número en el OD. El número de cuerpos lúteos fue mayor en el día 15 a dosis normal. El total de estructuras recuperadas y embriones transferibles (viables) fue mayor a dosis normal en el día 15, el número de óvulos no fecundados fue mayor en el día 17 a dosis reducida y el número de folículos no ovulados. Los niveles plasmáticos hormonales presentaron diferencias estadísticas $p < 0,05$ durante los días 4, 7,8, 13, 14, 15 y 17. Presentando mayor concentración de E2 el día 8 a dosis normal, la FSH el día 4 a dosis reducida, la LH el día 8 a dosis reducida y la P4 el día 17 a dosis reducida. En conclusión, la incorporación de FSH-recombinante en protocolos SOV sería una alternativa importante para reducir el número de aplicaciones y ofrecer una mejor respuesta SOV en ganado bovino, junto con la producción eficiente de embriones viables para transferencia en fresco o para criopreservar. Por tanto, según los resultados obtenidos, la administración de 4 dosis a intervalos de 12 horas y la aplicación de 2 dosis únicas a intervalo de 48 h ofrece una alternativa nueva, segura y eficiente frente a la FSH-p convencional.

Palabras Clave: protocolos FSH-rccs, bovinos, superovulación, embriones.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Title:

Autor: Edison Ivan Calero Ortiz

Tutor: Dr. Miguel Angel Gutiérrez Reinoso

Co-tutor: Dr. Manuel Garcia Herreros

ABSTRACT

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
APROBACIÓN TRIBUNAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	vi
RENUNCIA DE DERECHOS	vii
AVAL DEL VEEDOR	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE CUADROS	xv
INDICE DE GRAFICOS	xvi
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	1
CAPÍTULO I	3
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. DINÁMICA FOLICULAR BOVINOS: CICLO ESTRAL BOVINO	3
1.2. CICLO ESTRAL EN BOVINOS	3
1.3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES	5
1.4. PROTOCOLOS DE 20	
1.5. MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOET)	6
1.6. RESPUESTA PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN BOVINOS	7
1.7. MANIPULACIÓN DE LA APARICIÓN DE ONDAS FOLICULARES EN BOVINOS	9
1.8. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA BOVINOS	10
1.9. SELECCIÓN EMBRIONARIA	11
1.10. MORFOLOGÍA Y CINÉTICA EMBRIONARIA	12
CAPÍTULO II	14
2. DESCRIPCIÓN DE LA SITUACIÓN ACTUAL:	14
2.1. IDENTIFICACIÓN, DESCRIPCIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA:	15

2.2. JUSTIFICACIÓN.	15
2.3. HIPÓTESIS	17
2.3.1. El experimento 1 comprende:	17
2.3.2. El experimento 2 comprende:	17
2.4. OBJETIVO GENERAL	18
2.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO III	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	19
3.1. DECLARACIÓN DE ÉTICA	19
3.2. REACTIVOS Y MEDIOS	19
3.3. UNIDADES EXPERIMENTALES: SEMOVIENTES	21
3.4. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA	21
3.5. GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN (SOV)	22
3.6. EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA	24
3.7. MUESTREO DE SANGRE Y ANÁLISIS HORMONALES.	24
3.8. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE EMBRIONES	25
3.8.1. Clasificación embrionaria	26
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
4. RESULTADOS	28
CAPÍTULO V	45
5. DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO VI	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
CAPÍTULO VII	53
BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación morfológica de embriones bovinos para transferencia de embriones	13
Tabla 2. Insumos para la superovulación de Donantes de embriones bovinos en la raza Holstein Friesian	19
Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian	28
Tabla 4. Estructuras ováricas – número de folículos totales de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	29
Tabla 5. Número de folículos del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	30
Tabla 6. Número de cuerpos lúteos totales en vacas holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina.	31
Tabla 7. Número de cuerpos lúteos del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	32
Tabla 8. Diámetro folicular del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	33
Tabla 9. Diámetro del cuerpo lúteo del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	33
Tabla 10. Estructuras colectadas de vacas donantes Holstein Friesian superovuladas durante la colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	34
Tabla 11. Niveles de concentración hormonal de vacas donantes Holstein Friesian superovuladas durante el protocolo de superovulación y la colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.	40

INTRODUCCIÓN

Justificación

En el bovino las tecnologías de reproducción asistida (TRA) mantienen un crecimiento importante en el continente americano respecto al resto de continentes (Moore & Hasler, 2017). La Sociedad internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) cada año publica datos estadísticos sobre la actividad de TRA en el mundo (J. H. Viana, 2019). Durante el 2019 se produjeron a nivel global más de un millón de embriones (J. H. Viana, 2019). Sin embargo, el freno más importante de esta tecnología ha sido la escasa mejora en la respuesta superestimuladora / superovulatoria de las donantes seleccionadas; ya que durante 30 años apenas se ha conseguido reducir, por un lado, la gran variabilidad en dicha respuesta superovulatoria y la producción de embriones viables tras cada tratamiento (Moore & Hasler, 2017), obteniendo un promedio global de 4,5 embriones transferibles por hembra donante (algo más en vacas de carne que en las de leche) (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014). Esto se puede parcialmente explicar por la variabilidad que se observa en la respuesta del desarrollo folicular a los tratamientos hormonales estándares, principalmente por variaciones individuales en las poblaciones foliculares dependientes de gonadotrofinas al momento del inicio del tratamiento, por la dinámica folicular misma y su control, y por las características del tratamiento de estimulación hormona, entre otros (Mikkola et al., 2019).

Pese a existir un avance vertiginoso en los últimos años en la aplicación de TRA (multiovulación y transferencia de embriones -MOET) en el bovino, aún existen varios factores que afectan la respuesta superovulatoria, entre estos factores están aquellos intrínsecos asociados a la variabilidad individual de cada donante y extrínsecos asociados al origen de la hormona para superestimular. Varias investigaciones han descrito el uso y estandarización de protocolos para superovular. Sin embargo, aún es una limitante el uso de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de origen animal, presentando concentraciones hormonales variabilidad entre lotes producidos (Mikkola et al., 2019).

Estos factores que generan esta variabilidad a día de hoy aún están vigentes en los protocolos convencionales de superestimulación, y consecuentemente el número de embriones viables para transferencia o congelamiento aun no llegan a superar en número de 4,5 / vaca-vacona / colecta (Erdem et al., 2020).

La aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rCS) para la superestimulación ovárica en ganado bovino ha sido utilizada experimentalmente. Se han realizado ensayos con algunas razas de bovinos europeos (*Bos taurus*) utilizando la FSH-rCS, sin embargo, no hay reportes de trabajos de la aplicación en protocolos de superestimulación ovárica utilizando 2 aplicaciones de FSH-rCS en ganado bovino *Bos taurus* y sus efectos en la producción de embriones *in vivo*. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue estudiar los efectos de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rCS) mediante la administración de dos protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado *Bos taurus*. Para lo cual se ha propuesto un diseño experimental basado en la aplicación de dos diferentes protocolos de estimulación ovárica y su efecto en la respuesta superovulatoria y producción de embriones en la raza raza bovina Taurina – Holslein Friesian en ambiente de altitud elevada. Estas diferencias en la producción de embriones *in vivo* (cantidad y calidad) en la raza estudiada y los protocolos de superestimulación ovárica utilizados podrán ser utilizadas en el futuro como base de aplicación de nuevos protocolos más efectivos orientados a la mejora de producción de embriones *in vivo* en las diferentes razas bovinas y de diferente aptitud, leche, carne o de doble propósito.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DINÁMICA FOLICULAR BOVINOS: CICLO ESTRAL BOVINO

El estudio de la dinámica folicular en los últimos años se ha centrado en el desarrollo folicular temprano, más específicamente en las etapas primordial a prenatal (Aerts & Bols, 2010).

Los ovarios en los mamíferos, contienen una gran reserva de folículos primordiales que no crecen. Un folículo primordial es un óvulo u ovocito inmaduro e inactivo, rodeado por una sola capa de células aplanadas denominada pre-granulosa. En la mayoría de las especies animales domesticadas la reserva de folículos primordiales se desarrolla durante la vida fetal (Aerts & Bols, 2010). La transición de folículos que no crecen a folículos en crecimiento es gradual, que inicia después de la formación de los folículos primordiales y continúa durante toda la vida reproductiva (Fortune, 2003). 'Iniciación' del crecimiento o 'activación' de folículos primordiales es la transición de folículo primordial a primario. Esto va acompañado de proliferación y diferenciación de las células de la granulosa: en el folículo primario. Las células de la granulosa tienen forma cúbica en lugar de aplanadas y aumenta el número de células de la granulosa (Aerts & Bols, 2010). En las siguientes etapas de crecimiento el ovocito adquiere volumen expansión y se desarrolla una zona pelúcida entre las células de la granulosa y ovocitos (Van Wezel & Rodgers, 1996). La mayoría de los folículos activados evolucionan hacia el etapa antral, caracterizada por la formación de una cavidad o "antro", después de lo cual la mayoría de los folículos activados regresan y perecer por muerte celular programada (apoptosis), a menos que la presencia de niveles suficientemente altos de la hormona folículo estimulante (FSH) cambia su destino y los incluye en una onda de crecimiento folicular. Se sabe poco sobre el desencadenante responsable de la activación de folículos detenidos en el crecimiento (Oktem & Oktay, 2008) (Aerts & Bols, 2010). . El conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de las poblaciones foliculares tempranas podría mejorar la eficiencia reproductiva de los animales domésticos y contribuir a la preservación de especies animales en peligro crítico de extinción (Cecconi, 2002) (Aerts & Bols, 2010).

1.2. CICLO ESTRAL EN BOVINOS

El rendimiento reproductivo de las vacas lecheras lactantes ha ido disminuyendo en todo el mundo durante las últimas décadas (Miura, 2018) .La disminución de la fertilidad se ha atribuido a diversos factores, como detección de estro, alojamiento, tamaño del hato, manejo nutricional, estados metabólicos y de enfermedad (López-Gatius, 2012) (Shahinfar et al., 2014). Para mejorar la tasa de preñez, se han incorporado programas de sincronización estral en el manejo reproductivo en la industria del ganado lechero y de carne (Gabriel A. Bó et al., 2016). Sin embargo, la comprensión profunda de la fisiología ovárica en vacas lecheras de alta producción es determinante sobre el manejo de la fertilidad (Miura, 2018).

En el ganado bovino, el desarrollo sincrónico de un grupo de 8 a 41 folículos pequeños se observa de 2 a 3 veces durante un ciclo estral, y estos grupos que desarrollan el desarrollo de folículos se denominan onda folicular (Burns et al., 2005). El folículo más grande que continúa creciendo durante la onda folicular se define como folículo dominante (FD), mientras que los otros folículos subordinados entran en atresia (Ginther et al., 1996) (Miura, 2018). La primera onda folicular emerge poco después de la ovulación (día de ovulación = día 0) y la primera onda FD crece entre 8 y 11 días del ciclo estral; sin embargo, el FD de primera onda se convierte en un folículo no ovulatorio porque se desarrolla durante la primera mitad del ciclo estral simultáneamente con el cuerpo lúteo (CL) (Ginther et al., 1989) (Miura, 2018). En los ciclos estrales con un patrón de onda folicular de dos ondas, la segunda onda emerge entre los días 9 y 11 del ciclo estral y el FD de la segunda onda se convierte en un folículo ovulatorio (Adams et al., 2008). Por otro lado, con un patrón de ondas foliculares de tres ondas, la segunda onda emerge entre los 8 y 9 días del ciclo estral, la tercera onda emerge entre los 15 y 16 días del ciclo estral y la tercera onda DF se convierte en un folículo ovulatorio (Adams et al., 2008). Aunque el momento de la luteólisis (dos ondas *frente a* tres ondas: 16 días *frente a* 19 días) y la duración del ciclo estral (dos ondas *frente a* tres ondas: 19 a 20 días *frente a* 22 a 23 días) difieren entre los patrones de dos y tres ondas (Adams et al., 2008) (Miura, 2018), la primera onda folicular emerge poco después del estro y se convierte en un folículo no ovulatorio tanto en los patrones de dos como de tres ondas (Miura, 2018).

En cuanto a las características del desarrollo del FD y los mecanismos de selección del DF durante la onda folicular, la primera onda del FD ha sido bien estudiada (Badinga et al., 1992) (Sartori et al., 2001).

La concentración de 17β -estradiol (E2) en el líquido folicular y la producción de androstenediona (A4) y progesterona (P4) por células cultivadas de la teca fueron mayores en la primera ola FD que en la segunda ola. FD (Wolfenson et al., 1999) (Miura, 2018), la primera onda DF sintetiza E2 (Badinga et al., 1992) (Sartori et al., 2001), y la concentración plasmática de E2 aumenta durante la etapa temprana (4 a 5 días) del ciclo estral (Savio et al., 1993) (Miura, 2018).

La hormona luteinizante (LH) es necesaria para el desarrollo del DF (Ginther et al., 2001). Una mayor frecuencia de pulso de LH se ha observado en ganado con una concentración basal de P4 (Bergfeld et al., 1996) (Miura, 2018). Debido a que la concentración plasmática de P4 es menor durante los días 0 a 6 en la primera onda que en la segunda onda (Miura et al., 2014), la frecuencia del pulso de LH puede haber sido mayor en la primera onda que en la segunda onda durante el desarrollo del DF, y esta condición endocrina puede conducir a un mayor tamaño del FD en la primera ola en relación con el de la segunda ola. La hormona luteinizante induce la expresión genética de *LH* en las células de la granulosa del ganado (Luo et al., 2011). La frecuencia del pulso de LH puede ser mayor en la primera onda que en la segunda onda durante el desarrollo del DF debido a una menor concentración de P4 (Miura et al., 2014). Una frecuencia de pulso de LH más alta podría conducir a una mayor expresión de ARNm de *LHr*.

La progesterona se sintetiza en las células lúteas mediante varias enzimas esteroideas como StAR, P450-scc y 3β -HSD (Diaz et al., 2002). El ARNm de *StAR*, *P450-scc* y *3\beta-HSD* en las células de la granulosa fue mayor en el DF de la primera onda que en el DF de la segunda onda; por lo tanto, se esperaba que la capacidad esteroidea de las células lúteas fuera mayor en el CL de la primera onda que en el CL de la segunda onda. Además, el tamaño del CL de la primera ola fue mayor que el del CL de la segunda ola.

1.3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

Entre las tecnologías de reproducción asistida (TRA) se incluyen varios factores tecnológicos y biológicos específicos de baja y de alta complejidad. Entre ellos los más difundidos actualmente después de la inseminación artificial (IA) son sistemas de producción de embriones *In vitro* (PIV) y los sistemas de producción de embriones *In vivo* mediante el uso de protocolos de superovulación - SOV (Hormona folículo dominante - FSH).

El potencial de los ovarios de vacas (*Bos taurus*) es una fuente abundante de germoplasma (Silva-Santos et al., 2011) con menos del 0,1% de los folículos que se aprovechan y que llegan

a ovular (Silva-Santos et al., 2014). En consecuencia, una de las formas de intensificar el uso del germoplasma de una hembra valiosa (alto mérito genético) es mediante TRA como la superovulación (SOV) para producir embriones *in vivo*. Pese a que la PIV es una de las tecnologías más empleadas en los programas reproductivos en bovinos (Viana, 2022), la SOV mantiene un sitio importante para la producción de embriones en los sistemas de producción comerciales y de investigación. Se ha descrito que los embriones *In vitro* e *in vivo* presentan diferencias morfológicas importantes como el color del citoplasma (Abe et al., 1999), gotas de lípidos (Fair et al., 2001), mitocondrias (Noguchi et al., 2020), microvellosidades, diferencias en la proporción entre el macizo celular interno MCI/TE (Rizos et al., 2002) y mayor incidencia de anomalías cromosómicas y expresión génica en los embriones *in vitro* respecto a los *in vivo* (Driver et al., 2012; Duan et al., 2019). Por tanto, la SOV aún sigue siendo una técnica importante vigente en los programas de mejoramiento genético en las diferentes razas bovinas.

1.4. PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS

Debido al gran potencial de los ovarios de vacas (*Bos Taurus* y *Bos Indicus*) estas estructuras constituyen una fuente abundante de germoplasma. La población de folículos pre-antrales en los bovinos varía de 109000 a 89000 (Silvia-Santos & Sedena, 2011). Por tanto, la forma de aprovechar el germoplasma de una hembra de alto mérito genético es a través de la aplicación de Multiovulación y transferencia de embriones MOET.

1.5. MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOET)

El componente reproductivo en la industria ganadera bovina es un pilar importante cuyo objetivo es obtener un ternero por vaca al año. Sin embargo, a través de la MOET, la eficiencia reproductiva puede incrementarse exponencialmente. Esta tecnología reproductiva implica múltiples ovulaciones y transferencia de embriones producidos *in vivo* o MOET, permitiendo acelerar la mejora genética de explotaciones de bovinas. Además, la MOET permite direccionar el sexo de la descendencia con una eficacia del 90%.

Desde los primeros días del inicio de la transferencia de embriones en bovinos los protocolos de Superovulación (SOV) han mejorado considerablemente. En general esta tecnología se basa en la superestimulación del ovario, mediante el uso de hormonas folículo estimulantes (FSH) o Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) para inducir superovulación en las hembras donantes, seleccionadas previamente por su mérito genético. El protocolo de SOV consiste en la sincronización de la ciclicidad, superestimulación, sincronización del estro, ovulación e IA.

Los embriones son colectados mediante un lavado uterino utilizando un catéter Foley 7 días post inseminación (Machaty et al., 2012). Los embriones colectados son seleccionados y clasificados morfológicamente de acuerdo con los criterios de la IETS (Stringfellow et al., 1998; Bó and Mapletoft, 2013) y pueden transferirse a hembras receptoras previamente sincronizadas o someterse a procesos de conservación a bajas temperaturas, conocidos como criopreservación, para ser transferidos más tarde en receptoras (vacas o vaquillas) de embriones que llevarán la gestación a término.

Los protocolos de superovulación (SOV) varían ampliamente según la fuente de FSH, el diluyente utilizado, el número, la frecuencia y el momento de las inyecciones de FSH, así como por la utilización de varias prostaglandinas, dispositivos internos controlados de liberación de progesterona, hormona liberadora de gonadotropinas y otros medios para controlar el desarrollo folicular y la ovulación (Mikkola et al., 2019). Varios estudios describen los factores relacionados con los animales que pueden influir en la eficacia de la superovulación. Estos incluyen la raza, la edad, la paridad, la genética, el estado de lactancia, el historial reproductivo del ganado, la nutrición, el estrés, el clima, el tiempo y el factor semen (Lee et al., 2012).

Actualmente hay pocos reportes de producción de embriones *in vivo* utilizando hormonas recombinantes y por lo general los trabajos han estado relacionados a proyectos de investigación no concluyentes. Sin embargo, en trabajos recientes se han reportado escasos trabajos de evaluación del uso de FSH recombinante de larga duración (bscrFSH) para superovulación de hembras de fenotipo de carne (Angus Rojo) (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022).

1.6. RESPUESTA PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN BOVINOS

Los protocolos actuales de tratamiento de superestimulación en bovinos están basados en el uso de hormonas de origen animal, extractos purificados de hormona folículo estimulante de glándula pituitaria de cerdo y de ovino. La vida media biológica de la FSH en la vaca ha sido estimada que dura 5 horas o menos (Laster, 1972) (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014), por lo que debe administrarse dos veces al día para inducir la superovulación (Looney et al., 1981). La práctica común en los protocolos convencionales ha sido tratamientos intramusculares con FSH dos veces al día durante 4 o 5 días, con una dosis total de 28 a 50 mg (Armor) de un extracto crudo de hipófisis o 400 mg NIH-FSH-P1 de un extracto de pituitaria parcialmente purificado (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020) (Folltropin-V; Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario, Canadá). Cuarenta y ocho o 72 horas después del inicio del tratamiento, se administra PGF2a para inducir la luteólisis. El estro ocurre entre 36 y 48 horas y comienzan las ovulación (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020) 24 a 36 horas después (Mapletoft & Bó,

2011). Muchos médicos prefieren disminuir los esquemas de dosis de FSH y otros usan esquemas de dosis constantes. Otros médicos tratan con PGF2 a el tercer día del protocolo de tratamiento, y otros prefieren tratar con PGF2a al cuarto día, y otros no reciben tratamiento con FSH al día siguiente de la administración de PGF2a. Experimentos recientes han indicado que la tasa de ovulación puede mejorar en al menos algunas donantes si los tratamientos con FSH son administrados durante 6 o 7 días (García Guerra et al., 2012). Independientemente, la mayoría de los protocolos de superestimulación han tenido éxito en inducir la superovulación en la mayoría de las aplicaciones (Mapletoft & Bó, 2011). Otros especialistas (técnicos en TRA) incorporan un inserto de progestina en el protocolo que garantiza que las donantes no entren en estro temprano, especialmente si no es posible confirmar la presencia de un CL antes de iniciar con los tratamientos con FSH. En todos los casos, las inseminaciones son normalmente realizado 12 y 24 horas después del inicio del estro en las donantes (Mapletoft et al., 2002).

El protocolo convencional inicia la superestimulación ovárica durante la mitad del ciclo y se basó originalmente en información anecdótica y experimental en la que una mayor respuesta superovulatoria se informó cuando los tratamientos superestimulados se iniciaron de 8 a 12 días después del estro (revisado en (Mapletoft & Bó, 2011). Sin embargo, ninguno de estos primeros estudios evaluaron el estado folicular específico de los animales cuando se iniciaron los tratamientos de superestimulación. Esto era principalmente porque el seguimiento del desarrollo folicular mediante ultrasonidos en el ganado se realizó, en la mayoría de los casos, en las primeras etapas de desarrollo y no estaba disponible en muchos laboratorios.

A través de la información generada mediante ultrasonografía, ahora se sabe que de 8 a 12 días después del estro (equivalente a 7 a 11 días después de la ovulación) sería el tiempo aproximado momento de aparición de la segunda onda folicular (Ginther et al., 1989), y una cohorte de folículos en crecimiento estaría presente alrededor de ese tiempo. Sin embargo, se ha demostrado que el día de aparición de la segunda onda folicular difiere entre las dos ondas de ciclos y ciclos de tres ondas (1 o 2 días antes en ciclos de tres ondas), y entre animales individuales (Ginther et al., 1989). En este sentido, se ha demostrado claramente que la respuesta de superovulación se optimizó cuando los tratamientos superestimuladores se iniciaron en el momento de la aparición de la onda folicular (Nasser et al., 1993). Iniciar tratamientos con gonadotropinas desde el día 1 antes o después de la aparición de las olas se redujo significativamente la respuesta superovulatoria en comparación con el inicio de tratamientos el día de la aparición de la ola (Nasser et al., 1993).

Según la duración de las fases de desarrollo del folículo dominante en intervalos interovulatorios de dos y tres ondas, la probabilidad en un momento dado de que el folículo dominante no es funcionalmente dominante (fases tardías o regresivas) es aproximadamente el 30% (6 de 20 días) para animales de dos olas y 35% (8 de 23 días) para animales de tres ondas. Así, sólo aproximadamente el 20% (4 o 5 días) del ciclo estral está disponible para iniciar el tratamiento en el momento de la aparición de la onda folicular. Por lo tanto, el 80% del ciclo estral no es propicio para una óptima respuesta superovulatoria. La necesidad de esperar hasta la mitad del ciclo para iniciar el tratamiento superestimulador también implica un seguimiento del estro y un retraso obligatorio. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos de tratamiento utilizados hoy en día implican el inicio de tratamientos superestimuladores posteriores al control exógeno de la aparición de ondas foliculares (Mapletoft & Bó, 2011).

1.7. MANIPULACIÓN DE LA APARICIÓN DE ONDAS FOLICULARES EN BOVINOS

La capacidad de inducir selectivamente la aparición de ondas foliculares permite el inicio de la superestimulación sin tener en cuenta la etapa del ciclo estral y elimina la necesidad de detectar el estro y esperar de 8 a 12 días para iniciar tratamientos con gonadotropinas (Mapletoft & Bó, 2011). En la década de 1990 se informó sobre el uso de progestinas y estradiol para inducir sincronía aparición de una nueva onda folicular (Mapletoft & Bó, 2011); este enfoque para la inducción de la superovulación en la vaca se ha revisado exhaustivamente (G. A. Bó et al., 2002). Ha sido utilizado por practicantes de todo el mundo y recientemente ha sido incorporados en protocolos que permiten la IA de tiempo fijo (IATF) de las donantes (Baruselli et al., 2006).

El protocolo más común para sincronizar la aparición de una nueva onda folicular para la superestimulación implica la administración de 2,5 a 5 mg de estradiol-17b o 2 a 2,5 mg Benzoato de estradiol más 100 o 50 mg de progesterona usando inyección intramuscular en el momento de la inserción de un dispositivo de progesterona intravaginal (Mapletoft et al., 2002) (Baruselli et al., 2006) (Mapletoft & Bó, 2011). El tratamiento con estradiol suprime la liberación de FSH e induce atresia folicular. Cuando el estradiol se ha metabolizado emerge oleadas de FSH y una nueva onda folicular, en promedio 4 días después del tratamiento (Mapletoft & Bó, 2011). Se inician tratamientos con gonadotropinas en ese momento, es decir, 4 días después del tratamiento. Por lo tanto, este tratamiento permite una nueva cohorte de folículos de 3 a 5 mm, y crecer al mismo tiempo. Aunque el número de embriones transferibles

no siempre ha sido mayor que cuando las vacas fueron superestimuladas entre 8 y 12 días después de la inseminación, la tasa de fertilización en vacas donantes superestimuladas después de los tratamientos con estradiol y progesterona fue significativamente mayor que en las vacas control en al menos dos estudios controlados (Bo et al., 1991) (Mapletoft & Bó, 2011). Además, las novillas fueron superestimuladas 4 días después de la inserción de un dispositivo de progestina sin la administración de estradiol también tuvo un menor porcentaje de óvulos fecundados y embriones transferibles que aquellos tratados con estradiol en el momento de la inserción del dispositivo de progestina. Estos resultados sugieren que la administración de FSH exógena podría no sólo inducir el crecimiento de folículos sanos, pero también aquellos que ya han sido sometidos a atresia. Aunque la respuesta superovulatoria podría no haber sido afectada, la mala calidad de los óvulos/embriones podría haber sido debido a la ovulación de ovocitos incompetentes. Por el contrario, los tratamientos con estradiol y progesterona dieron como resultado el desarrollo de una nueva onda folicular y en consecuencia un grupo más uniforme de folículos viables con ovocitos competentes en el momento del tratamiento con gonadotropinas.

Se ha demostrado que los folículos subordinados pueden salvarse de la atresia mediante ablación del folículo dominante (Adams et al., 1993) o tratamientos con FSH en el momento de la selección del folículo dominante (Price & Estienne, 2018). Además, Goulding y cols. (Goulding et al., 1994) han demostrado que la sobreestimulación en el tratamiento temprano en la fase lútea en novillas con un dispositivo de progestágeno dio como resultado una mala calidad del embrión, lo que fue aparentemente debido a la estimulación de los folículos subordinados que ya estaban sufriendo atresia, con ovocitos que estaban sufriendo una degeneración. Por lo tanto, el estradiol y los tratamientos con progesterona no sólo eliminaron la necesidad del estrógeno, la sincronización y detección antes de la superestimulación, también tendió a mejorar la calidad de los óvulos/embriones (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020).

1.8. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA BOVINOS

En varias especies animales y particularmente en el bovino la aplicación de Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA) se aplica más ampliamente. Anualmente, la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) publica los datos sobre la actividad de TRA (producción de embriones *in vitro* e *in vivo*) en diferentes especies de animales domésticos y

de granja (Viana, 2020). Por varias décadas la técnica de superovulación ha constituido un método farmacológico muy empleado en el ganado bovino para estimular la foliculogénesis ovárica y potenciar el número de ovocitos y embriones obtenidos transferibles (Gutiérrez-Reinoso et al., 2023). Sin embargo, la aplicación de varios componentes hormonales como la FSH-p de origen porcino empleada en el bovino ha presentado variabilidad respecto a la respuesta superovulatoria de las donantes, la calidad embrionaria y la resistencia a la congelabilidad. Es así que, durante los últimos 30 años, apenas se ha conseguido reducir, por un lado, la gran variabilidad en dicha respuesta superovulatoria y aumentar, por otro, la producción de embriones viables tras cada tratamiento. Se ha descrito la obtención de un número promedio de 4,5 embriones transferibles por colecta, lo cual no se ha podido mejorar a lo largo de este tiempo, obteniendo mejores resultados en la respuesta superovulatoria en vacas de carne en comparación con las de leche (Bó & Mapletoft, 2020). Esta variabilidad en los resultados obtenidos durante varios años en relación a la respuesta SOV se puede explicar parcialmente debido a la variabilidad observada en la respuesta del desarrollo folicular a los tratamientos hormonales estándares, principalmente por las variaciones individuales en las poblaciones foliculares al momento del inicio del tratamiento, y también por la dinámica folicular y su control. También se han descrito otros factores que podrían influir directamente en los resultados como los diferentes protocolos de estimulación hormonal, y el continuo declive en la eficiencia reproductiva, entre otros (Mikkola et al., 2019). En general, los factores que afectan la respuesta superovulatoria, se pueden clasificar como aquellos de origen intrínseco los cuales están asociados a la variabilidad individual de cada donante y aquellos extrínsecos que se asocian al origen de la hormona utilizada para superestimular el ovario (Mikkola et al., 2019). Sin embargo, aún es una limitante el uso de hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) de origen animal, las cuales han presentado concentraciones hormonales variables entre lotes fabricados (Mikkola et al., 2019). Estos factores que generan variabilidad en la respuesta superovulatoria aún están vigentes en los protocolos convencionales, y consecuentemente, el número de embriones viables obtenidos para transferencia o congelación aún no llegan a superar en número promedio de 4,5 / vaca-vaquilla / colecta (Erdem et al., 2020). Por tanto, la investigación actual se ha basado en la producción de hormonas mediante biotecnología recombinante con el fin de evitar la utilización de proteínas de origen animal (Bó & Mapletoft, 2020), con la posibilidad de diseñar y estandarizar varios y nuevos protocolos que maximicen la respuesta superovulatoria y posibiliten la producción de un mayor número de embriones competentes en tanto en ganado bovino de carne como de leche (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022).

1.9. SELECCIÓN EMBRIONARIA

Las mejoras en las tecnologías de producción de embriones bovinos aún presentan dificultades, por tanto, la selección embrionaria aún es subjetiva e ineficiente (P. Lonergan & Fair, 2008). Las deficiencias en la selección se reflejan en tasas de gestación más bajas las obtenidas con embriones *PIV* que las *IVV* (Pontes et al., 2009).

El éxito del uso de embriones bovino producidos por TRA, depende del número de crías nacidas vivas, y está directamente relacionada con la selección de embriones (Mellisho et al., 2017; Wrenzycki, 2018). La calidad de un embrión define su competencia y su potencial de desarrollo a término una vez transferido a receptoras finales que depende de factores biológicos intrínsecos y extrínsecos (Maillo et al., 2016). En consecuencia, depende de la capacidad de seleccionar embriones más competentes y una mejor sincronía embrión - receptoras.

1.10. MORFOLOGÍA Y CINÉTICA EMBRIONARIA

El progreso de las TRA ha cobrado mayor importancia en la selección de embriones clasificados como competentes o viables. La evaluación de la morfología es una buena herramienta de pronóstico (Anagnostopoulou et al., 2022). La morfología y la proporción de embriones en la etapa de mórula y de blastocisto son criterios importantes para evaluar la competencia del desarrollo. Este sigue siendo el método de elección con un enfoque práctico y útil para seleccionar embriones viables antes de la transferencia en bovino (Pat Lonergan et al., 2016), se sigue aplicando actualmente de manera amplia y rutinaria con modificaciones menores en los sistemas de producción *In vitro* - IETS., 2010 (G. A. Bó & Mapletoft, 2013). La morfología es un método de evaluación visual no invasiva, simple, rápida y de bajo costo (Pontes et al., 2009; Anagnostopoulou et al., 2022). La morfocinética combina el valor de los parámetros morfológicos y cinéticos de los embriones (Velocidad de desarrollo). (Minasi et al., 2020).

En bovinos, la clasificación se la realiza de acuerdo con las características morfológicas recomendadas por la IETS para embriones *In vivo* extrapolándolas a los embriones *PIV*. La evaluación está basada en dos criterios: a) estados de desarrollo, y, b) calidad embrionaria (Tabla 3) (Stringfellow et al., 1998). La clasificación morfológica se le realiza al día 7 post-fecundación, evaluando estadios de mórula compacta y blastocistos. La calidad embrionaria se fundamenta en características subjetivas como: tamaño, forma, color, homogeneidad de citoplasma, forma e integridad de la zona pelúcida, tamaño, presencia de células y de vacuolas en el espacio perivitelino (G. A. Bó & Mapletoft, 2013). La calidad de los embriones

producidos *in vivo* clasificados por el método morfológico no afectó significativamente la tasa de preñez (59% en calidad 1 versus 45% en calidad 2) (Hasler et al., 1995, 2002). Sin embargo, el tamaño del blastocisto (>150µm) mostró mayor sobrevivencia a la crio-preservación 77 vs 54% (Andra´ et al., 1999).

Tabla 1. Criterios de clasificación morfológica de embriones bovinos para transferencia de embriones

Día	Estado de desarrollo
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto en eclosión
9	Blastocisto eclosionado y expandido
Grado	Calidad de embriones
1	Excelente o bueno
2	Bueno aceptable
3	Pobre
4	Muerto o degenerado

Fuente: (Stringfellow et al., 1998; Bó and Mapletoft, 2013).

Una mayor estandarización en los criterios de clasificación de embriones incrementaría la eficiencia de evaluación y la tasa de establecimiento de la gestación post transferencia (De Assín et al., 2009; De Los Santos et al., 2016).

CAPÍTULO II

2. DESCRIPCIÓN DE LA SITUACIÓN ACTUAL:

En general la actividad en la aplicación de tecnologías de Reproducción Asistida (TRA) en el bovino, a nivel mundial, se ha visto incrementada hasta finales del año 2010, para estabilizarse en los últimos 10 años, sin embargo, sigue creciendo ampliamente en el continente americano respecto al resto de continentes (Moore & Hasler, 2017). Cada año, la IETS (Sociedad internacional de Transferencia Embrionaria) publica los datos estadísticos sobre la actividad de TRA en el mundo (J. H. Viana, 2019). Durante el 2019 (último dato publicado por la IETS) se produjeron en el mundo (*in vivo*) más de un millón de embriones y de (*in vitro*) más del doble; fueron transferidos más de 900.000. El 45% de esta actividad corresponde a Sudamérica seguida por Norteamérica, por dos tercios de los embriones *in vitro* de todo el mundo), Asia y Europa (J. H. Viana, 2019). Sin embargo, el freno más importante para un mayor desarrollo de esta tecnología en campo ha sido la escasa mejora en la respuesta superestimuladora / superovulatoria de las donantes seleccionadas, la calidad embrionaria variable y la congelabilidad; ya que durante 30 años apenas se ha conseguido reducir, por un lado, la gran variabilidad en dicha respuesta superovulatoria y aumentar, por otro, la producción de embriones viables tras cada tratamiento (Moore & Hasler, 2017). Llegando a una producción global promedio de 4,5 embriones transferibles por recogida que no se ha podido mejorar (algo más en vacas de carne que en las de leche) (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014)(Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020). Esto se puede parcialmente explicar por la variabilidad que se observa en la respuesta del desarrollo folicular a los tratamientos hormonales estándares, principalmente por variaciones individuales en las poblaciones foliculares dependientes de gonadotrofinas al momento del inicio del tratamiento, por la dinámica folicular misma y su control, y por las características del tratamiento de estimulación hormona, entre otros (Mikkola et al., 2019). Aunque tampoco debemos olvidar que supone “nadar contracorriente” en un panorama mundial de continuo declive de la eficiencia reproductiva, en general, del ganado vacuno. Esta limitación tiene una repercusión directa sobre los costes y éstos sobre el nivel de implantación en las instituciones de educación superior y de transferencia tecnológica al campo, aunque hay otros factores más locales e incluso culturales y de nivel de profesionalización de las distintas zonas, o de nivel de implicación de las administraciones públicas gubernamentales a la hora de subvencionar iniciativas en este campo. Por tanto, es vital que las Instituciones de Educación Superior, los Centros de investigación regional y nacional, así como las carreras de Medicina Veterinaria y carreras afín al área pecuaria y de zootecnia generan una gran influencia sobre el

uso de estas tecnologías a nivel de investigación aplicada y básica; y su desarrollo permita la transferencia de tecnología y a la vinculación de los pequeños y medianos productores (granjas de bovinos de leche o carne).

2.1. IDENTIFICACIÓN, DESCRIPCIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA:

Pese a existir un avance vertiginoso en los últimos años en la aplicación de TRA (multiovulación y transferencia de embriones -MOET; producción de embriones *in vitro*-PIV; Ovum Pick Up (OPU) en el bovino, aún existen varios factores que afectan la respuesta superovularia, entre estos factores están aquellos intrínsecos asociados a la variabilidad individual de cada donante y extrínsecos asociados al origen de la hormona para superestimular. Varias investigaciones han descrito el uso y estandarización de protocolos para superovular. Sin embargo, aún es una limitante el uso de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de origen animal, presentando concentraciones hormonales variable entre lotes producidos (Mikkola et al., 2019) . Estos factores que generan esta variabilidad a día de hoy aún están vigentes en los protocolos convencionales de superestimulación, y consecuentemente el número de embriones viables para transferencia o congelamiento aun no llegan a superar en número de 4,5 / vaca-vacona / colecta (Erdem et al., 2020).

Además, otro punto importante que se asocia es la menor competencia embrionaria en fresco observada (clasificación morfológica) en embriones de FIV respecto a los de MOET y mayor o menor resistencia a la congelabilidad que se observa en los embriones producidos por MOET y por PIV respectivamente, esto nos obliga a un incursionar en un extenso campo de trabajo experimental en un futuro mediano para comprender y reducir este efecto negativo de la congelación en los embriones, y su incidencia en la preñez y mantención de la gestación.

2.2. JUSTIFICACIÓN.

En los años 70 se da inicio a las TRA a nivel comercial (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014). Los programas MOET para la producción de embriones han ido aumentando en función del nº de vacas de alta genética disponibles y de la demanda de los ganaderos. De forma paralela, actualmente se ha visto continua y creciente la importación de embriones de genética élite entre varios países incluido el Ecuador. En la última década, hubo gran desarrollo de las TRA como la FIV (Fecundación In Vitro) a partir de ovarios de matadero (en gran parte con fines de investigación) y comercialmente en países como Brasil, Argentina, Colombia, Uruguay a partir de vacas vivas, mediante aspiración transvaginal guiada por ecografía (Ovum Pick Up, OPU)

(De Roover et al., 2005) (Mikkola et al., 2019). Esto ha gatillado a que estas tecnologías participen en los programas de mejoramiento genético de bovinos, y que exista un interés científico creciente por mejorar la aplicación de estas herramientas tecnológicas. Sumado a estos eventos, los avances recientes de mayor repercusión los encontramos en materia de protocolos de superestimulación/superovulación; por una parte, por la consecución de preparados de FSH de origen animal y otras hormonas de mejor calidad, existiendo dos marcas PLUSET de laboratorios Calier y Folltropin de Vetoquinol (Braileanu et al., 1998) (Gabriel A. Bó et al., 2019). Sin embargo, el mayor avance ha llegado a través de un mayor conocimiento de la dinámica folicular, la instauración de protocolos de tratamiento que obvian el ciclo estral de las donantes, permitiendo una mejora en los resultados de anular el efecto adverso del folículo dominante, a la vez que ofrece la posibilidad de agrupar donantes y optimizar la planificación del trabajo de la granja y del equipo de Transferencia de Embriones (TE), lo cual redundará en una mejora significativa de los costes por embrión producido y permite aumentar el número de donantes recogidas por un mismo equipo en un periodo determinado. Así, durante los últimos años el control de la dinámica folicular ha mejorado considerablemente haciéndose muy cómoda y sencilla. Sin embargo, otro de los temas de investigación activa actualmente ha sido la producción de hormonas con tecnología recombinante las cuales estarían exentas de proteínas de origen animal (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020). En nuestra propuesta planteamos el uso de esta tecnología recombinante a través del uso de hormona folículo estimulante bovina recombinante (bscrFSH) que presenta un alto grado de purificación de 97% y 0% de hormona luteinizante (LH), lo cual nos da la posibilidad de diseñar varios experimentos y estandarizar nuevos protocolos que maximicen la respuesta superestimuladora/superovuladora y posibiliten la producción de un mayor nº de embriones competentes (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022).

Importante mencionar que la MOET, la PIV y la OPU son herramientas tecnológicas que se complementan entre sí. Las ventajas de estas técnicas, es que se podrían aplicar en hembras prepúberes, gestantes de 3 meses; es decir ofrecen la posibilidad de recuperar genética irremplazable de animales ya sacrificados o de aquellos en los que la técnica convencional no funciona (De Roover et al., 2005) (Baldassarre, 2021). También brinda la posibilidad de diagnóstico preimplantacional y la selección de los alelos deseados. Por tanto, el incremento en la producción de descendencia con respecto a 1 ternero/vaca/año de la IA, sería de 20-25 terneros/vaca/año con MOET y 80-100 terneros/vaca/año con OPU/IVP (G.A. Bó & Mapletoft, 2020). Estos argumentos explican el nivel de implantación de esta tecnología, diseño y

estandarización de nuevos protocolos, y la perspectiva de futuro que se vislumbra es un incremento en el número y en la calidad de los embriones producidos MOET, PIV y la mejora en los porcentajes de viabilidad post descongelamiento. Finalmente, la promesa científica de estas tecnologías es su capacidad de complementariedad MOET-PIV, y llegar a tener tanta influencia en la academia, investigación básica y aplicada, y en la industria de la cría animal como lo ha tenido la propia inseminación artificial (IA) en ganado de leche y de carne: selección genética, cruzamientos y mejora de la fertilidad en los hatos de ganado bovino (John F. Hasler, 2014).

2.3. HIPÓTESIS

Hemos planteado la siguiente hipótesis: Mediante la utilización de hormona folículo estimulante bovina de cadena simple (FSH-rhc) aplicada en un protocolo de dosis reducida en vacas holstein friesian (*Bos Taurus*) se obtiene una mayor respuesta superovulatoria y mayor producción de embriones viables respecto a un protocolo a dosis normal de FSH-rhc.

El trabajo experimental compromete dos preguntas biológicas y dos experimentos, que se realizarán a) en el laboratorio de reproducción animal y en el proyecto bovino de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

2.3.1. El experimento 1 comprende:

Producción de embriones *in vivo* (protocolo FSH-rhc a dosis normal = grupo control).

Para la obtención de los embriones *in vivo* se realizará el procedimiento de superestimulación / superovulación (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022), inseminación y colecta de embriones descrito por (Gabriel A. Bó et al., 2010), con algunas modificaciones en los tiempos de inseminación de las donadoras y de colecta de embriones (día 13,15 y 17). Los procedimientos con estos animales fueron ejecutados previa aprobación del comité de ética de la UTC. Inicialmente se realizó un control ginecológico para determinar el estatus ovárico y uterino y de ser necesario aplicar algún tratamiento farmacológico correctivo (Phillips & Jahnke, 2016).

2.3.2. El experimento 2 comprende:

En Producción de embriones *in vivo* (protocolo FSH-rhc a dosis reducida = grupo tratamiento). Para la obtención de los embriones *in vivo* se realizará el procedimiento de superestimulación / superovulación (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022), inseminación y colecta de embriones descrito por (Gabriel A. Bó et al., 2010), con algunas modificaciones en los tiempos de inseminación de las donadoras y de colecta de embriones (día 13, 15 y 17). Los procedimientos con estos animales fueron ejecutados previa aprobación del comité de ética de la UTC. Inicialmente se realizó un control ginecológico para determinar el estatus ovárico y uterino y de ser necesario aplicar algún tratamiento farmacológico correctivo (Phillips & Jahnke, 2016).

2.4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la aplicación de FSH recombinante bovina de cadena simple (FSH-rhc) en protocolos de superestimulación ovárica sobre la producción de embriones *in vivo* en ganado *Bos taurus*.

2.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar la respuesta superovulatoria (dimensión de ováricos) en vacas donantes de embriones tratadas con 2 y con 4 aplicaciones de FSH recombinante.
- b) Evaluar las estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) en vacas donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH recombinante
- c) Comparar la calidad y cantidad de embriones obtenidos de vacas donantes tratadas con 2 y 4 aplicaciones de FSH recombinante
- d) Analizar los niveles de concentración de hormonas como el estradiol, LH, FSH y progesterona en vacas donantes de embriones tratadas con 2 y 4 aplicaciones de FSH recombinante

CAPÍTULO III

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DECLARACIÓN DE ÉTICA

El autor declara que el presente estudio se realizó de acuerdo con el siguiente Código de Ética para experimentos con animales, tal como se refleja en las pautas ARRIVE disponibles en <http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist>. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para el uso de animales de experimentación de la Universidad Técnica de Cotopaxi-Campus Salache.

3.2. REACTIVOS Y MEDIOS

Todos los reactivos, medios, insumos, materiales utilizados en este estudio, a menos que se indique lo contrario, fueron de calidad analítica y se adquirieron en Agtech.inc. Advancing Animal Health and Reproduction (EE. UU).

Tabla 2. Insumos para la superovulación de Donantes de embriones bovinos en la raza Holstein Friesian

Actividades Donantes	Insumos para producción de embriones in vivo - SOV Donantes
Sincronización	CIDR 1,38 gr
	Benzoato de estradiol 2mg/ml
	Progesterona 25 mg/ml
Superovulación	FSH-rch recombinante bovina
	Prostaglandina (cloprostenol 250 ug/ml)
	GnRH (acetato de buserelina 0,0042 mg/ml)
	Parches detección de celo
	Jeringas 10 ml émbolo caucho-Nipro
	Jeringas 5 ml émbolo caucho-Nipro
	Jeringas 3 ml émbolo caucho-Nipro
Inseminación Donantes	GnRH (acetato de buserelina 0,0042 mg/ml)
	pajillas material seminal- ABS
	Catéteres Inseminación Artificial- IMV
	Camisa sanitaria - IMV
	Pistola Inseminación Artificial - IMV
	Jeringas 5 ml émbolo plástico- Nipro
	Agujas 18x1y medio-Nipro
	agujas 21x1y medio-Nipro
Colecta / embriones	PBS ABT 360

	Mangueras yuccion y- Agtech
	sonda tipo foley 18 FR ,30 cc- Minitube
	Filtro zona embryos - Agtech
	Botella graduada 500 ml
	Jeringa artire 20ml - émbolo plástico
	Lidocaina 2 %
	Jeringa 20 ml ,Thermo Scientific™ Jeringas de plástico desechables National Target
	dilatador metálico
	Soporte universal
Manipulación embriones laboratorio	Medio Holding ABT 360 (7 ml)
	Jeringa 3 ml,Thermo Scientific™ Jeringas de plástico desechables National Target
	Jeringa 5 ml,Thermo Scientific™ Jeringas de plástico desechables National Target
	Aguja 22 x 1 1/2
	Placa petri plastico 100mm,Thermo Scientific™
	Placapetri 60 mm,Thermo Scientific™
	Placa petri 35 mm,Thermo Scientific™
	placa boum 2 pocillos cóncava,Thermo Scientific™
	placa boum 4 pocillos cóncava,Thermo Scientific™
	jeringa 5ml artire, Thermo Scientific™ Jeringas de plástico desechables National Target
	jeringa 10 ml artire, Thermo Scientific™ Jeringas de plástico desechables National Target
	Estereomicroscopios NIKON
Desinfectantes	Alcohol 70% uso médico
Muestras sanguíneas	Tubos vacutainer 10 ml tapa roja con acelerante de coagulación
Ginecología	Mangas ginecología bovino (una caja de 100)
	Guantes de nitrilo
	Gel Ecografico
	Ecógrafo veterinario Aloka SSD 500
Análisis de Muestras hormonales	Elisa

Fuente: Elaboración propia

3.3. UNIDADES EXPERIMENTALES: SEMOVIENTES

Para el desarrollo del estudio se seleccionaron 14 animales de la especie bovina, de la raza Holstein Friesian, clínicamente sanas y reproductivamente normales y ciclicidad regulada. Las unidades experimentales fueron divididas en 2 grupos experimentales: a) grupo control, animales que recibieron un protocolo FSH-rhc dosis normal y b) grupo tratamiento, animales que recibieron un protocolo FSH-rhc dosis reducida.

3.4. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Carrera de Medicina Veterinaria, Sección Proyecto Bovino, Universidad de Técnica de Cotopaxi – Campus Salache (Cotopaxi, Ecuador), zona sur ubicado en el Cantón Latacunga, parroquia Eloy Alfaro, Salache Bajo; tiene una altitud de 2757.591 msnm y sus coordenadas geográficas son: latitud 00 59' 47.68" N, longitud 78 37' 19.16" E.. Esta región tiene temperaturas anuales que fluctúan entre 8 °C y 20°C, con valores máximos en el mes más cálido (diciembre) de 22 °C y un mínimo promedio en el mes más frío (julio) entre 5 °C. La precipitación anual es de 1946 mm. y la altitud promedio es de 2860 msnm. El estudio se realizó entre julio de 2021 y julio de 2023.

Síntesis y composición de la hormona FSH bovina recombinante monocatenaria (bscrFSH)

La hormona folículo estimulante recombinante bovina (FSH-rhc) es una variante biológicamente mejor de la FSH bovina. Es una variante de secuencia del gen de la FSH bovina recombinante monocatenaria (bscrFSH) considerando las subunidades alfa y beta de *Bos taurus* unidas a través de un péptido espaciador flexible con dos sitios potenciales de N-glicosilación. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, FSH-rhc es una glicoproteína de 51 a 57 kDa. La hormona FSH-rhc fue purificada mediante cromatografía de afinidad, lo que garantiza un nivel de pureza superior al 97% (ausencia total de hormona LH), asegurando alta actividad, potencia, homogeneidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos entre lotes. Posee una vida media circulante superior a 48 h). El prototipo actual de FSH-rhc se presenta en una caja que contiene dos viales. Uno de ellos contiene 0,3 mg de bscrFSH liofilizado, equivalente a 300 µg en total, mientras que el segundo contiene 20 mL de solución de reconstitución. El vehículo contiene una solución acuosa estabilizante y bacteriostática que contiene sacarosa, citrato de sodio dihidrato, m-cresol, DL-metionina, polisorbato 20 y agua purificada qsc que estabilizan la hormona y mantienen su actividad durante al menos un mes después de la reconstitución. La molécula FSH-rhc ha sido protegida mediante solicitud de

patente con número de prioridad CL 20181347 y el número de solicitud en Europa es EP19733942.7. (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022)

3.5. GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN (SOV)

En el presente estudio se incluyeron un total de 14 vacas multíparas de la raza Holstein friesian sanas (*Bos taurus taurus*), (día ~90 después del parto, peso corporal: 650 ± 50 kg; edad $6 \pm 0,5$ años, puntuación de condición corporal: $3,5 \pm 0,5$). Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales, nutricionales (agua, sal mineralizada y pastoreo ad libitum) y de manejo. Los individuos (vacas) fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: grupo control (FSH-rcs dosis normal): hormona folículo estimulante recombinante bovina; $n = 7$) y grupo de tratamiento (bscrFSH-rcs dosis reducida: hormona folículo estimulante recombinante bovina; $n = 7$). En cuanto al grupo control de superestimulación FSH-rcs dosis normal, se aplicó un protocolo convencional (una dosis diaria en cantidades decrecientes cada día durante 4 días) y, en cuanto al grupo de FSH-rcs dosis reducida, se aplicó un protocolo convencional con una modificación en el intervalo de aplicación entre dosis (2 inyecciones únicas a intervalo de 48 h entre inyecciones/dosis decreciente). En ambos grupos, las dosis totales se calcularon según la dosis total recomendada para ganado lechero (100%): esta fue entre 60 % de la dosis total en la primera inyección; y en la segunda inyección el restante 40%, de la dosis total (dosis total 240 ug) (Looney et al., 1988). Para la producción de embriones in vivo, el procedimiento convencional de superovulación, la inseminación y los métodos de recolección de embriones descritos por (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022) se realizaron para el grupo de control (FSH-rcs normal) y la frecuencia de aplicación de FSH-rcs dosis reducida se modificó para el grupo de tratamiento. Los tratamientos en los grupos control y tratamiento (protocolos de superovulación FSH-rcs normal y reducida) comenzaron a las 08:00 am independientemente de la fase folicular o lútea. En el protocolo del grupo control (FSH- rcs dosis normal), el día 0 se consideró como el momento de la aplicación del dispositivo intravaginal liberador de progesterona P4 intravaginal (CIDR-1,38 gr) + 2 mg de benzoato de estradiol intramuscular (im) BE2 + 100 mg de progesterona P4 intramuscular (im) (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020) (Deguettes et al., 2020). El día 4 después de la aplicación de CIDR, se inició el protocolo de superestimulación mediante la aplicación FSH-rcs. El grupo control recibió 240 mg de FSH-rcs (Cebitropin -B; CBB

Animal Health, Concepción, Chile) divididos en cuatro dosis decrecientes, con una aplicaciones por día en un horario am a intervalos de 24 h durante cuatro días (90, 70, 30, 20 μg im). El día 6 del protocolo se administraron dos dosis de PGF2 α alfa am/pm (500 μg de D-cloprostenol im) respectivamente y adicionalmente se retiró el dispositivo intravaginal el día 7, dando, al mismo tiempo, la cuarta aplicación de FSH-rcs (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). El día 8 del protocolo (am) las donantes presentaron estro, y 12 h después (pm) se realizó la primera inseminación junto con la administración de 0,008 mg de acetato de buserelina (GnRH im). La segunda inseminación se realizó 48 h después del estro (día 9 del protocolo) (Gabriel A. Bó et al., 2006). Los embriones se recolectaron 5, 7 y 9 días después del inicio del estro (día 13,15 y 17 del protocolo), mediante lavado uterino transrectal (sistema cerrado) (Gabriel A. Bó et al., 2010).

En el protocolo del grupo tratamiento (FSH-rcs dosis reducida), el día 0 se consideró como el momento de la aplicación del dispositivo intravaginal de liberación de progesterona P4 intravaginal (CIDR-1,38 gr) + 2,5 mg de benzoato de estradiol intramuscular (im) BE2 + 100 mg de progesterona P4 intramuscular (im) (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2020) (Deguettes et al., 2020). El día 4 después de la aplicación de CIDR, el protocolo de sobreestimulación comenzó con la aplicación de FSH-rcs. El grupo de tratamiento recibió 240 μg de bscrFSH (Cebitropin -B; CBB Animal Health, Concepción, Chile) divididos en dos dosis decrecientes, distribuidas en una sola aplicación al día por la mañana, programadas para cuatro días (55, 50, 40 y 25). μg im). El día 6 del protocolo paralelo a la tercera aplicación de FSH-rcs, se administraron dos dosis de PGF2 α alfa am/pm respectivamente (500 μg de D-cloprostenol im cada una). El dispositivo intravaginal se retiró simultáneamente con la cuarta aplicación de bscrFSH. El día 8 del protocolo am las donantes manifestaron estro, y 12 h. Posteriormente (pm) se realizó la primera inseminación junto con la administración de 0,008 mg de acetato de buserelina (GnRH; im). La segunda inseminación se realizó a las 24 h. después del estro (día 9 del protocolo am) (Gabriel A. Bó et al., 2006). Los embriones se recolectaron el día 5,7 y 9 después del inicio del estro (día 13,15 y 17 del protocolo), mediante lavado uterino transrectal (sistema cerrado) (Gabriel A. Bó et al., 2010).

3.6. EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA

Se realizó una evaluación reproductiva antes de iniciar los protocolos de superestimulación mediante ultrasonografía transrectal (AloKa SSD500; sonda con traductor lineal de 5 MHz, Japón) para verificar el estado reproductivo como la ciclicidad ovárica (presencia o ausencia de folículo preovulatorio y de cuerpo lúteo) y el estado uterino normal o patológico. Los animales fueron clasificados según el número de folículos (rango de 3 a 7 mm) o por la

presencia de un folículo dominante o cuerpo lúteo. En varios animales se aplicó un tratamiento farmacológico correctivo para estimular la ciclicidad en los donantes (progesterona P4, gonadotropinas GnRH, prostaglandina PGF2 α) (Phillips & Jahnke, 2016). Se realizó una evaluación cronológica de los ovarios de los donantes de los grupos control y tratamiento mediante ecografía el día 0, 4,8 del protocolo superovulatorio y el día de la recolección de embriones (día 13,15 y 17 del protocolo). En cada individuo se determinó el diámetro de los ovarios (izquierdo y derecho), diámetro y número de folículos y cuerpos lúteos (Día 0: aplicación del dispositivo CIDR; Día 4: primera aplicación de FSH; Día 8: estro y Día 13, 15 y 17: recolección de embriones).

3.7. MUESTREO DE SANGRE Y ANÁLISIS HORMONALES.

Se recolectaron muestras de sangre de las vacas donantes del grupo control y de tratamiento durante el protocolo de superovulación para la determinación de la concentración de estrógenos, FSH, LH y progesterona el día 4 (aplicación de FSH-rhs dosis normal y reducida), el día 7 (proestro) el día 8 (estro) y el día 13, 15 y 17 (recolección de embriones). La cuantificación de la concentración plasmática hormonal se realizó en el Laboratorio Clínico San Francisco previamente validado para especies bovinas.

Para el análisis de los niveles hormonales plasmáticos se llevó a cabo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en sándwich para determinar la concentración hormonal de estradiol, FSH, LH y progesterona durante los días 0,4,8,13,15 y 17 del protocolo superovulatorio tanto en el grupo control como el tratamiento. Se recolectaron muestras de sangre de las vacas donantes del grupo control y de tratamiento antes, durante y después del protocolo de superovulación para la determinación de la concentración hormonal; Día 0 (aplicación de CIDR), Día 4 aplicación FSH-rhs, Día 8 (estro), Día 13,15 y 17 (recolección de embriones). Las concentraciones plasmáticas de estradiol, FSH, LH y progesterona se determinaron utilizando el protocolo ELISA acorde a las recomendaciones del fabricante, se agregaron 100 μ l de anticuerpo monoclonal de ratón anti-FSH, LH, estradiol y progesterona (10 μ g/ml) para la detección de hormonas de estradiol, FSH, LH y progesterona (incubación durante la noche a 4 °C). Las placas de ELISA se lavaron una vez usando solución salina tamponada con fosfato (PBS/Tween 0,05%). Luego, los pocillos se bloquearon añadiendo 300 μ L de leche desnatada (3%) en PBS durante 1 h. a 37°C. Después de esto, las placas se lavaron dos veces usando PBS/Tween al 0,05%. Luego, se agregaron 100 μ L/pocillo para la curva estándar de estradiol, FSH, LH y progesterona (312, 156, 78, 39, 19, 9,7, 4,9, 2,4, 1,2, 0,6 ng/mL en suero bovino) y las muestras se incubaron durante 2 h. a 37°C para ser analizado (duplicado). Seguidamente, las placas se lavaron tres veces usando PBS/Tween al

0,05%. Luego, se agregaron 100 µL de anticuerpo de suero de pollo anti-FSH, anti-LH, anti-estradiol, anti-Progesterona (1% en leche desnatada) en PBS/Tween 0,05% a una dilución de 1:40.000 (v/v) y luego se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de eso, las placas se lavaron cuatro veces usando PBS/Tween al 0,05%. Luego, se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-IgY (1% en leche desnatada) en PBS/Tween 0,05% a una dilución 1/20.000 (v/v) y luego se incubó durante 1 h a 37 °C. Una vez más, las placas se lavaron cuatro veces usando PBS/Tween al 0,05%. Finalmente, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de OPD (25 ml de tampón de sustrato + 10 mg de OPD + 10 µl de H₂O₂) y se incubaron en la oscuridad durante 10 min. La incubación se detuvo añadiendo 2,5 M H₂SO₄ (50 µl/pocillo). Las placas de ELISA se leyeron a una longitud de onda de 492 nm. El coeficiente de variación intraensayo para la cuantificación de estradiol fue de 0,82 a 1,66, FSH fue de 0,75 a 1,36, LH fue de 0,73 a 1,49% y para la progesterona fue de 0,76 a 3,75%.

9.- Evaluación de la respuesta superovulatoria

En primer lugar, se llevó a cabo la evaluación ovárica de la respuesta superovulatoria en relación al diámetro (longitud y ancho) de los ovarios derecho e izquierdo en los días 0, 4, 8, 13, 15 y 17 del protocolo de superovulación. Día 0 (aplicación de CIDR), Día 4 aplicación FSH-recs, Día 8 (estro), Día 13, 15 y 17 (recolección de embriones).

3.8. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE EMBRIONES

Se realizó la evaluación morfológica de todas las estructuras recolectadas por donante de control y tratamiento. Se realizó una clasificación de embriones viables, embriones no viables-degenerados y ovocitos no fertilizados (OVNIs). La selección de embriones viables permitió clasificarlos en mórulas y blastocistos de grado I y II. Los criterios para la clasificación morfológica de embriones se implementaron de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS) (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016), en base a dos criterios: (1) calidad (Grado I, II y III) y (2) etapa de desarrollo (mórula, blastocisto temprano y blastocisto).

3.8.1. Clasificación embrionaria

La selección de embriones In vivo se realizó al día 13,15 y 17 del grupo control y del tratamiento donde se seleccionaron embriones en el estadio de mórula y de blastocisto acorde a los siguientes criterios de evaluación.

ED: 1: 1 célula; 2: 2 a 16 células (blastómeras), 3: mórula temprana: 16 a 32 blastómeras; 4: mórula; 5: blastocisto temprano; 6: Blastocisto; 7: blastocisto expandido; 8: blastocisto protruyendo.

Mórula compacta: día 5-6, aprox. 32-64 blastómeras. Sus blastómeras están unidos y constituyen una masa compacta ocupa el 60-70% del espacio perivitelino. Blastocisto temprano: día 7 aproximado, 100-150 células, presencia inicial de células trofoectodérmicas y formación de una cavidad (blastocelo), ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Blastocisto: día 7-8, aprox. 150-200 células, hay diferenciación entre el trofoblasto (más oscura), que constituyen una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (o disco embrionario). Blastocisto expandido: día 7-8, 200 a 300 células, el diámetro aumenta considerable (1.2 a 1.5x), adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original y comienza su protrusión.

Blastocisto protruido: día 8,5-9, 300-500 células, eliminación de zona pelúcida, forma esférica con blastocelo bien definido. La zona se ha debilitado bajo la presión del crecimiento del blastocisto

CB: 1: Excelente (macizo bien definido, sin defectos visibles, las blastómeras son claramente visibles, de color y estructura esferoide uniforme y células trofoblásticas alargadas sin signos de degeneración en blastocelo, zona pelúcida lisa y espacio perivitelino bien definido); y 2: Buenos (presencia de pocas blastómeras desprendidas, el macizo posee una pequeña cantidad de detritus celulares y su forma puede ser ligeramente irregular; 3: Malos (zona pelúcida irregular, macizo disgregado, presencia de vacuolas en citoplasma y espacio perivitelino, blastómeras separadas, células trofoblásticas con signos de degeneración, blastocelo pignótico. (IETS) (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016)



Figura 1. Cronología del desarrollo embrionario. Morfología de diferentes estadios de desarrollo. Manual IETS, 2010 (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016)

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS® v.25 (SPSS Statistics para Windows, v. 25.0: IBM Corp., Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados obtenidos de las muestras se analizaron mediante la prueba t pareada, ANOVA unidireccional y como análisis post hoc la prueba de Tukey. Los resultados de estradiol, FSH, LH y progesterona se analizaron mediante medidas repetidas en el modelo general lineal previamente verificado para determinar la normalidad y la homogeneidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Para comparar las medias de los dos grupos, se llevó a cabo la prueba t de Student. Cuando no se obtuvo el prerrequisito de la prueba paramétrica se realizó la prueba U de Mann-Whitney. Finalmente, se aplicó la prueba de corrección post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$

Capítulo IV

4. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:
Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rhc recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rhc recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
	FSH-rqs Protocolos						
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCIDO	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCIDO	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCIDO	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCIDO	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rqs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rqs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rqs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV

5. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rqs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rqs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rqs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCIDO	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCIDO	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCIDO	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCIDO	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rqs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rqs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rce; Día 8= Celo Donadoras.
 Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.
 Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.
 Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV

6. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rce recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rce recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rce Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCIDO	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCIDO	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCIDO	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCIDO	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV

7. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCIDO	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCIDO	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCIDO	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV

8. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc

OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±,00C a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

9. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±,00C a	47,14±2,6 4Ca

OIL	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

10. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcts recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcts recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcts Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

11. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±,00C a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

12. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rct recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rct recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rct Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

13. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±,00C a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

14. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

15. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rce recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rce recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rce Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

Capítulo IV

16. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rct recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rct recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rct Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da

OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV

17. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:

Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCID O	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb

ODA	REDUCID O	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±,00C a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCID O	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCID O	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud;
OÍA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rhs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rhs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rhs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Capítulo IV
18. RESULTADOS

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación:
Respecto a la evaluación de la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian durante los protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-rcs recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Tabla 3. Diámetro ovárico (longitud /ancho) de vacas Holstein Friesian

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ODL	NORMAL	31,57±1,6 1Aa	30,85±1,7 9Aa	46,42±3,06 Ba	44,00±5,6 5Ba	76,00±0,00 Ca	56,57±4,0 1Da
	REDUCIDO	26,85±1,3 3Ab	27,00±1,2 9Ab	41,71±2,66 Bb	52,42±4,4 4Cb	52,00±2,42 Cb	55,00±0,5 0Da
ODA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	25,85±0,9 6Ab	35,57±2,05 Bc	32,85±3,2 3Bc	45,00±0,00 Cc	45,85±1,6 5Cb
	REDUCIDO	23,57±2,0 9Ab	22,57±1,4 6Ac	36,28±1,93 Bc	36,00±1,4 1Bd	33,71±1,32 BCd	32,00±0,0 0Cc
OIL	NORMAL	30,14±1,6 8Aa	29,43±1,4 4Aa	40,43±2,86 Ba	45,00±0,0 0Ca	45,00±0,00 a	47,14±2,6 4Ca
	REDUCIDO	29,14±2,1 4Aa	26,85±1,4 5Ab	34,28±1,78 Bb	60,00±1,4 1Cb	52,14±4,61 Db	48,00±0,0 0Da
OIA	NORMAL	24,28±1,5 5Ab	24,71±1,6 5Ab	32,57±2,17 Bb	40,57±0,2 0Cc	41,00±0,00 Cc	39,14±1,6 1Cb
	REDUCIDO	22,43±1,0 9Ab	22,43±1,1 9Ac	30,57±1,29 Bbc	47,71±2,0 2Ca	39,43±2,65 Dc	38,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia
(p<0,05)

ODL=ovario derecho longitud; ODA= ovario derecho ancho; OIL=Ovario Izquierdo longitud; OIA=Ovario izquierdo ancho.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la Tabla 3 se presenta la cronología de desarrollo ovárico en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina (FSH-rcs). Se observan diferencias estadísticas en la longitud y ancho del ovario derecho e izquierdo (ODL-ODA-OIL-OÍA) en el día 8 respecto al día 0 y 4 del protocolo en el grupo normal y reducido respectivamente; siendo mayor la longitud y ancho del ODL y ODA del día 8 respecto a los días 0 y 4 ($p < 0,05$). En los días 13,15 y 17 de la colecta de embriones el ODL normal presenta diferencias estadísticas entre los diferentes días, siendo mayor el ODL normal de día 15 respecto al día 13 y 17; en el ODL reducido se observa diferencias estadísticas entre el día 17 respecto al día 13 y 15, siendo mayor la longitud y ancho del ovario en el día 17 ($p < 0,05$). El ODA normal y reducido presenta diferencias estadísticas entre el día 13 respecto a los días 15 y 17, siendo menor el ancho del ovario en el día 13 (ODA normal) y mayor el ancho del ovario en el día 13 (ODA reducido) respecto a los días 15 y 17. El ODL y OIL normal no presentan diferencias estadísticas en la longitud y ancho entre los días 13,15 y 17 del protocolo. Sin embargo, el OIL y OÍA reducida presentan diferencias estadísticas en el día 13 respecto a los días 15 y 17; siendo mayor la longitud y ancho ovario en el día 13 del protocolo ($p < 0,05$). En relación al tratamiento de FSH-rcs normal y reducida y su efecto en la longitud y ancho de los ovarios derecho e izquierdo se observa en el día 0 diferencias estadísticas entre ODL normal, OIL normal y reducido respecto a ODL reducido, ODA normal -reducido, OIA normal – reducido, siendo mayor la longitud en los ovarios ODL - OIL normal y reducido ($p < 0,05$). En el día 4 se presentan diferencias estadísticas entre ODL y OIL normal respecto a ODL reducido, ODA normal y reducido, OIL reducido, OÍA normal y reducido, siendo mayor la longitud en los ovarios ODL y OIL normal ($p < 0,05$). En el día 8 se presentan diferencias estadísticas entre ODL y OIL normal respecto a ODL reducido, ODA normal y reducido, OIL reducido, OIA normal y reducido, siendo mayor la longitud en los ovarios ODL y OIL normal ($p < 0,05$). En el día 13 se presentan diferencias estadísticas entre ODL normal, OIL normal y OIA reducido respecto a ODL reducido, ODA normal y reducido, OIL reducido, OIA normal, siendo mayor la longitud en los ovarios ODL y OIL normal y mayor el ancho en los ovarios OIA reducido ($p < 0,05$). En el día 15 se presentan diferencias estadísticas entre ODL y OIL normal respecto a ODL reducido, ODA normal y reducido, OIL reducido, OIA normal y reducido, siendo mayor la longitud en los ovarios ODL y OIL normal ($p < 0,05$). En el día 17 se presentan diferencias estadísticas entre ODL y OIL normal y reducido respecto a ODA y OIA normal y reducido ($p < 0,05$).

Respecto a la evaluación de las estructuras ováricas en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH recombinante presentamos lo siguiente:

Tabla 4. Estructuras ováricas – número de folículos totales de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rqs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
NFTOTAL	NORMAL	12,29±1,1 9Aa	12,86±1,2 0Aa	14,43±1,19 Aa	6,43±0,2 0Ba	7,00±0,00 Ba	5,57±0,4 8Ca
	REDUCIDO	12,14±0,7 4Aa	12,43±0,7 5Aa	12,86±0,88 Aa	6,29±0,6 0Ba	5,14±0,63 Bb	4,00±0,0 0Cb

Fuente: Elaboración propia

($p < 0,05$)

NFTOTAL= número de folículos totales (ovario derecho e izquierdo)

Protocolo Normal= dosis total FSH-rqs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rqs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rqs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a, b, c y d indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la Tabla 4 se presenta el número de folículos totales en vacas holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. En el NFTOTAL normal y reducido se observan diferencias estadísticas en el número de folículos en el día 0, 4 y 8 respecto al día 13, 15 y 17, siendo mayor el número de folículos en el día 8 NFTOTAL normal y reducido. Se observa diferencias estadísticas en el día de la colecta número 15 y 17 respecto al número de folículos, siendo mayor el número de folículos en el día 15 NFTOTAL reducido ($p < 0,05$).

Tabla 5. Número de folículos del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTO	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
------------	-------------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

	FSH-rcs Protocolos						
NFOD	NORMAL	6,86±0,59 Aa	7,00±0,53 Aa	7,71±0,83 Aa	3,00±0,0 0Ba	4,00±0,0 0Ca	3,14±0,3 4Ba
	REDUCID O	6,71±0,64 Aa	6,29±0,36 Aa	7,14±0,74 Aa	2,71±0,8 1Ba	2,71±0,4 7Bb	3,00±0,0 0Ba
NFOI	NORMAL	5,43±0,72 Aa	5,86±0,74 Aa	6,71±0,52 Aa	3,43±0,2 0Ba	3,00±0,0 0Ba	2,43±0,3 0Ca
	REDUCID O	5,43±0,43 Aa	6,14±0,40 Aa	5,71±0,42 Aa	3,57±0,2 0Ba	2,43±0,2 0Cb	1,00±0,0 0Db

Fuente: Elaboración propia

($p > 0,05$)

NFOD= número de folículos ovario derecho; NFOI= número de folículos ovario Izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la tabla 5 se presenta el número de folículos del ovario derecho e izquierdo en vacas holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en el NFOD normal y reducido diferencias estadísticas en el número de folículos presentes en el día 0, 4 y 8 respecto al día 13, 15 y 17, siendo mayor el número de folículos en el día 8 de NFOI normal y reducido, y NFOI normal ($p < 0,05$). Se observa diferencias estadísticas en el día 15 respecto al número de folículos entre NFOD - NFOI normal respecto al reducido, y en el día 17 diferencias estadísticas entre NFOI reducido respecto NFOI normal y NFOD normal y reducido, siendo menor el número de folículos en NFOI reducido de día 17 y mayor en el día 15 de NFOD normal ($p < 0,05$).

Tabla 6. Número de cuerpos lúteos totales en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
NCL TOTAL	NORMAL	0,71±0,18 Aa	0,14±0,1 4Ba	0,00±0,0 0Ba	7,43±1,61 Ca	10,00±0,0 0Da	8,00±0,38 Ca

	REDUCID O	0,57±0,20 Aa	0,14±0,1 4Ba	0,00±0,0 0Ba	6,43±0,20 Ca	7,86±0,26 Db	8,00±0,00 Da
--	--------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Fuente: Elaboración propia

(p<0,05)

NCL TOTAL= número de cuerpos lúteos total.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la tabla 6 se presenta el número de cuerpos lúteos totales en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en el NCL TOTAL normal y reducido diferencias estadísticas en el número de cuerpos lúteos presentes en los días 0, 4,8,13,15 y 17, siendo mayor el número de CL en el día 15 NCL TOTAL normal y día 17 NCL TOTAL reducido (p<0,05). Se observa diferencias estadísticas en el día 15 respecto al número de cuerpos lúteos, siendo mayor el número de CL en el NCL TOTAL normal respecto el reducido; y en el día 17 igual número de cuerpos lúteos entre normal y reducido (p<0,05).

Tabla 7. Número de cuerpos lúteos del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
NCL OD	NORMAL	0,43±0,20A a	0,14±0,1 4Ba	0,00±0,00 Ca	3,57±1,21 Da	6,00±0,0 0Ea	4,14±0,3 4Fa
	REDUCIDO	0,14±0,14A b	0,14±0,1 4Aa	0,00±0,00 Aa	4,00±0,00 Ba	4,14±0,3 4Bb	4,00±0,0 0Ba
NCL OI	NORMAL	0,14±0,14A a	0,00±0,0 0Aa	0,00±0,00 Aa	3,86±0,40 Ba	4,00±0,0 0Ba	3,86±0,4 0Ba
	REDUCIDO	0,43±0,20A b	0,00±0,0 0Ba	0,00±0,00 Ba	2,43±0,20 Cb	3,71±0,3 6Da	4,00±0,0 0Da

Fuente: Elaboración propia

($p < 0,05$)

NCLOD= número de cuerpos lúteos ovario derecho; NCLOI= número de cuerpos lúteos ovario izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la tabla 7 se presenta el número de cuerpos lúteos del ovario derecho e izquierdo en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH-recombinante bovina.

Se observa en el NCLOD normal diferencias estadísticas en el día 0, 4, 8, 13, 15 y 17, siendo mayor el número de CL en el NCLOD de día 15. Se observan diferencias estadísticas en el NCLOD reducido y NCLOI normal de día 0, 4 y 8 respecto al NCLOD reducido y NCLOI normal de día 13, 15 y 17, siendo mayor el número de CL en día 15 ($p < 0,05$). El NCLOI reducido en el día 0 presenta diferencias estadísticas respecto el día 4, 8, 13, 15 y 17, siendo mayor el número de CL en el día 17 ($p < 0,05$).

Se observa diferencias estadísticas en el día 0 respecto al NCLOD – NCLOI normal respecto al reducido ($p < 0,05$). En el día 13 se observa diferencias estadísticas de NCLOI reducido respecto a NCLOD normal – reducido y NCLOI normal, siendo mayor el número de CL de día 15 NCLOD normal ($p < 0,05$).

Tabla 8. Diámetro folicular del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTO Fsh-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
DFOD	NORMAL	3,82±0,34 Aa	3,00±0,13 Ba	10,42±0,3 1Ca	11,79±0,5 0Da	15,57±0,0 0Ea	13,16±0,4 7Fa
	REDUCIDO	4,30±0,25 Aa	2,59±0,04 Bb	10,55±0,3 7Ca	12,15±0,4 0Da	14,15±0,4 0Eb	10,80±0,0 0Cb
DFOI	NORMAL	4,62±1,10 Aa	2,91±0,07 Ba	10,90±0,1 8Ca	12,28±0,2 0Da	14,46±0,0 0Ea	12,49±0,4 3Da
	REDUCIDO	3,62±0,21 Ab	2,64±0,11 Bb	11,08±0,4 3Ca	12,75±0,3 0Da	13,47±0,5 2Db	10,90±0,0 0Cb

--	--	--	--	--	--	--	--

Fuente: Elaboración propia

($p < 0,5$)

DFOD= diámetro folículo ovario derecho; DFOI= diámetro folículo ovario izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de Embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la tabla 8 se presenta el diámetro folicular del ovario derecho e izquierdo en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en el DFOD y DFOI normal y reducido respectivamente diferencias estadísticas entre los días 0,4,8,13 ,15 y 17, siendo mayor el diámetro folicular en el día 15 ($p < 0,05$). El DFOI presenta diferencias estadísticas respecto a DFOD normal y reducido y DFOI normal ($p < 0,05$). En el día 4, 15 y 17 se observa diferencias estadísticas entre DFOD y DFOI normal respecto DFOD y DFOI reducido, encontrando mayor diámetro folicular en el DFOD y DFOI normal respecto el reducido ($p < 0,05$).

Tabla 9. Diámetro del cuerpo lúteo del ovario derecho e izquierdo de vacas Holstein Friesian durante protocolos de superovulación y colecta de embriones mediante el uso de FSH-recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTOS FSH-rcs Protocolos	DIA 0	DIA 4	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
DCLOD	NORMAL	3,13±2,44 Aa	2,22±2,22 Aa	0,00±0,00 Ba	14,44±0,0 6Ca	15,73±0,0 0Da	17,97±0,30Ea
	REDUCIDO	2,51±2,51 Aa	0,30±0,30 Bb	0,00±0,00 Ba	13,88±0,2 2Cb	15,51±,06 Da	17,15±0,00Eb
DCLOI	NORMAL	2,51±2,51 Aa	0,00±0,00 Ba	0,00±0,00 Ba	13,88±0,2 4Ca	14,55±0,0 0Da	17,87±0,16Ea
	REDUCIDO	7,87±3,75 Ab	0,00±0,00 Ba	0,00±0,00 Ba	14,28±0,3 3Ca	15,77±0,0 7Db	17,55±0,00Ea

Fuente: Elaboración propia

($p < 0,05$)

DCLOD= diámetro cuerpo lúteo ovario derecho; DCLOI= diámetro cuerpo lúteo ovario izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8,13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la tabla 9. Se presenta del cuerpo lúteo del ovario derecho e izquierdo en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en el DCLOD y DCLOI normal y reducido respectivamente diferencias estadísticas entre los días 0, 4, 8,13 ,15 y 17, siendo mayor el diámetro del CL en el día 17 ($p < 0,05$). El diámetro del CI presenta diferencias estadísticas entre el DFOD normal y reducido en el día 4, 13, 17; y en el DCLOI normal y reducido en el día 0 y 15 ($p < 0,05$).

Respecto a la comparación de la calidad y cantidad de embriones obtenidos de donantes tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSh-rcs recombinante presentamos lo siguiente:

Tabla 10. Estructuras colectadas de vacas donantes Holstein Friesian superovuladas durante la colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

PARÁMETROS	TRATAMIENTOS FSH-rcs Protocolos	DIA 13	DIA 15	DIA 17
NCL	NORMAL	7,43±1,61Aa	10,00±0,50Ba	8,00±0,38Aa
	REDUCIDO	6,86±0,34Aa	7,86±0,34Bb	8,00±0,50Ba
NOFL	NORMAL	6,43±0,20Aa	7,00±0,50Aa	5,57±0,48Ba
	REDUCIDO	5,29±0,78Ab	6,14±0,34Ab	4,00±0,35Bb
EstructT	NORMAL	7,00±1,41Aa	8,00±0,50Ba	7,00±0,38Aa
	REDUCIDO	6,43±0,53Aa	7,43±0,53Aa	7,00±0,50Aa

EmbTrasf	NORMAL	4,71±0,81Aa	6,00±0,50Ba	5,71±0,36Aa
	REDUCIDO	5,57±0,37Aa	5,29±0,18Ab	5,00±0,25Ab
EmbDeg	NORMAL	1,43±0,20Aa	2,00±0,25Ba	1,14±0,14Aa
	REDUCIDO	0,57±0,20Ab	1,86±0,34Ba	1,00±0,25Aa
UFOs	NORMAL	0,86±0,40Aa	0,00±0,00Ba	0,43±0,20Aa
	REDUCIDO	0,29±0,18Ab	0,29±0,18Ab	1,00±0,20Bb

Fuente: Elaboración propia

($p < 0,05$)

DFOD= diámetro folículo ovario derecho; DFOI= diámetro folículo ovario izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rhc a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rhc a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rhc; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

En la Tabla 10. Se presenta el número de estructuras totales colectadas, así como el número de folículos no ovulatorios y de cuerpos lúteos en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina.

Se observa en el NCL normal diferencias estadísticas en el día 15 respecto al día 13 y 17 respectivamente, siendo mayor el número de CL en el día 15 ($p < 0,05$). En NCL reducido se observa diferencias estadísticas en el día 15 y día 17 respecto al día 13, siendo mayor el número de cuerpos lúteos en el día 17 ($p < 0,05$). Entre el NCL normal y reducido se observa diferencias estadísticas en el día 15, presentando mayor número de CL que el NCL normal ($p < 0,05$).

Se observa en el NOLF normal y reducido diferencias estadísticas en el día 17 respecto al día 13 y 15 respectivamente, siendo mayor el número de NOFL en el día 15 ($p < 0,05$). Respecto al NOFL se observa diferencias estadísticas entre el tratamiento normal y reducido en los días 13, 15 y 17, siendo el NOFL normal en el día 15 el que presenta mayor número de FL no ovulatorios ($p < 0,05$).

Se presenta el número de estructuras totales colectadas en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en las Estructuras Totales normal diferencias estadísticas en el día 15 respecto el día 13 y 17, siendo el día 15 el de mayor número de estructuras colectadas ($p < 0,05$). En las estructuras

totales reducido no se observan diferencias estadísticas entre los días 13,15 y 17, sin embargo, el día 15 presenta mayor número de estructuras totales colectadas ($p>0,05$). No existe diferencias estadísticas en las estructuras totales normal respecto al reducido en los diferentes días 13,15 y 17 de la colecta ($p>0,05$).

Se presenta el número de embriones Transferibles (viables) colectados en vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en los embriones transferibles normales diferencias estadísticas en el día 15 respecto el día 13 y 17, siendo el día 15 con el mayor número de embriones transferibles ($p<0,05$). En los embriones transferibles reducido no existe diferencias estadísticas entre los días 13,15, y 17, sin embargo, se observa un número mayor de embriones en el día 13 ($p>0,05$). Se observa diferencias estadísticas en los embriones transferibles normales respecto al reducido de día 15 y 17, siendo mayor el número de EmbTransf normal en día 15 ($p<0,05$).

Se presenta el número de Embriones Degenerados (EmbDeg) colectados en vacas holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en los EmbDeg normal y reducido diferencias estadísticas en el día 15 respecto el día 13 y 17, siendo el día 15 con el mayor número de EmbDeg ($p<0,05$). Se observa diferencias estadísticas en los EmbDeg normales respecto al reducido de día 13, siendo mayor el número de EmbDeg en el normal ($p<0,05$).

Se presenta el número de Óvulos no fertilizados (UFOs) colectados en vacas holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa en los UFOs normal diferencias estadísticas en el día 15 respecto el día 13 y 17, y en el UFOS reducido diferencias estadísticas en el día 17 respecto el día 13 y 15 ($p<0,05$). Se observa diferencias estadísticas en los UFOs normales respecto al reducido del día 13, 15 y 17 siendo mayor el número de UFOs en el reducido en el día 17 ($p<0,05$).

Número de Cuerpos Lúteos del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

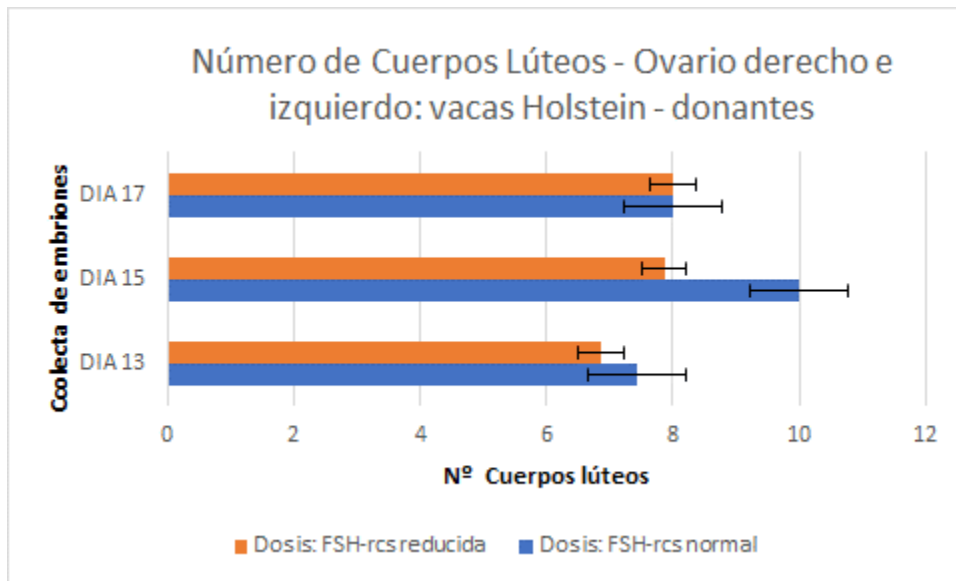


Figura 2. Número de Cuerpos Lúteos del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Número de Folículos Anovulatorios del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

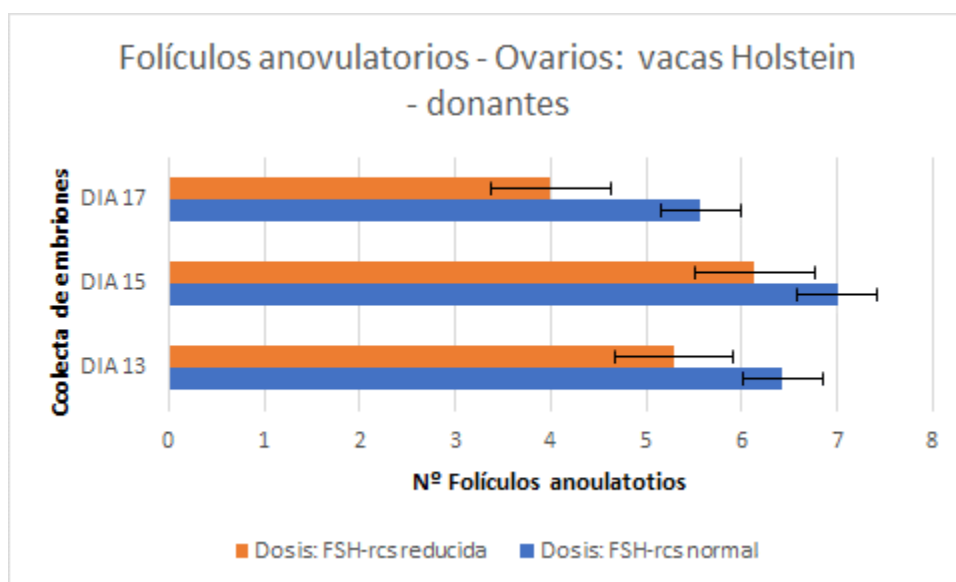


Figura 3. Número de Folículos Anovulatorios del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p < 0,05$).

Número de Estructuras Totales recuperadas del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

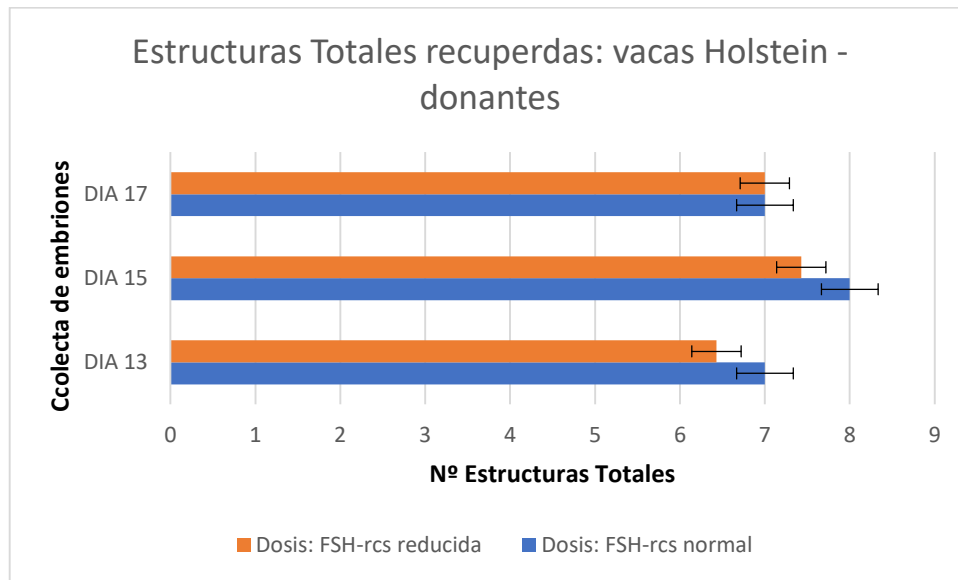


Figura 4. Número de Estructuras Totales recuperadas del ovario derecho de izquierdo en vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p > 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Número de Embriones Viables obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

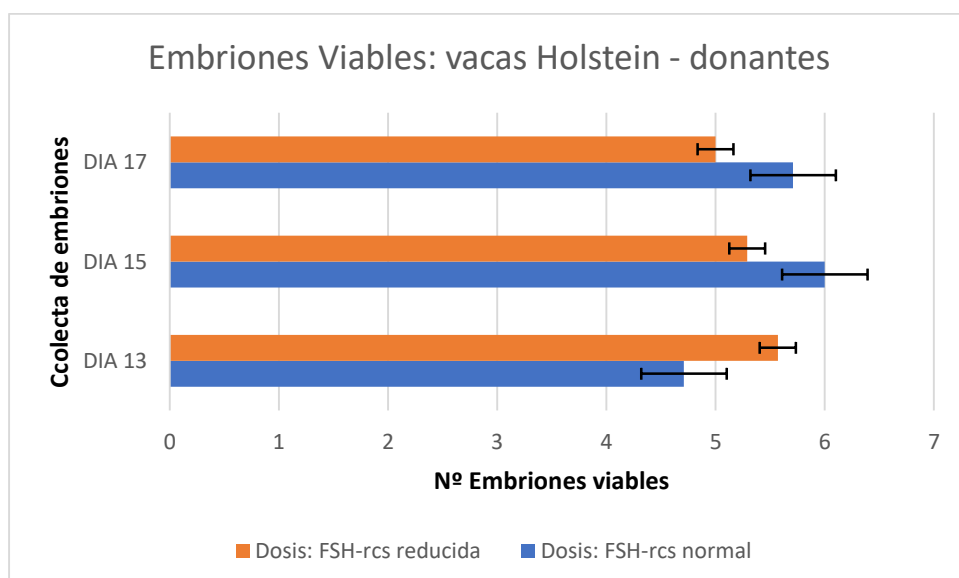


Figura 5. Número de Embriones Viables obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p < 0,05$).

Número de Embriones Degenerados obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

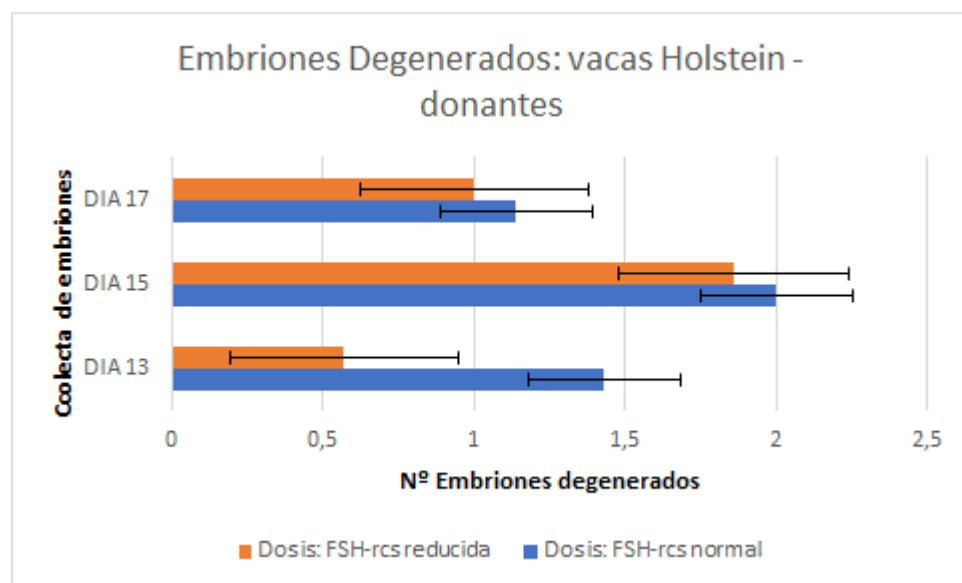


Figura 6. Número de Embriones Degenerados obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p < 0,05$).

Número Total de Óvulos no fecundados obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días de protocolos de colecta de embriones de día 13,15 y 17 mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

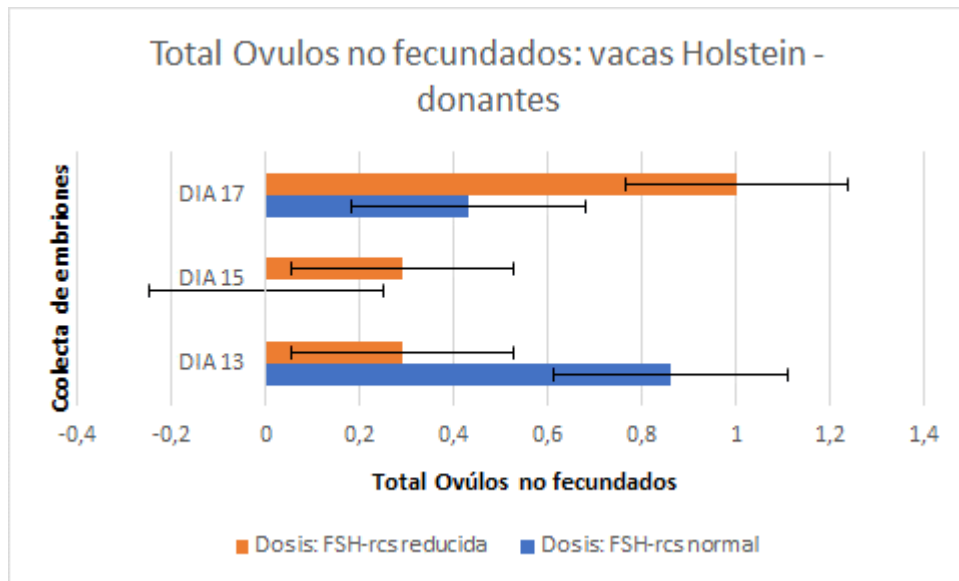


Figura 7. Número Total de Óvulos no fecundados obtenidos de vacas Holstein Friesian durante diferentes días del protocolo de superovulación ($p < 0,05$).

Respecto a la evaluación de los niveles hormonales plasmáticos en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH recombinante presentamos lo siguiente:

Tabla 11. Niveles de concentración hormonal de vacas donantes Holstein Friesian superovuladas durante el protocolo de superovulación y la colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis total en un protocolo normal - 4 aplicaciones y un protocolo reducido - 2 aplicaciones.

Fuente: Elaboración propia

PARÁMETROS	TRATAMIENTO FSH-rcs Protocolos	DIA 4	DIA 7	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 17
ESTRADIOL	NORMAL	75,04±3,88Aa	195,96±48,52Ba	440,42±97,12Ca	81,54±1,26ADa	79,98±2,50ADa	72,00±2,52Aa
	REDUCIDO	91,21±1,30Ab	166,55±35,37Ba	341,14±57,41Ca	84,05±4,27ADa	77,01±2,77ADa	84,12±2,50Deb
FSH	NORMAL	0,62±0,07Aa	0,35±0,04Ba	0,19±0,02Ca	0,17±0,01Da	0,10±0,00Ea	0,18±0,02Ca
	REDUCIDO	0,64±0,05Aa	0,25±0,03Bb	0,16±0,09Ca	0,14±0,01Db	0,15±0,01Eb	0,15±0,00Eb
LH	NORMAL	0,14±0,01Aa	0,21±0,05Ba	0,24±0,02BCa	0,18±0,022BDa	0,10±0,00Ea	0,14±0,01Aa
	REDUCIDO	0,17±0,01Ab	0,16±0,02Ab	0,26±0,02Ba	0,20±0,000Ca	0,18±0,02Cb	0,26±0,00Bb
PROGESTERONA	NORMAL	1,27±0,15Aa	1,08±0,10Aa	0,43±0,05Ba	7,17±0,49Ca	26,82±0,00Da	33,34±4,51Ea
	REDUCIDO	1,13±0,07Aa	1,30±0,06Aa	0,51±0,05Ba	7,01±0,07Ca	24,58±3,49Da	36,18±0,00Ea

(p<0,05)

DFOD= diámetro folículo ovario derecho; DFOI= diámetro folículo ovario izquierdo.

Protocolo Normal= dosis total FSH-rcs a 4 aplicaciones.

Protocolo Reducido= dosis total FSH-rcs a 2 aplicaciones.

Día 0= inicio del protocolo IATF; Día 4= aplicación FSH-rcs; Día 8= Celo Donadoras.

Día 13= colecta de Embriones; Día 15= colecta de embriones; Día 17= colecta de embriones.

Letras A, B, C y D indica diferencias entre los días 0, 4, 8, 13, 15 y, 17 dentro de cada grupo.

Letras a y b indica diferencias dentro de cada columna dentro del mismo día.

Niveles plasmáticos de estradiol en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

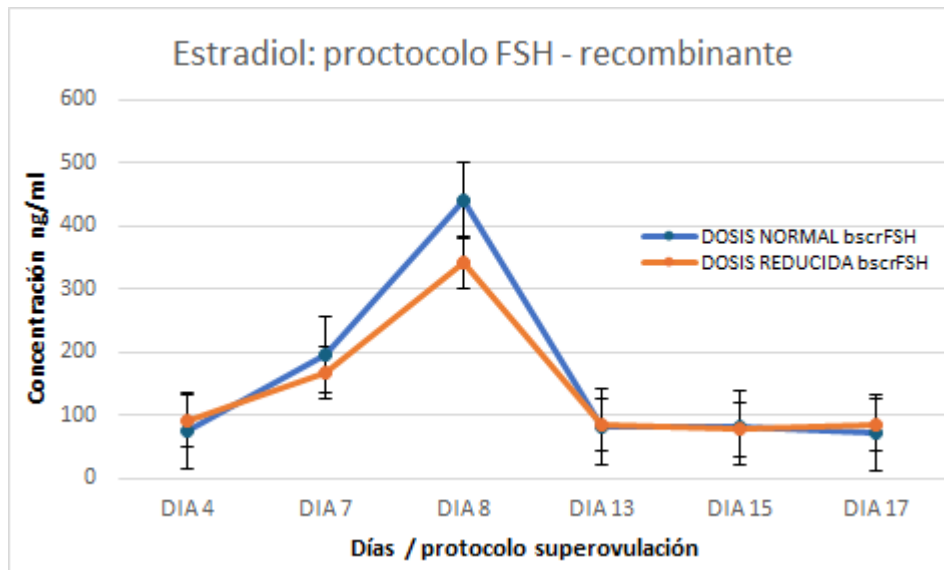


Figura 8. Niveles plasmáticos de estradiol en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH recombinante ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

En la figura 8. Se presentan los niveles hormonales plasmáticos de estradiol de vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa diferencias estadísticas en la concentración de estradiol en los días 7, 8, 13 y 15 respecto los días 4 y 17 del protocolo de FSH-rce normal y reducida respectivamente, siendo mayor la concentración de estradiol en el protocolo FSH-rce normal. y reducido en el día 8 ($p < 0,05$). La concentración de estradiol presenta diferencias estadísticas entre tratamientos FSH-rce normal y reducido en los días 4 y 17 ($p < 0,05$).

Niveles plasmáticos de hormona folículo estimulante (FSH) en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones).

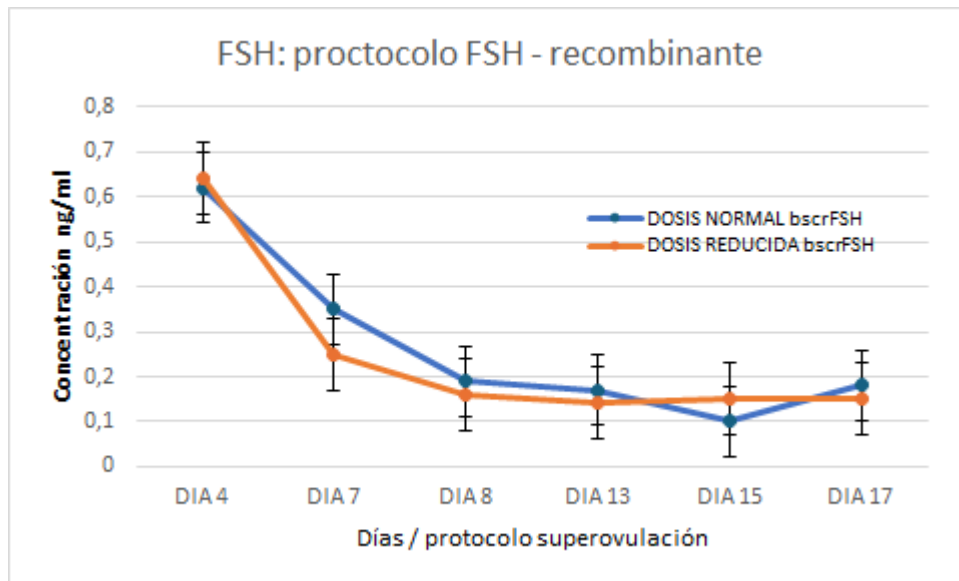


Figura 9. Niveles plasmáticos de hormona folículo estimulante (FSH) en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH recombinante ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

En la figura 9. Se presenta los niveles hormonales plasmáticos de FSH de vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa diferencias en la concentración de FSH en los días 4, 7, 8, 13,15 del protocolo de FSH-rcs normal y reducida respectivamente; siendo mayor la concentración de FSH en el protocolo FSH-rcs normal y reducida en el día 4; y diferencias estadísticas entre FSH normal respecto FSH reducida en el día 7, 13,15, y 17 ($p < 0,05$).

Niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH) en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones).

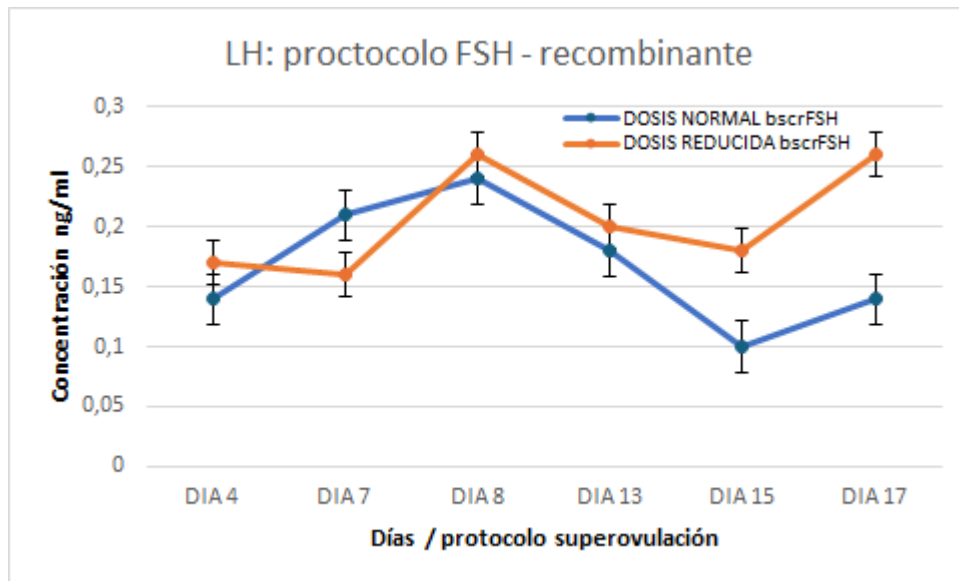


Figura 10. Niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH) en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH recombinante ($p < 0,05$).

En la figura 10. Se presentan los niveles hormonales plasmáticos de LH de vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH- recombinante bovina. Se observa diferencias estadísticas en la concentración de LH en los días 4, 7, 8, 13 y 15 del protocolo de FSH-rcc normal y del protocolo FSH-rcc reducida respectivamente; siendo mayor la concentración de LH en el protocolo FSH-rcc normal en el día 8 y en el protocolo FSH-rcc en el día 8 y 17 ($p < 0,05$). Se observan diferencias estadísticas entre los tratamientos FSH-rcc normal y reducido en los días 4, 15 y 17, con una mayor concentración de LH en el protocolo FSH-rcc reducida durante el día 8 respecto al protocolo FSH-rcc normal ($p < 0,05$). Niveles plasmáticos de progesterona en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH- recombinante con dosis reducida - 2 aplicaciones y normal - 4 aplicaciones.

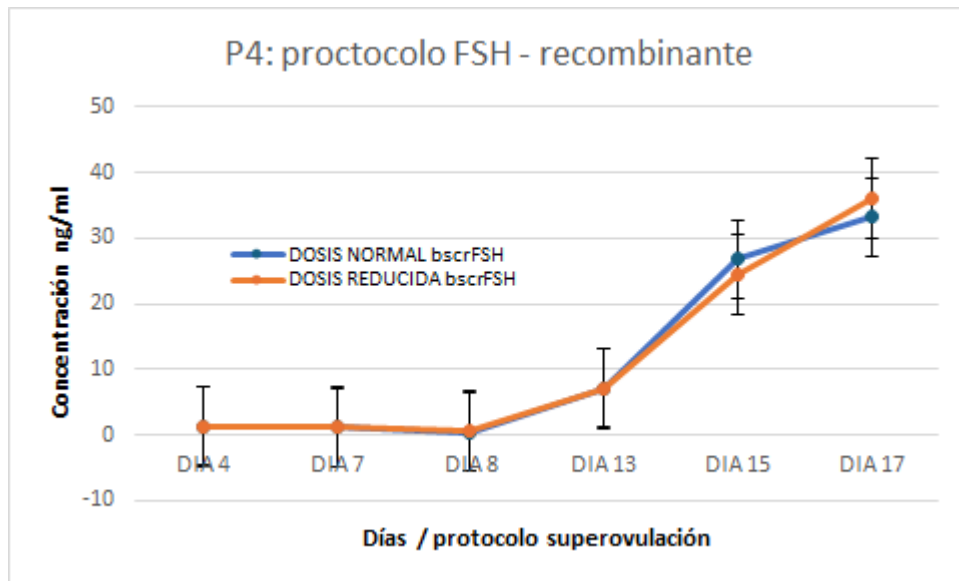


Figura 11. Niveles plasmáticos de progesterona en vacas Holstein Friesian durante protocolos de colecta de embriones mediante el uso de FSH recombinante ($p < 0,05$).
Fuente: Elaboración propia

En la figura 11. Se presentan los niveles hormonales plasmáticos de progesterona de vacas Holstein Friesian sometidas a 2 diferentes protocolos de superovulación utilizando FSH-recombinante bovina. No se observa diferencias en la concentración de progesterona en los días 4, y 7 del protocolo de FSH-rs normal y FSH-rs reducida, sin embargo, se observa diferencias estadísticas en los días 8,13,15 y 17 y una mayor concentración de progesterona en los días 13, 15 y 17, siendo mayor en el día 17 ($p < 0,05$). No se observan diferencias estadísticas en la concentración de progesterona entre los tratamientos FSH-rs normal y reducido durante los días del protocolo ($p > 0,05$).

CAPÍTULO V

19. DISCUSIÓN

Pese a existir un avance vertiginoso en los últimos años en la aplicación de TRA (multiovulación y transferencia de embriones -MOET) en el bovino; aún existen varios factores que afectan la respuesta superovularia, entre estos factores están aquellos intrínsecos asociados a la variabilidad individual de cada donante y extrínsecos asociados al origen de la hormona para superestimular. Varias investigaciones han descrito el uso y estandarización de protocolos para superovular. Sin embargo, aún es una limitante el uso de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de origen animal, presentando concentraciones hormonales con variabilidad entre lotes producidos (Mikkola et al., 2019). Estos factores que generan esta variabilidad a día de hoy aún están vigentes en los protocolos convencionales de superestimulación, y consecuentemente el número de embriones viables para transferencia o congelamiento aun no llegan a superar en número de 4,5 / vaca-vacuna / colecta (Erdem et al., 2020).

Además, es importante comprender la dinámica folicular y sus mecanismos de autorregulación para estudiar nuevas alternativas para el control del ciclo estral (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014). En el presente estudio, se ha usado una hormona estimulante del folículo bovino de cadena simple monocatenaria de acción extralarga (FSH-rcs) que incluye sitios de N-glicosilación adicionales (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). La funcionalidad fisiológica de FSH-rcs ha sido evaluada mediante un protocolo de inyección única/día (cuatro dosis decrecientes FSH-rcs normal o convencional) y un protocolo de 2 inyecciones (dos dosis decrecientes FSH-rcs reducida) para sobreestimular el crecimiento de los folículos ováricos en ganado vacuno. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar las respuestas de SOV mediante el uso de dos protocolos a dosis normal y reducida. La evaluación del efecto fisiológico de este nuevo FSH-rcs experimental mostró una respuesta SOV robusta, teniendo en cuenta el número de cuerpos lúteos obtenidos, los niveles de concentración de Estradiol, FSH, LH y de progesterona, el número y calidad de los embriones recolectados.

Respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSH recombinante.

En nuestro estudio la respuesta superovulatoria de vacas Holstein se evaluó en función del aumento de tamaño de los ovarios respecto a la longitud y ancho tanto del ovario derecho como del izquierdo; en el grupo ODL a dosis normal a día 8 se obtuvo un tamaño de $46,42 \pm 3,06$ mm,

y a día 15 de $76,00 \pm 0,00$ y en el ODA de $35,57 \pm 2,05$ mm y en el día 17 de $45,85 \pm 1,65$ mm. Por otro lado, en el OIL a dosis normal de día 8 el tamaño fue de $40,43 \pm 2,86$ mm, en el día 17 de $47,14 \pm 2,64$ mm; en el día 13 el OIL a dosis reducida fue de $60,00 \pm 1,41$ mm, y en el OIA fue de $47,71 \pm 2,02$ a dosis reducido. Nuestros resultados indican que la respuesta superovulatoria fue óptima y es compatible con estudios descritos por (Carvalho et al., 2014) (Dell'Eva et al., 2019) (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022) Por tanto, la superovulación mediante la aplicación de FSH-rcs a dosis normal y a dosis reducida podrían ser equivalentes. Los promedios más altos de tamaño ováricos en relación a una adecuada respuesta superovulatoria en nuestro estudio podrían deberse a una respuesta individual de sensibilidad de cada donante, como lo descrito por (Mikkola et al., 2020)

En nuestro estudio el número de estructuras ováricas en las vacas donantes en relación al número de folículos totales (NFTOTAL) a dosis normal a día 8 ($14,43 \pm 1,19$) fue mayor que a dosis reducida ($12,86 \pm 0,88$). Mientras en el día 15 el número de cuerpos lúteos totales (NCL TOTAL) a dosis normal fue de $10,00 \pm 0,00$, y en el día 17 a dosis reducida de $8,00 \pm 0,00$. Nuestros resultados indican que existe una óptima respuesta superovulatoria comprables con el número de cuerpos lúteos de estudios descritos por (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014). (Dell'Eva et al., 2019) (Khodadadi et al., 2022). Por lo tanto, el número de estructuras ováricas mediante la aplicación de FSH-rcs a dosis normal y a dosis reducida presentaron diferencias. El número de cuerpos lúteos están directamente relacionados con la respuesta superovulatoria, las diferencias entre protocolos podrían deberse a un efecto individual y de disponibilidad de hormona respecto a la vida media (Mikkola et al., 2020). En otros trabajos se compararon varios protocolos SOV en novillas utilizando una única inyección de FSH bovina recombinante de acción prolongada en diferentes dosis (media y alta) en una sola aplicación frente a una dosis media de FSH-p (ocho aplicaciones, respectivamente) (Carvalho et al., 2014). Se observaron diferencias en el número de folículos ovulatorios, siendo mayores en las novillas tratadas con FSH-p y bscrFSH en ocho inyecciones de dosis media, y menores en las novillas tratadas con inyecciones únicas de dosis media y alta. Posiblemente, el uso de dosis medias de FSH-p o rbFSH no sea suficiente para equilibrar los niveles de FSH necesarios para la estimulación folicular (Carvalho et al., 2014).

El diámetro folicular en el estudio no se observó diferencias estadísticas, siendo en el día 8 (celo donante) el DFOD a dosis normal de $10,42 \pm 0,31$ mm, a dosis reducido de $10,55 \pm 0,37$ m; y el DFOI a dosis normal de $10,90 \pm 0,18$ mm y a dosis reducido de $11,08 \pm 0,43$ mm. Sin embargo, en el día 15 del protocolo (colecta de embriones) se presentó el mayor diámetro folicular, posiblemente por la vida media larga de la hormona Fsh-rcs genere una mayor

prolongación del efecto estimulador folicular. Mientras tanto el diámetro de los cuerpos lúteos tanto del ovario derecho como izquierdo fue mayor en el día 17 del protocolo (colecta de embriones), siendo el DCLOUD a dosis normal de $17,97\pm 0,30$ mm, a dosis reducida de $17,15\pm 0,00$ mm, y en el DCLOI a dosis normal de $17,87\pm 0,16$ mm, y a dosis reducida de $17,55\pm 0,00$ mm.

Embriones obtenidos de donantes tratadas con 4 y 2 aplicaciones de FSh recombinante

El desarrollo de productos de FSH recombinantes de acción prolongada han permitido la superestimulación con un tratamiento único o, alternativamente, dos tratamientos con gonadotropinas con 48 horas de diferencia (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Además, se ha probado la mezcla de FSH-p con polímeros de liberación sostenida para reducir el manejo de los animales durante la superestimulación (Gabriel A. Bó & Mapletoft, 2014). En nuestro estudio las Estructuras Totales recuperadas en la colecta de embriones a día 13,15 y 17 presentó diferencias entre los días de colecta, siendo la dosis normal mayor el número de estructuras recuperadas ($8,00\pm 0,50$) en el día 15 respecto a dosis reducida ($7,43\pm 0,53$). El número de embriones transferibles (viables) en el día 15 a dosis normal fue de $6,00\pm 0,50$ siendo mayor que el de dosis reducida de $5,29\pm 0,18$. En nuestro estudio fue mayor el número de embriones viables respecto a lo reportado por trabajos en el que usaron FSH-p (Hayes et al., 2009) y fueron similares a los trabajos descritos por (Khodadadi et al., 2022)

Por otro lado, el número de embriones no viables (degenerados) en el día 15 a dosis normal fue de $2,00\pm 0,25$ y a dosis reducida de $1,86\pm 0,34$. Y el número de Óvulos no fecundados (UFOS) en el día 17 fue mayor a dosis reducida ($1,00\pm 0,20$). Nuestros resultados describen un menor número de óvulos no fecundados en relación a los reportes de (Dell'Eva et al., 2019) y de (Khodadadi et al., 2022). Por tanto, en los protocolos SOV utilizados en el presente estudio, teniendo en cuenta el total de embriones viables de grado I obtenidos, se han observado diferencias significativas entre FSH-rcs dosis normal y FSH-rcs dosis reducida. Otros estudios similares usando FSH de origen animal mostraron diferencias en protocolos convencionales comparando FSH-p vs. FSH-rcs posiblemente porque la FSH recombinante tenga mejor afinidad por los receptores de FSH en los folículos (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Finalmente, la recuperación de ovocitos/estructuras embrionarias (embriones no viables, embriones degenerados y ovocitos no fertilizados) fue comparable a estudios previos que utilizaron FSH-p durante los protocolos SOV y FSH-p (Acosta et al., 2005) (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022).

Estos resultados utilizando bscrFSH fueron consistentes y, por lo tanto, bscrFSH podría considerarse como una alternativa interesante para su uso en protocolos SOV en el presente.

El uso de FSH humana recombinante pura (rhFSH) en bovinos sin LH y gonadotropina coriónica equina (eCG) como fuente de FSH con alta actividad de LH ya se ha sido descrito, encontrándose diferencias en las concentraciones de estradiol, progesterona y LH en vacas SOV que podrían ser relacionado con la falta de actividad de la LH junto con una supresión grave de la pulsatilidad de la LH (Van de Leemput et al., 2001). Respecto a los niveles de concentración plasmática hormonal de estrógenos, FSH, LH y progesterona en nuestro estudio presentaron diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento y entre días. En nuestro estudio se observaron diferencias en la concentración de esteroides; el estradiol presentó mayor concentración plasmática en el día 8 a dosis normal ($440,42 \pm 97,12$) respecto a dosis reducida ($341,14 \pm 57,41$ ng/dl). Se sugiere que los folículos preovulatorios provenientes de protocolos de superovulación presentan niveles de estrógenos en mayor concentración debido en el día 8 debido a la presencia del celo de las donantes, lo fisiológicamente permite que la estimulación de picos LH que intervienen en la maduración folicular final y sen la sincronización de la ovulación. Se ha descrito que la frecuencia del pulso de LH suprime el crecimiento folicular, la tasa de ovulación y la fertilización En nuestro estudio la LH presentó mayor concentración en el día 8 a dosis reducida ($0,26 \pm 0,02$) que a dosis normal ($0,24 \pm 0,02$ ng/dl) (Macedo et al., 2011).

Por tanto, la ovulación local podría inducir una respuesta inflamatoria folicular fisiológica necesaria para una ovulación exitosa (Dobson & Smith, 2000), que aumentaría con un mayor número de folículos preovulatorios después de la ovulación (Espey, 1994) en vacas superovuladas.

En varios estudios la FSH humana recombinante pura (rhFSH) a sido usada en bovinos sin LH, asi como la gonadotropina coriónica equina (eCG) como fuente de FSH con alta actividad de LH, encontrándose diferencias en las concentraciones de estradiol, progesterona y LH en vacas SOV que podrían ser relacionado con la falta de actividad de la LH junto con una supresión grave de la pulsatilidad de la LH (Van de Leemput et al., 2001). En nuestro estudio la concentración plasmática de FSH fue mayor en el día 4 a dosis reducidas ($0,62 \pm 0,07$) como a dosis normal ($0,62 \pm 0,07$ ng/dl) durante el protocolo de superovulación. En otros estudios se ha comparado la vida media de la FSH con la FSH-p, siendo de 5 h y de 10 a 12 h respectivamente, lo que confirma la necesidad de inyecciones dos veces al día (Laster, 1972).

Por tanto, se han modificado los protocolos SOV y se han incorporado varias moléculas para mejorar el rendimiento de la superovulación (Kemper Green et al., 1996). Así, en nuestro estudio la diferencia en concentración plasmática de FSH en los diferentes días protocolo se podría deber a la variabilidad de aplicación de la FSH-rhc a dosis normal y a dosis reducida, lo que podría generar desniveles de concentración de FSH plasmática.

Se ha informado que las concentraciones séricas de progesterona en el día 7 (recogida de embriones/día 15) podrían diferir dependiendo de la dosis de NIH-FSH-p junto con la adición de suplementos nutricionales en las vacas (Snider et al., 2019). Este hecho estaría relacionado con un mejor desarrollo folicular y formación y funcionalidad del cuerpo lúteo; sin embargo, es importante considerar que factores como el origen de FSH y la reserva folicular ovárica están directamente asociados con los resultados obtenidos. La Progesterona en nuestro estudio presentó mayor concentración en el día 17 a dosis reducida ($36,18 \pm 0,00$ ng/dl) que a dosis normal ($33,34 \pm 4,51$ ng/dl). Por lo tanto, las vacas FSH-rhc reducida SOV presentaron niveles más altos de progesterona plasmática posiblemente por una mayor calidad de cuerpos lúteos en comparación con las vacas superovuladas mediante FSH-rhc normal.

Consecuentemente, las concentraciones de progesterona posiblemente no se vieron influenciadas por el tratamiento en sí, pero podrían haber sido afectadas por las interacciones entre tratamientos. En otros estudios se observó que la progesterona disminuyó a niveles basales antes en las novillas tratadas con FSH-p que en las novillas tratadas con gonadotropina menopáusica humana (HMG) (Alcivar et al., 1992).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La respuesta superovulatoria (SOV) de vacas tratadas con FSH-rch a dosis total en un protocolo normal (4 aplicaciones) y en un protocolo reducido (2 aplicaciones) proporcionaron una respuesta similar en la superovulación de vacas lecheras lactantes Holstein de alta producción.

El número de estructuras ováricas totales obtenidas (folículos – cuerpos lúteos) de vacas superovuladas con FSH recombinante (protocolo normal – 4 aplicaciones y protocolo reducido – 2 aplicaciones) fue similar y aceptable por vaca donante superestimulada.

La calidad y cantidad de embriones transferibles por vaca donante superestimulada no presentó diferencias entre tratamientos, sin embargo, los protocolos mediante el uso de FSH-rch hoy en día podrían aumentar el número de embriones transferibles recuperados por unidad de tiempo, para facilitar y simplificar la aplicación de programas de transferencia de embriones en granja.

Los niveles hormonales plasmáticos de estradiol, LH, FSH y progesterona son equivalentes entre los protocolos de FSH-rch normal y FSH-rch reducido, lo cual no afecta el rendimiento de cada uno de los protocolos aplicados.

En el presente estudio, se obtuvieron resultados prometedores asociados con una respuesta SOV óptima entre los protocolos FSH-rch dosis normal y FSH-rch dosis reducida. En consecuencia, es necesario señalar que el uso de FSH-rch de cadena simple y de acción extralarga podría ser una alternativa interesante para mejorar los resultados asociados a los protocolos SOV convencional

RECOMENDACIONES

Dado que los resultados muestran que los protocolos reducidos de FSH-rhc (2 aplicaciones) proporcionan una respuesta similar a los protocolos normales (4 aplicaciones), se recomienda considerar la adopción de protocolos reducidos. Esto puede no solo reducir los costos asociados con el tratamiento, sino también minimizar el estrés y el tiempo dedicado a la administración de hormonas tanto para el personal de la granja como para las vacas.

Dado que los resultados muestran que los protocolos reducidos de FSH-rhc (2 aplicaciones) proporcionan una respuesta similar a los protocolos normales (4 aplicaciones), se recomienda considerar la adopción de protocolos reducidos. Esto puede no solo reducir los costos asociados con el tratamiento, sino también minimizar el estrés y el tiempo dedicado a la administración de hormonas tanto para el personal de la granja como para las vacas.

Aunque la calidad y cantidad de embriones transferibles no difirieron entre los protocolos, se menciona la posibilidad de aumentar el número de embriones transferibles recuperados por unidad de tiempo con el uso de protocolos basados en FSH-rhc. Es importante explorar esta oportunidad para maximizar la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en la granja.

Según los resultados prometedores obtenidos en el estudio, el uso de FSH-rhc de cadena simple y acción extralarga podría ser una alternativa interesante para mejorar los resultados asociados con los protocolos de superovulación convencionales. Se recomienda investigar más a fondo esta opción y evaluar su viabilidad en el contexto de la producción lechera. Aunque no se encontraron diferencias significativas en los niveles hormonales plasmáticos entre los protocolos, se sugiere un monitoreo regular de estos niveles para garantizar la estabilidad y eficacia del tratamiento a lo largo del tiempo. Esto puede ayudar a ajustar los protocolos según sea necesario para mantener una respuesta óptima de superovulación. Dado el potencial prometedor de los protocolos de superovulación basados en FSH-rhc, se recomienda continuar la investigación en este campo para explorar nuevas formas para mejorar la eficiencia y la rentabilidad de la producción de embriones en vacas lecheras.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (1999). Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*, 199(6), 519–527. <https://doi.org/10.1007/S004290050249>
- Acosta, T. J., Tetsuka, M., Matsui, M., Shimizu, T., Berisha, B., Schams, D., & Miyamoto, A. (2005). In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *The Journal of Reproduction and Development*, 51(4), 483–489. <https://doi.org/10.1262/JRD.17018>
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.09.026>
- Adams, G. P., Kot, K., Smith, C. A., & Ginther, O. J. (1993). Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(2), 267–275. <https://doi.org/10.4141/CJAS93-029>
- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 171–179. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01302.X>
- Alcivar, A. A., Maurer, R. R., & Anderson, L. L. (1992). Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle-stimulating hormone (FSH-P) or human menopausal gonadotropin. *Journal of Animal Science*, 70(1), 224–231. <https://doi.org/10.2527/1992.701224X>
- Anagnostopoulou, C., Maldonado Rosas, I., Singh, N., Gugnani, N., Chockalingham, A., Singh, K., Desai, D., Darbandi, M., Manoharan, M., Darbandi, S., Leonardi Diaz, S. I., Gupta, S., Henkel, R., Sallam, H. N., Boitrelle, F., Wirka, K. A., & Agarwal, A. (2022). Oocyte quality and embryo selection strategies: a review for the embryologists, by the embryologists. *Panminerva Medica*, 64(2), 171–184. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.22.04680-8>
- Andra', A., Dinnyé S, A., Lonergan, P., Fair, T., Boland, M. P., & Yang, A. X. (1999). Timing of the First Cleavage Post-Insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. *Mol. Reprod. Dev*, 53, 318–324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199907\)53:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3)
- Badinga, L., Driancourt, M. A., Savio, J. D., Wolfenson, D., Drost, M., De la Sota, R. L., & Thatcher, W. W. (1992). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave

- dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 47(5), 871–883. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD47.5.871>
- Baldassarre, H. (2021). Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ANI11010216>
- Baruselli, P. S., De Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F. G., Barros, C. M., & Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77–88. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.10.006>
- Bergfeld, E. G. M., Kojima, F. N., Cupp, A. S., Wehrman, M. E., Peters, K. E., Mariscal, V., Sanchez, T., & Kinder, J. E. (1996). Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biology of Reproduction*, 54(3), 546–553. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD54.3.546>
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., & Mapletoft, R. J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 53–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4)
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 10(3), 344–348. <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2>
- Bo, G. A., Pierson, R. A., & Mapletoft, R. J. (1991). The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology*, 36(2), 169–183. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90376-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90376-O)
- Bó, G.A., & Mapletoft, R. J. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.02.001>
- Bó, Gabriel A., Baruselli, P. S., Chesta, P. M., & Martins, C. M. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65(1), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>
- Bó, Gabriel A., Cedeño, A., & Mapletoft, R. J. (2019). Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 411–422. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0042>
- Bó, Gabriel A., de la Mata, J. J., Baruselli, P. S., & Menchaca, A. (2016). Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, 86(1), 388–396. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.053>

- Bó, Gabriel A., Guerrero, D. C., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., & Mapletoft, R. J. (2010). New approaches to superovulation in the cow. In *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 22, Issue 1, pp. 106–112). *Reprod Fertil Dev*. <https://doi.org/10.1071/RD09226>
- Bó, Gabriel A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. In *Theriogenology* (Vol. 81, Issue 1, pp. 38–48). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, Gabriel A., & Mapletoft, R. J. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, *150*, 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.02.001>
- Braileanu, G. T., Albanese, C., Card, C., & Chedrese, P. J. (1998). FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, *49*(5), 1031–1037. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00051-X)
- Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Knight, P. G., & Ireland, J. J. (2005). Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, *73*(1), 54–62. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.036277>
- Carvalho, P. D., Hackbart, K. S., Bender, R. W., Baez, G. M., Dresch, A. R., Guenther, J. N., Souza, A. H., & Fricke, P. M. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, *82*(3), 481–489. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.05.011>
- Cecconi, S. (2002). Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals problems and future perspectives. *Journal of Reproduction and Development*, *48*(5), 431–445. <https://doi.org/10.1262/JRD.48.431>
- De Assín, R. R., Clavero, A., Gonzalvo, M. C., Ramírez, J. P., Zamora, S., Fernández, A., Martínez, L., & Castilla, J. A. (2009). Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reproductive Biomedicine Online*, *19*(6), 824–829. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2009.09.026>
- De Los Santos, M. J., Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., Plancha, C. E., Prados, F., Rienzi, L., Verheyen, G., Woodward, B., & Vermeulen, N. (2016). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Human Reproduction (Oxford, England)*, *31*(4), 685–686. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW016>
- De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P., & Dessy, F. (2005). Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*, *86*(1–2), 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.022>

- Deguettes, Q., Fattal, E., Moreau, M., Lego, E., & Bochot, A. (2020). Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 590). Int J Pharm. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119904>
- Dell'Eva, G., Bolognini, D., Iacono, E., & Merlo, B. (2019). Superovulation protocols for dairy cows bred with SexedULTRA™ sex-sorted semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(5), 756–761. <https://doi.org/10.1111/RDA.13421>
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191(1), 65–80. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00056-4)
- Dobson, H., & Smith, R. F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60–61, 743–752. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00080-4)
- Driver, A. M., Peñagaricano, F., Huang, W., Ahmad, K. R., Hackbart, K. S., Wiltbank, M. C., & Khatib, H. (2012). RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-118>
- Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., & Guler, M. (2020). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2541–2547. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>
- Espey, L. L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*, 50(2), 233–238. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD50.2.233>
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D. C., Hyttel, P., Ward, F. A., & Boland, M. P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 186–195. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<186:aid-mrd8>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<186:aid-mrd8>3.0.co;2-n)
- Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78(3–4), 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- García Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J., & Mapletoft, R. J. (2012). Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, 78(2), 353–360. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.02.010>
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Beg, M. A., & Kot, K. (2001). Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 64(1), 197–205. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD64.1.197>

- Ginther, O. J., Knopf, L., & Kastelic, J. P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, *87*(1), 223–230. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0870223>
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., & Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, *55*(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD55.6.1187>
- Goulding, D., Williams, D. H., Roche, J. F., & Boland, M. P. (1994). Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, *100*(2), 505–510. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1000505>
- Gutiérrez-Reinoso, M. A., Aguilera, C. J., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F. O., Cabezas, I., Sánchez, O., García-Herreros, M., & Rodríguez-Alvarez, L. (2022). Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/ANI12020153>
- Hasler, J. F., Cardey, E., Stokes, J. E., & Bredbacka, P. (2002). Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, *58*(8), 1457–1469. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01044-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01044-0)
- Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., & Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, *43*(1), 141–152. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00020-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U)
- Hasler, John F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. In *Theriogenology* (Vol. 81, Issue 1, pp. 152–169). *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2009). Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 92, Issue 2, pp. 433–443). <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1646>
- Kemper Green, C. N., Hawkins, D. A., Rocha, A., Tanner, J. W., Harms, P. G., Forrest, D. W., & Welsh, T. H. (1996). Temporal aspects of ovarian follicular growth and steroidogenesis following exogenous follicle-stimulating hormone in Angus heifers. *Animal Reproduction Science*, *45*(3), 157–176. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01582-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01582-5)
- Khodadadi, A., Niasari-Naslaji, A., Nikjou, D., & Mohammadi, B. (2022). Superovulation of high-producing Holstein lactating dairy cows with human recombinant FSH and hMG. *Theriogenology*, *191*, 239–244. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.08.010>

- Laster, D. B. (1972). Disappearance and uptake of (125 I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30(3), 407–415. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0300407>
- Lee, W. Y., Song, K. Y., Lim, K. T., Lee, S. J., Lee, B. C., & Jang, G. (2012). Influence of factors during superovulation on embryo production in Korean Holstein cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 167–174. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0057>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.09.007>
- Lonergan, Pat, Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1), 270–277. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.040>
- Looney, C. R., Bondioli, K. R., Hill, K. G., & Massey, J. M. (1988). Superovulation of donor cows with bovine Follicle-Stimulating Hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, 29(1), 271. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90099-4)
- Looney, C. R., Boutte, B. W., Archbald, L. F., & Godke, R. A. (1981). Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology*, 15(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80014-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80014-3)
- López-Gatius, F. (2012). Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology*, 77(6), 1029–1041. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.10.014>
- Luo, W., Gumen, A., Haughian, J. M., & Wiltbank, M. C. (2011). The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 84(2), 369–378. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.110.085274>
- Macedo, G. G., Zúccari, C. E. S. N., de Abreu, U. G. P., Negrão, J. A., & da Costa e Silva, E. V. (2011). Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 43(6), 1175–1182. <https://doi.org/10.1007/S11250-011-9820-6>
- Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. In *Theriogenology* (Vol. 78, Issue 5, pp. 937–950). *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
- Maillo, V., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86(1), 443–450. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.060>

- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility, and Development*, *24*(1), 278–283. <https://doi.org/10.1071/RD11919>
- Mapletoft, R. J., Steward, K. B., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, *42*(6), 601–611. <https://doi.org/10.1051/RND:2002046>
- Mellisho, E. A., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PloS One*, *12*(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0178306>
- Mikkola, M., Hasler, J. F., & Taponen, J. (2019). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(2), 104–124. <https://doi.org/10.1071/RD19279>
- Mikkola, M., Hasler, J. F., & Taponen, J. (2020). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(2), 104–124. <https://doi.org/10.1071/RD19279>
- Minasi, M. G., Greco, P., Varricchio, M. T., Barillari, P., & Greco, E. (2020). The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction. *Therapeutic Advances in Reproductive Health*, *14*, 263349412097692. <https://doi.org/10.1177/2633494120976921>
- Miura, R. (2018). *Physiological characteristics and effects on fertility of the first follicular wave dominant follicle in cattle.*
- Miura, R., Haneda, S., Lee, H. H., Miyamoto, A., Shimizu, T., Miyahara, K., Miyake, Y. I., & Matsui, M. (2014). Evidence that the dominant follicle of the first wave is more active than that of the second wave in terms of its growth rate, blood flow supply and steroidogenic capacity in cows. *Animal Reproduction Science*, *145*(3–4), 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.01.003>
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Nasser, L. F., Adams, G. P., Bo, G. A., & Mapletoft, R. J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, *40*(4), 713–724. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90207-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90207-L)
- Noguchi, T., Aizawa, T., Munakata, Y., & Iwata, H. (2020). Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo. *The Journal of Reproduction and Development*, *66*(1), 35–39. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-100>

- Oktem, O., & Oktay, K. (2008). The ovary: anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 1–9. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1434.009>
- Phillips, P. E., & Jahnke, M. M. (2016). Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 32, Issue 2, pp. 365–385). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008>
- Pontes, J. H. F., Nonato-Junior, I., Sanches, B. V., Ereno-Junior, J. C., Uvo, S., Barreiros, T. R. R., Oliveira, J. A., Hasler, J. F., & Seneda, M. M. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71(4), 690–697. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.09.031>
- Price, C. A., & Estienne, A. (2018). *The life and death of the dominant follicle.* <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0030>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/MRD.1153>
- Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati, M. P., Alves, M. F., De Almeida, T. G., Cardoso, B. L., Basso, A. C., & Nogueira, M. F. G. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assisted Reproduction*, 20(3), 150–158. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160033>
- 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>
- Savio, J. D., Thatcher, W. W., Badinga, L., De la Sota, R. L., & Wolfenson, D. (1993). Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97(1), 197–203. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0970197>
- Shahinfar, S., Page, D., Guenther, J., Cabrera, V., Fricke, P., & Weigel, K. (2014). Prediction of insemination outcomes in Holstein dairy cattle using alternative machine learning algorithms. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 731–742. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6693>
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo-Sterza, F. A., & Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76(6), 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.05.008>

- Silva-Santos, K. C., Siloto, L. S., Santos, G. M. G., Morotti, F., Marcantonio, T. N., & Seneda, M. M. (2014). Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 48–51. <https://doi.org/10.1111/RDA.12222>
- Silvia-Santos, K., & Seneda, M. (2011). Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. *Animal Reproduction*, 8(3–4), 58–67.
- Snider, A. P., McLean, D., & Menino, A. R. (2019). Effects of feeding OmniGen-AF® on superovulatory response in donor beef cows: I. Serum progesterone and cortisol, embryo recovery and quality. *Animal Reproduction Science*, 210. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106174>
- Stringfellow, D. A., Seidel, S. M., & International Embryo Transfer Society. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 170. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UIJS>
- Van de Leemput, E. E., Vos, P. L. A. M., Hyttel, P., Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Van der Weijden, G. C., & Dieleman, S. J. (2001). Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology*, 55(2), 573–592. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00427-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00427-7)
- Van Wezel, I. L., & Rodgers, R. J. (1996). Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*, 55(5), 1003–1011. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD55.5.1003>
- Viana, J. (2020). 2019 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, 38(4), 14–26.
- Viana, J. H. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), 8–25. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2018.pdf
- Wolfenson, D., Sonego, H., Shaham-Albalancy, A., Shpirer, Y., & Meidan, R. (1999). Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(2), 241–247. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1170241>
- Wrenzycki, C. (2018). Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 14–19. <https://doi.org/10.1111/RDA.13260>