



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: PECUARIA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**VALORACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PROESTRO
PROLONGADO J-SYNCH SOBRE EL AMBIENTE UTERINO EN
VAQUILLAS CRUZA CEBÚ**

AUTORES:

**CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA
JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER**

TUTOR:

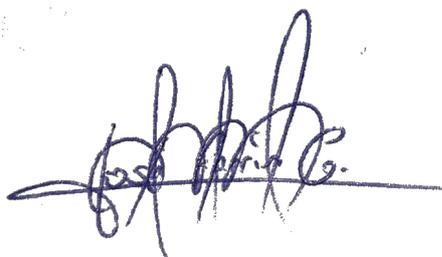
M.V. JOFRE ANDRÉS VERA CEDEÑO Mg. Sc.

CALCETA, NOVIEMBRE DE 2021

DERECHOS DE AUTORÍA

Carolina Estefanía Rosero Vera y José Enrique Ferrín Giler, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER
C.I. 131459460-5



CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA
C.I. 080456296-5

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

M.V. JOFRE ANDRÉS VERA CEDEÑO, Mg. Sc, certifica haber tutelado el proyecto VALORACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PROESTRO PROLONGADO J-SYNCH SOBRE EL AMBIENTE UTERINO EN VAQUILLAS CRUZA CEBÚ, que ha sido desarrollada por JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER y CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Firmado electrónicamente por:
**JOFRE ANDRES
VERA CEDENO**

M.V. JOFRE ANDRÉS VERA CEDEÑO, Mg. Sc.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** el trabajo de titulación VALORACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PROESTRO PROLONGADO J-SYNCH SOBRE EL AMBIENTE UTERINO EN VAQUILLAS CRUZA CEBÚ, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER y CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

JORGE
IGNACIO
MACIAS
ANDRADE

Digitally signed
by JORGE
IGNACIO
MACIAS
ANDRADE
Date: 2021.10.13
14:08:01 -05'00'

DR. JORGE I. MACÍAS ANDRADE, Mg. Sc.
MIEMBRO

GUSTAVO ADOLFO
CAMPOZANO
MARCILLO

Firmado digitalmente
por GUSTAVO ADOLFO
CAMPOZANO MARCILLO
Fecha: 2021.10.13
11:48:09 -05'00'

MVZ. GUSTAVO A. CAMPOZANO MARCILLO, Mg. Sc.
MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**ERNESTO
ANTONIO
HURTADO .**

DR. ERNESTO ANTONIO HURTADO, PhD.
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, le agradezco a Dios por darme la vida, por permitirme haber vivido nuevas experiencias llenas de aprendizajes y por haberme permitido alcanzar uno de los mayores logros para mí.

A mis padres José Ferrín y Danny Giler, por haber sido uno de los pilares fundamentales para que este sueño se hiciera realidad, por confiar en mí en cada momento de mi carrera, por haberme enseñado buenos valores los cuales me han permitido ser buena persona, sin ellos esto no hubiese podido ser realidad.

A mis hermanos, tíos y demás familiares por haberme ayudado con sus consejos, con sus palabras de aliento en momentos difíciles durante mi vida estudiantil.

A todos mis amigos por su incondicional apoyo, por su cariño, su confianza, respeto y por creer en mí.

Agradezco a mi tutor de tesis M.V. Jofre Andrés Vera Cedeño por haberme brindado todos sus conocimientos gracias a su experiencia, motivación y mucha dedicación, me supo orientar en la realización de esta tesis.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, y a cada uno de los docentes de la Carrera de Medicina Veterinaria por haberme brindado cada uno de sus conocimientos lo cual me permitió haber obtenido una educación de buena calidad.

JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico en primer lugar a Dios, quien es el que ha sabido guiarme por un buen camino, por haberme brindado la fuerza suficiente para seguir adelante y ayudarme a atravesar todas las dificultades que se me han presentado en la vida.

A mis padres José Enrique Ferrín Moreira y Danny Nohemí Giler Loor, por todo el apoyo brindado, su comprensión y amor, por haberme brindado todo su apoyo económico para poder estudiar, su esfuerzo y lucha inalcanzable por querer verme seguir adelante lo cual los convierte en un ejemplo a seguir para mí, me enseñaron los buenos valores, y el esfuerzo y constancia para perseguir y luchar por cada uno de mis objetivos.

A mis hermanos Valeria Ferrín, Javier Ferrín y Lucy Ferrín, a mi sobrina Sarah Nohemí Solórzano Ferrín, y demás familiares porque me han sabido brindar todo el apoyo emocional y económico a lo largo de mi trayecto,

A mis amigos que supieron estar en cada momento, que siempre me escucharon y me brindaron su apoyo en los buenos y malos momentos.

JOSÉ ENRIQUE FERRÍN GILER

AGRADECIMIENTO

Le agradezco principalmente a Dios por ser la luz que me ha guiado a lo largo de mis estudios, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles.

Agradezco infinitamente a mi madre María Eugenia Vera, por ser el motor principal en mi vida, por guiarme por el camino correcto. A Mis hermanos Gabriela Solórzano, Luis Rosero, Diego Rosero porque siempre han estado a mi lado juntos en todas las circunstancias.

A una extraordinaria persona que Dios puso en mi camino Isabel Velásquez le agradezco infinitamente todo el amor y dedicación y siempre estar pendiente de mí.

A mi compañero de vida José Luis González por estar a mi lado apoyándome para cumplir mi meta, a mi hijo Saúl González por ser mi más grande inspiración para salir adelante.

Le agradezco a mis amigos por apoyarnos en todos momentos, por el cariño que me brindaron. Agradezco a mi compañero de tesis José Ferrín por siempre acompañarme con perseverancia en este camino hacia la titulación.

A mi comadre Kassandra Zamora porque desde que inicio mi carrera universitaria siempre me brindo su amistad, confianza y apoyo.

Agradezco a los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria por brindarnos todos sus conocimientos, en especial a mi tutor M.V. Jofre Andrés Vera Cedeño.

CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA

DEDICATORIA

El presente trabajo fruto de un largo camino recorrido, se lo dedico la persona más maravillosa, María Eugenia Vera que con mucho esfuerzo y amor incondicional no me ha permitido desmayar, sus consejos y valores que me ha transmitido han hecho posible llegar a culminar mis estudios.

A mi hermana Gabriela Solórzano por ser ejemplo de superación y brindarme sus consejos en los todos los momentos de mi vida.

A mi marido José Luis González quien con amor y paciencia me ha ayudado a culminar mis estudios, A mi hijo Saúl González por ser la mayor inspiración que me impulsó a seguir adelante con mis estudios.

Le dedico este logro a mi suegra Isabel Velásquez por ser ese ángel que siempre está pendiente en cada momento de mi vida.

A mi comadre Kassandra Zamora y a mis amigos por escucharme y brindarme su cariño y apoyo en todo momento.

CAROLINA ESTEFANÍA ROSERO VERA

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE CUADROS.....	xi
CONTENIDO DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. AMBIENTE UTERINO.....	6
2.2. PROGESTERONA	8
2.3. ESTRADIOL.....	8
2.4. J-SYNCH COMO PROTOCOLO DE IATF EN GANADO BOVINO.....	8
2.5. TRATAMIENTO CON J-SYNCH	9
2.6. PROTOCOLO CONVENCIONAL.....	9
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	11
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11
3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS	11

3.3.	DURACIÓN DEL TRABAJO.....	11
3.4.	MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	11
3.5.	FACTOR EN ESTUDIO.....	11
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	11
3.7.	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	12
3.8.	VARIABLES	12
3.8.1.	VARIABLES INDEPENDIENTES.....	12
3.8.2.	VARIABLES DEPENDIENTES.....	12
3.9.	PROCEDIMIENTOS.....	12
3.9.1.	ANIMALES E INSTALACIONES	12
3.9.2.	APLICACIÓN DE PROTOCOLOS	13
3.9.3.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE	14
3.9.3.1.	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA PROGESTERONA SIETE DÍAS POSTOVULACIÓN.....	14
3.9.3.2.	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA ESTRADIOL SIETE DÍAS POS OVULACIÓN	15
3.9.4.	MUESTRAS UTERINAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	15
3.9.5.	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	16
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1.	CANTIDAD DE RECEPTORES PARA ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN VAQUILLAS CRUZA CEBÚ	18
4.2.	NIVELES DE PROGESTERONA Y NIVELES DE ESTRADIOL.	20
4.3.	DIÁMETRO DE CUERPO LÚTEO Y TASA DE PREÑEZ	22
	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
	BIBLIOGRAFÍA	26
	ANEXOS	32

CONTENIDO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 3. 1. Condiciones climáticas de la empresa “Agrícola El Naranjo” S.A, Hacienda “El Napo”	11
Cuadro 4. 1. Cantidad de receptores para estradiol y progesterona en vaquillas cruza cebú.....	18
Cuadro 4. 2. Niveles de progesterona y niveles de estradiol.....	21
Cuadro 4. 3. Diámetro de cuerpo lúteo y tasa de preñez	22

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 3. 1. Protocolos utilizados en la investigación.	14
---	----

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo valorar el efecto de la utilización del protocolo de prolongación de proestro J-Synch sobre el ambiente uterino en vaquillas cruzas cebú. Para esto se utilizaron 21 vaquillas cebú que fueron divididas al azar en tres grupos de tratamientos de sincronización, en cada grupo constituido por siete animales, respectivamente; se aplicó un tratamiento (J-Synch normal y modificado, además de tratamiento convencional con Cipionato de estradiol). Los datos fueron analizados utilizando un procedimiento de modelos generales y mixtos para familia de datos normales con enlace identify para evidenciar el efecto de las variables independientes sobre la variable respuesta (ambiente uterino). Para todos estos análisis se utilizó el software InfoStat. Como resultado en lo que respecta a la cantidad de receptores para estradiol y para progesterona no se encontró diferencias estadísticas entre grupos ($P > 0,05$). Pero los grupos J-Synch 7 d ($7,0 \pm 1,2$) y J-Synch 6 d ($6,8 \pm 1,4$) presentaron mayores niveles de progesterona ($P < 0,05$) que el grupo Convencional ($5,0 \pm 1,5$). Además, mayores niveles de estradiol ($P < 0,05$) se encontró en los grupos J-Synch 7 d ($15,7 \pm 6,2$) y J-Synch 6 d ($15,0 \pm 5,7$) frente al grupo Convencional ($11,0 \pm 5,6$). Mientras que no se encontró diferencias estadísticas para diámetro de cuerpo lúteo y tasa de preñez ($P > 0,05$). Se concluye que el tratamiento de sincronización genera similares cantidades de receptores endometriales para progesterona y estradiol que los tratamientos controles; sin embargo, los niveles hormonales fueron mayores en los tratamientos con prolongación de proestro.

PALABRAS CLAVE

Estradiol, Progesterona, Ambiente uterino, Receptores endometriales.

ABSTRACT

This research aimed to assess the effect of the use of the J-Synch proestro prolongation protocol on the uterine environment in zebu cross heifers. For this, 21 zebu heifers were used that were randomly divided into three groups of synchronization treatments, in each group consisting of seven animals, respectively; a treatment was applied (normal and modified J-Synch, in addition to conventional treatment with estradiol cypionate). The data was analyzed using a general and mixed model procedure for a family of normal data with identify link to demonstrate the effect of the independent variables on the response variable (uterine environment). The InfoStat software was used for all these analyzes. As a result, regarding the number of receptors for estradiol and progesterone, no statistical differences were found between groups ($P > 0.05$). But the J-Synch 7 d (7.0 ± 1.2) and J-Synch 6 d (6.8 ± 1.4) groups had higher progesterone levels ($P < 0.05$) than the conventional group (5.0 ± 1.5). In addition, higher levels of estradiol ($P < 0.05$) were found in the J-Synch 7 d (15.7 ± 6.2) and J-Synch 6 d (15.0 ± 5.7) groups compared to the Conventional (11.0 ± 5.6). While no statistical differences were found for corpus luteum diameter and pregnancy rate ($P > 0.05$). It is concluded that the synchronization treatment generates similar amounts of endometrial receptors for progesterone and estradiol than the control treatments; however, hormonal levels were higher in treatments with proestrous prolongation.

KEY WORD

Estradiol, Progesterone, Uterine environment, Endometrial receptors.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La Inseminación artificial (I.A) ha ganado mucha popularidad y empezó a ser utilizada de una manera masiva desde que se implementó la IA a tiempo fijo IATF (Bó *et al.*, 2013), la cual no necesita detectar el estro, disminuyendo las horas en que se realiza el trabajo y los errores en la eficiencia de la técnica. En los actuales momentos existe una amplia gama de tratamientos de IATF disponibles para poder utilizarlas tanto en ganaderías de carne como también para producción de leche (Bó *et al.*, 2013; Bó *et al.*, 2016).

El uso de protocolos de sincronización modernos permite a los ganaderos obtener excelentes resultados dentro de un eficiente progreso genético, es considerado hoy por hoy sustancial en estos procesos. En los actuales momentos la industria ganadera pretende que los animales ya sean de carne o leche alcancen un alto rendimiento productivo y que por año se logre obtener un ternero por vaca. Muchas veces es complicado alcanzar dichas metas por circunstancias como: mal manejo y la mala selección de reproductores (Saldarriaga, 2009).

También los tratamientos Co-Synch han sido utilizados junto a la inserción de un dispositivo con P4 resultando en mejores tasas de preñez en vaquillonas de carne (Martínez *et al.*, 2002). Con respecto a la fertilidad de esta estrategia, Bridges *et al.* (2008) reportan que las tasas de preñez fueron 10,5 puntos porcentuales superiores en las tratadas con Co-Synch de 5 días en comparación con las tratadas con Co-Synch de 7 días. Estos resultados son iguales a los publicados Santos *et al.* (2010) en vacas lecheras con una mejora significativa en las tasas de preñez en los animales que recibieron un Co-Synch de 5 días.

En vaquillas de carne se ha demostrado que es exitoso el tratamiento Co-Synch de 5 días con IATF a las 72 h al ser comparado con otros dos protocolos (Perry *et al.*, 2012) el cual logró alcanzar tasas de preñez por encima del 60%. Whittier *et al.* (2013) mencionan en una investigación que existen reportes en los cuales las vacas cruce Angus que fueron sincronizadas con el Co-Synch de 5 días,

tuvieron mayor porcentaje de preñez que aquellas que recibieron un protocolo Co-Synch de 7 días (58,1% vs. 55,1%; $P < 0,05$).

Además, Bó *et al.* (2016) reportan de un nuevo tratamiento el cual utiliza un protocolo basado en la aplicación de benzoato de estradiol (EB) con un dispositivo que contiene P4, cuando la remoción del dispositivo con P4 fue hecha 6 días después y se prolongó el proestro administrando GnRH como inductor de la ovulación a las 72 h en lugar de las 48 h. Este nuevo protocolo tomó el nombre de J-Synch (de la Mata y Bó, 2012) el cual ha dado lugar a tasas de preñez a la IATF donde tendieron a ser mayores con el protocolo J-Synch que con el protocolo Convencional utilizado en Argentina en las vaquillas de leche (Ré *et al.*, 2014; 2015) y significativamente mayores en vaquillonas de carne y receptoras de embriones (Bó *et al.*, 2016, Menchaca *et al.*, 2016).

Existen varios estudios en los cuales el buen tamaño del folículo dominante es de suma importancia en la formación de un buen cuerpo lúteo que segregue niveles significativos de progesterona (P4) lo cual determinará un buen ambiente uterino para el desarrollo del embrión. El ambiente uterino se define como la capacidad del organismo materno para hospedar el *conceptus* exitosamente. La receptividad uterina va a depender de la adecuada concordancia del eje *conceptus* – cuerpo lúteo – endometrio y está dado. Esto está controlado por dos mecanismos, el primero que va a depender de la madre, y se establece entre la relación de los estrógenos (E2) y la progesterona (P4). El segundo es mediado por el trofoblasto que secreta interferón Tau (INFT) (Gonella *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta lo planteado con anterioridad surge la siguiente interrogante:

¿Con la prolongación del proestro utilizando el protocolo J-Synch en vaquillas, se aumentará el ambiente uterino de los animales sincronizados en comparación con los protocolos tradicionales con Cipionato de Estradiol?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La inseminación artificial está cumpliendo un papel muy importante en nuestro país en la reproducción ganadera bovina, por lo que es necesario hacer el uso de esta biotecnología y así aprovechar sus ventajas tales como reducir costos, tiempo, aumentar la rentabilidad y productividad dentro de los hatos ganaderos de pequeños y grandes productores, ya que sin reproducción no hay producción (Suárez, 2015). Durante los últimos años los investigadores han venido desarrollando un sin número de protocolos para sincronizar la ovulación y así lograr evitar la necesidad de detectar el celo pudiendo ser este eliminado o por lo menos minimizado y esto sin comprometer las tasas de preñez (Colazo *et al.*, 2007).

Al implementar sistemas que permitan un mayor control del momento exacto en que las vacas deben ser inseminadas, permite tener un mayor y mejor control reproductivo de los animales, lo que llevará a obtener mayores ganancias económicas y animales genéticamente mejorados. Dentro de la industria ganadera es muy importante que las personas tengan conocimiento de cómo se logran obtener mejores animales tanto en lo reproductivo como en lo productivo, dentro de esto se aplica la labor del industrial pecuario, lo cual consiste asesorar a las personas que estén inmersos dentro de la ganadería sobre las ventajas de la I.A.T.F y la manera en que pueden ahorrar sus recursos para así lograr mejorar los hatos con genética de una óptima calidad (Saldarriaga, 2009).

En la actualidad se han implementado trabajos para evaluar el uso de tratamientos cortos, dentro de estos se encuentra el J-Synch el cual consiste en la inserción de un dispositivo intravaginal que contiene progesterona por un período de 6 días, acompañado de una dosis de benzoato de estradiol (BE) al inicio del tratamiento para sincronizar el inicio de una nueva onda folicular, una vez que se retira el dispositivo intravaginal se aplica un agente luteolítico, y después de 72 horas se realiza la IATF y se aplica GNRH (de La Mata *et al.*, 2015).

La secreción de progesterona por parte del CL va a estimular la actividad secretora de las glándulas endometriales las cuales producen ciertas sustancias

que son las encargadas de mantener el embrión hasta la formación de los placentomas. El embrión es activo desde el punto de vista endócrino desde muy temprano, produce prostaglandinas, esteroides y algunas proteínas. Durante la gestación la inactividad uterina es atribuida a la progesterona, que inhibe cualquier actividad contráctil, así previene que los embriones o fetos sean expulsados (Ochoa, 2013).

Según Gonella *et al.* (2010) cuando la fertilización y desarrollo embrionario son exitosos, el interferón Tau (INTf) ejerce su efecto luteotrópico, esto ocurre entre el día 15 y 19 de la gestación, dando paso al proceso donde ocurre el reconocimiento materno para evitar la regresión luteal y asegurar la sobrevivencia del embrión. Además, así como los receptores de progesterona y de estradiol, también el INTf colabora y estimula al organismo materno para producir un microambiente uterino adecuado que le brinde al embrión condiciones nutricionales, inmunológicas y fisiológicas las cuales son óptimas para su desarrollo, lo cual repercute en la tasa de preñez de los animales.

Por todo lo expuesto anteriormente esta investigación tiene relevancia porque pretende aumentar la cantidad de receptores endometriales para progesterona y estradiol presentes en el útero en vaquillas cruza cebú, utilizando un protocolo de prolongación de proestro. Como argumenta Gonella *et al.* (2010) la receptividad uterina va a depender de la adecuada concordancia del eje conceptus – cuerpo lúteo – endometrio.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto de la utilización del protocolo de prolongación de proestro J-Synch sobre el ambiente uterino en vaquillas cruza cebú.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar el ambiente uterino a través de receptores endometriales de progesterona y estradiol mediante Inmunohistoquímica en las vaquillas tratadas con el protocolo J-Synch normal, modificado y tratamiento convencional con Cipionato de estradiol.

Determinar los niveles séricos de progesterona y estradiol en vaquillas tratadas con el protocolo J-Synch normal, modificado tratamiento convencional con Cipionato de estradiol.

Estimar el diámetro de los cuerpos lúteos y el porcentaje de tasa de preñez en vaquillas tratadas con el protocolo J-Synch normal, modificado y tratamiento convencional con Cipionato de estradiol.

1.4. HIPÓTESIS

La prolongación del proestro y la reducción del periodo de inserción del dispositivo con progesterona (protocolo J-Synch) aumentarán la cantidad de receptores endometriales para progesterona y estradiol presentes en el útero en vaquillas cruza cebú.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. AMBIENTE UTERINO

Se conoce como ambiente uterino a la capacidad del organismo materno para hospedar el *conceptus* con éxito la receptividad uterina va a depender de la correcta sincronización del eje *conceptus*-cuerpo lúteo-endometrio (Gonella *et al.*, 2010). Es controlado por la madre a través de las relaciones entre la progesterona (P4) y los Estrógenos (E2); y también por el trofoblasto mediante la secreción de interferón Tau (INFt). Los estrógenos son sintetizados en las células foliculares del ovario y determinan los cambios morfológicos, fisicoquímicos y de la manera de comportarse de la hembra cuando está en celo. La P4 es sintetizada por el cuerpo lúteo (CL) y promueve, entre otros cambios a nivel del endometrio para la manutención de la gestación (Callejas, 2001).

Según Gonella *et al.* (2010) demuestran que el INFt ejerce su efecto luteotrófico entre los días 15 y 19 de la gestación, desencadenando el proceso de reconocimiento materno para evitar la regresión luteal y asegurar la sobrevivencia del embrión.

Desempeña un papel muy crítico el ambiente uterino al momento del desarrollo temprano de la preñez, la elongación y la adhesión. Durante el ciclo estral en el endometrio se producen cambios en cuanto a su estado de diferenciación y composición, estos cambios son regulados principalmente por progesterona, estradiol y oxitocina (Spencer y Bazer, 2004).

Ozturk, (2010) y Nakamura *et al.* (2005) manifiestan que el estradiol alteró los ritmos circadianos en el útero. Además, Albrecht (2006) los genes CLOCK regulan la transcripción de otros genes y las oscilaciones biológicas de una forma específica según el tejido en respuesta a cambios en el estado de nutrientes, la duración del día y probablemente otras influencias ambientales.

El útero también tiene la probabilidad de perjudicar el desarrollo del embrión y la sobrevivencia a través de los nutrientes secretados dentro del mismo; el histotrofo uterino está compuesto de factores de crecimiento, nutrientes,

proteínas glucosa, agentes inmunosupresores, enzimas e iones (Gray *et al.*, 2001).

La sincronización de los cambios en ambiente uterino es de importancia crítica para que el embrión sobreviva. En el ganado vacuno la sincronía entre el embrión y el útero debe ser ± 24 horas, y el estradiol ovárico juega un papel importante en el establecimiento del momento de la receptividad ovárica (Hasler, 2001).

Es de suma importancia conocer que en los bovinos la adhesión y placentación no ocurren de una manera rápida, el embrión va a permanecer en la luz del útero hasta que se produce la adhesión, durante esta fase, la sobrevivencia del embrión es dada por la calidad del ambiente uterino, principalmente porque depende de la nutrición histotrófica (Butler y Alberio, 2016).

El reconocimiento de la gestación (fundamentalmente secreción del interferón Tau por parte del trofoblasto) implica los cambios (transcripciones) de células que se encuentran en el endometrio para que originen el medio adecuado para la nutrición histotrófica. Esto es dependiente de los niveles de P4. Estas modificaciones en el histotrofo estimulados por la P4 son los comprometidos de la contundente elongación del embrión lo cual sucede entre los días 10 a 12 (Butler y Alberio, 2016). Por otra parte, el interferón tau no se restringe a evitar a evitar la lisis del cuerpo lúteo permitiendo la secreción de P4 por el CL activo, sino que posee también una acción inmunomoduladora impidiendo el rechazo inmunológico del embrión por su condición de alojamiento (Chelmonska, 2002).

Está claro que una de las principales indicaciones de preñez está dada por la acción del ITFt, este es un defensor del CL porque es antileutolítico e indirectamente luteotrófico por la estimulación de la producción de PGE2 entre el día 8 y 9 (Bajaj y Sharma, 2011). La calidad del medio uterino y la producción del histotrofo son absolutamente dependientes de los estrógenos y progesterona, los factores que afectan los niveles de estas hormonas afectaran la viabilidad del embrión (Bridges *et al.*, 2013).

2.2. PROGESTERONA

Una de las hormonas clave en el control del desarrollo del embrión es la progesterona que provoca la producción de la secreción del endometrio suficiente para un excelente desarrollo del embrión (Mann *et al.*, 2006), niveles bajos de P4 se ha relacionado con el fracaso del embarazo temprano y el mal desarrollo embrionario, probablemente debido a una prematura maduración del ovocito disminuyendo la capacidad del embrión para un crecimiento y desarrollo apropiado (Butler y Alberio, 2016).

En algunos estudios se determina que la P4 subluteal en la última etapa del ciclo deprime seriamente la preñez, ya sea por afectar la fertilidad del ovocito que es ovulado, por afectarse la sobrevivencia de los ovocitos fecundados que no pueden seguir el desarrollo y finalmente por afectarse la morfología y las secreciones del útero (Shaham *et al.*, 2001). La P4 es esencial para la sobrevivencia del embrión, el desarrollo y el reconocimiento de la preñez, Concentraciones altas de P4 han sido asociadas con un aumento de la tasa de desarrollo del *conceptus* (Garret *et al.*, 1988).

2.3. ESTRADIOL

Butler y Alberio (2016) reportan que esta hormona coordina eventos fisiológicos esenciales para la reproducción, tales como el transporte espermático, manifestación del celo, la preparación de las células de los folículos para su luteinización y por lo siguiente la producción de P4.

Bó *et al.* (2016) menciona que el uso de estradiol (estradiol-17 β o benzoato de estradiol) y dispositivos intravaginales con progesterona; están relacionados con programas de IATF, sincronización de receptoras de embriones a tiempo fijo y donantes de embriones, pertenecientes a los protocolos de superovulación de *Bos indicus* y *Bos taurus*.

2.4. J-SYNCH COMO PROTOCOLO DE IATF EN GANADO BOVINO

En el año 2012 de la Mata y Bó desarrollaron un protocolo que tomó por nombre J-Synch en el cual utilizan BE y progesterona por un periodo reducido de tiempo (6 días) acortando de este modo el periodo de dominancia, asimismo del uso de

GnRH como inductor de la ovulación a las 72 horas; obteniendo prolongar el proestro (de la Mata, 2016).

Con el J-Synch se han obtenido resultados cercanos al 60% de preñez en vaquillonas, que demuestran una mejora en la tasa de concepción en programas de IATF (Ré *et al.*, 2014; Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2016,). Mientras que Yáñez *et al.* (2018) indican que, el uso de un protocolo con proestro prolongado (JSynch), mejora la tasa de preñez ($P \leq 0,05$), cuando se insemina a las 60 horas (61%) de retirado el dispositivo con progesterona, en comparación con la inseminación a las 72 horas (47%).

Además, Menchaca *et al.* (2017) reporta que este protocolo aumenta la tasa de preñez comparado con el protocolo convencional de siete u ocho días con estradiol, especialmente cuando se utiliza hormona coriónica equina (eCG) al retirar el dispositivo.

2.5. TRATAMIENTO CON J-SYNCH

J-Synch es un protocolo a base de estradiol que estimula el desarrollo del folículo dominante antes de la ovulación. Este protocolo de IATF con J-Synch hace uso de BE y progesterona para conseguir sincronizar el inicio de una nueva onda folicular, empleando la inserción del dispositivo de progesterona de 6 días en lugar de 7 u 8 días y administrando GnRH como inductor de la ovulación a las 72 horas posterior de la remoción del DIV junto con la IATF con el fin de prolongar el proestro (de la Mata *et al.*, 2012).

El tratamiento J-Synch ayuda a disminuir el tiempo de duración del dispositivo y como aumentar el período de proestro, lo que se traduce en ovulación y mejoras de la tasa de preñez; con una mayor probabilidad de éxito de la reproducción del ganado (Gamboa, 2020).

2.6. PROTOCOLO CONVENCIONAL

Este protocolo es a base de progestágenos impregnados en dispositivos intravaginales bovinos. En el día 0 se realiza la aplicación del dispositivo junto con la administración de benzoato de estradiol, en el día 8 se retira el dispositivo y se aplica una dosis de prostaglandina. El día 9 se efectúa una segunda

aplicación BE y por último el día 10 se procede a la respectiva inseminación considerando (Bó y Baruselli, 2014; Bó *et al.*, 2015).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La actual investigación se efectuó en la provincia de Manabí en el cantón San Vicente en la empresa “Agrícola El Naranjo” S.A, Hacienda “El Napo”, ubicada entre las coordenadas geográficas 000 33’29,8” de latitud sur y 0,800 25’36,8” de latitud oeste, la temperatura media va desde los 28 y 30 ° C, y se haya a una altura de 5 msnm.

3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS

Cuadro 3. 1. Condiciones climáticas de la hacienda Napo.

Condiciones climáticas	Promedios
Pluviosidad media anual (mm)	1350
Temperatura media anual (°C)	28
Humedad relativa anual (%)	80
Heliofanía anual (horas/sol)	4380
Evaporación anual (mm)	1652,3

Fuente: Instituto nacional meteorología e hidrografía (2020).

3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

La presente investigación tuvo una duración aproximada de seis meses, de los cuales tres meses fueron a nivel de campo y tres meses de laboratorio.

3.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS

Como método en esta investigación se utilizó el método experimental, donde un conjunto de variables se mantiene constantes, mientras que el otro conjunto de variables se mide como sujeto del experimento (Rodríguez y Pérez, 2017); mientras que como técnica se utilizó la observación y medición que permitió la verificación y análisis de las muestras evaluadas (Canquil *et al.*, 2019).

3.5. FACTOR EN ESTUDIO

Protocolos de sincronización para IATF

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta investigación fue de tipo experimental que incluye datos descriptivos y comparativos entre los tratamientos no incluyó diseños experimentales

tradicionales, por ese motivo en el proceso de análisis de datos se aplicó los procedimientos de los modelos lineales generalizados y mixtos.

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

Las unidades experimentales estuvieron conformadas por un total de 21 vaquillas cíclicas cruza cebú, con un peso mayor a 270 Kg y con una condición corporal 2,5 a 3,5 y edad promedio de 24 meses. Del total de los animales, fueron divididos en tres grupos experimentales (7 por grupo) y en cada grupo se aplicó un tratamiento diferente (J-Synch normal; J-Synch modificado y tratamiento convencional con Cipionato de estradiol o control).

3.8. VARIABLES

3.8.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Protocolos de sincronización para IATF

3.8.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Cantidad de receptores para E2. (n)

Cantidad de receptores para P4. (n)

Niveles de estradiol (E2) (pg/mL)

Niveles de progesterona (P4) (ng/mL)

Diámetro de los cuerpos lúteos (mm)

Tasa de preñez (%)

3.9. PROCEDIMIENTOS

Para esta investigación se llevaron a cabo las siguientes actividades:

3.9.1. ANIMALES E INSTALACIONES

Para este trabajo se utilizaron vaquillas cruza cebú que fueron divididas por grupos. Para la selección de las vaquillas se utilizaron los siguientes criterios de inclusión: condición corporal entre 2,5 a 3,5 [escala del 1 (flaca) al 5 (obesa)] (López, 2006). Peso corporal mayor a 270 Kg, con un desarrollo uterino

apropiado (diámetro de los cuernos próximo a la bifurcación mayor a 2 cm aproximadamente) y con presencia de CL y/o folículos mayores a 10 mm de diámetro en los ovarios (de la Mata, 2016).

3.9.2. APLICACIÓN DE PROTOCOLOS

Los protocolos utilizados en la investigación se observan en la Figura 3.1. El tratamiento denominado J-Synch 6 días consistió en la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol®, Zoetis, Argentina) y un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0,5 g®, Zoetis, Argentina) en el Día 0. En el Día 6 se removieron los DIB y se administró 500 µg de cloprostenol (PGF2α; Ciclase DL®, Syntex, Argentina). En el Día 9 (72 h pos-retiro de DIB) se realizó la IATF y en las vaquillas que no manifestaron celo se administró una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonasyn Gdr®, Syntex, Argentina).

El segundo tratamiento de prolongación de proestro también denominado J-Synch 7 días, de dispositivos intravaginales de P4. En el Día 0, todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con 0,5 g de P4 (DIB 0,5; Zoetis) y una aplicación inyectable por vía intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, 2ml de Gonadiol 0,5; Zoetis). En el Día 7 todos los animales fueron reunidos para la remoción del dispositivo de progesterona recibieron, una dosis de 500 µg PGF2α (2 ml de Dinolytic®, PGF, Zoetis), una dosis de 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG), (eCG; 2ml de NOVORMON 5000 Syntex, S.A. Argentina). En el Día 9 (72 h pos-retiro de DIB) se realizó la IATF y en las vaquillas que no presentaron celo se administró una dosis de 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonasyn Gdr®, Syntex, Argentina).

El tratamiento Convencional consistió en 2 mg de BE y un DIB 0,5 (Zoetis, Argentina) en el Día 0. En el Día 7 se administró PGF2α (Ciclase DL®, Syntex, Argentina), 0,5 mg de cipionato de estradiol (CPE; Cipiosyn®, Syntex, Argentina) y se retiraron los DIB. En el Día 9 (48 h pos-retiro de DIB) se realizó la IATF. Todas las hormonas inyectables se administraron por vía intramuscular (IM) profunda con agujas 40 x 12 -18 G x 1 ½ y jeringas de volumen adecuado (3 o 5 ml totales).

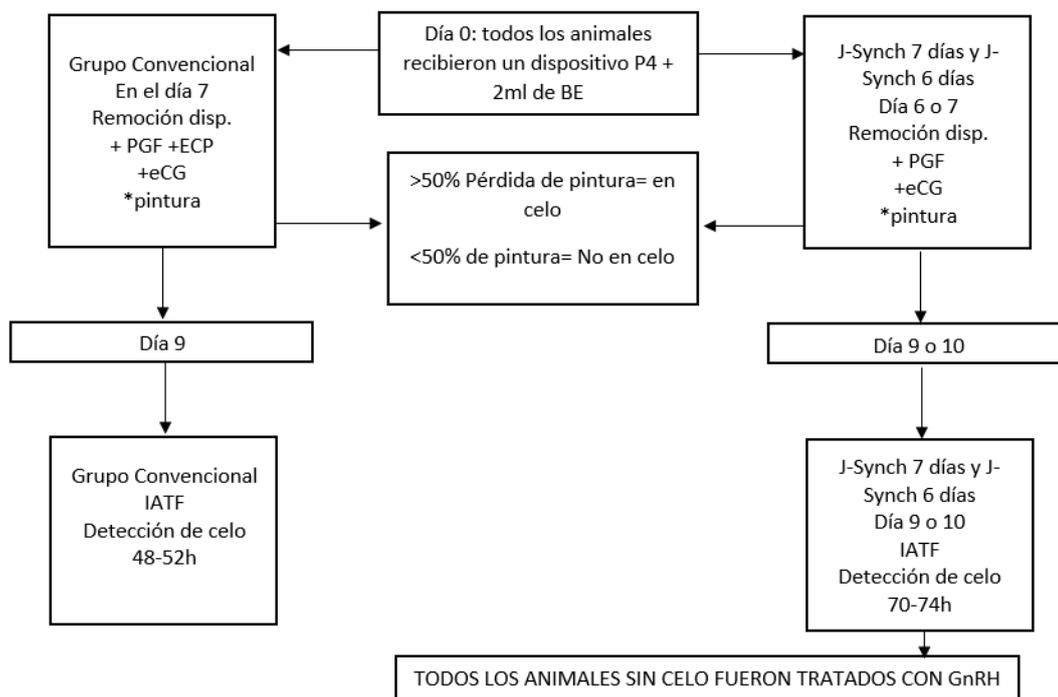


Figura 3. 1. Protocolos utilizados en la investigación.

3.9.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Para determinar los niveles hormonales, se tomó aproximadamente muestras de 9 mL de sangre por punción yugular. Para estos se utilizó tubos de marca Vacuette® Las muestras fueron centrifugadas a 4000 RPM durante 30 minutos para separar el suero, cuando se efectuó esto, se tomó las muestras para destinarlas a tubos *ependors*. Las agujas con la que se tomó las muestras de sangre fueron solo usadas una vez; se fue colocando las muestras de sangre en una caja de espuma de poliuretano a más o menos 15°C y después se centrifugó la sangre a medida que se completa los espacios de la centrifuga. Una vez finalizado la toma de muestra se almacenó en un congelador a una temperatura máxima de 8°C como máximo.

3.9.3.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA PROGESTERONA SIETE DÍAS POST-OVULACIÓN

Las muestras de plasma/suero se determinaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de Estradiol fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase líquida utilizando kits de MP (MP

BIOMEDICALS, INC. Solon, OH 44139 USA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2,8 pg/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (15 pg/mL) fue 16,6 %. El coeficiente de variación interensayo para el mismo control fue 19,1 %.

3.9.3.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA ESTRADIOL SIETE DÍAS POST-OVULACIÓN

Las muestras de plasma/suero se determinaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de Progesterona fueron determinadas por un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de MP (MP BIOMEDICALS, INC. Solon, OH 44139 USA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,020 ng/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para el control 1 (0,21 ng/mL) y el control 2 (5,4 ng/mL) fueron 21,6 % y 11,7 % respectivamente.

3.9.4. MUESTRAS UTERINAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la medición de receptores se tomaron muestras de endometrio el día de la IATF tanto en el grupo J-Synch (n=7), J-Synch modificado (n=7) como en el grupo Convencional con Cipionato de estradiol (n=7). Se utilizó cepillos citológicos (Cytobrush) adaptados a la pistola de inseminación. Para la maniobra, se administró 140 mg de procaína clorhidrato como anestesia epidural.

Se higienizó la región perineal, y se introdujo la pistola de inseminación previamente preparada con el Cytobrush con camisa sanitaria por vía vestibulo-vaginal hasta el cérvix uterino, para finalmente tomar las muestras de endometrio ipsilateral al CL presente (dos muestras) y contralateral al mismo (una muestra), asegurándose que se realice en el tercio craneal del cuerno uterino. Una de las muestras endometriales ipsilateral al CL fue destinada para el estudio de receptores nucleares de esteroides sexuales (PR y ER 1) por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ).

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% y embebida en parafina para el estudio de IHQ, se congelaron en nitrógeno líquido (-196°C) y fueron

almacenadas a -80°C . La IHQ se realizó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

3.9.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Sobre las muestras obtenidas mediante Cytobrush y fijadas para IHQ, la inmunoreactividad de las proteínas de interés fue visualizada en cortes transversos de $5\text{-}\mu\text{m}$ de tejido uterino ipsilateral al CL, utilizando una técnica de inmunohistoquímica de adivina-biotina peroxidasa. Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados en concentraciones decrecientes de etanol. Los cortes se colocaron en citrato de sodio $0,01\text{ M}$ ($\text{pH } 6,0$) y colocados en microondas por $4,5$ minutos para mejorar la exposición del antígeno. El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. Luego del lavado con PBS ($0,01\text{M}$, $\text{pH } 7,5$), la actividad no específica de las peroxidasas endógenas se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 minutos.

Luego del lavado con PBS durante 10 minutos, las muestras fueron incubadas con suero de caballo normal (NHS; Vector laboratories, Burlingame, CA, United States) durante 60 minutos en cámara húmeda. Luego, estas se incubaron por 1 hora con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-ER α (Santa Cruz, Los Angeles, CA, USA), anti-PR (Zymed, San Francisco south, CA, USA) y policlonal de conejo anti-IGF-1R (abcam, England, United Kingdom) y policlonal de conejo anti-IGF-1R (abcam, England, United Kingdom) diluidos en PBS $1:25$, $1:100$, $1:50$ y $1:100$, respectivamente.

Los controles negativos son generados reemplazando al anticuerpo primario por un homólogo IgG no inmunógeno a una concentración equivalente. Después de la unión del anticuerpo primario, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario (IgG biotinilado; Vector laboratories, Burlingame, CA, United States), anti-ratón (ER α , PR), anti-cabra (IGF-1) o anti-conejo (IGFR1) diluidos en suero de caballo normal o suero de cabra. El Kit Vectastain ABC (Vector Laboratories) es utilizado para la detección de proteínas. La localización de la enzima ligada se visualizó mediante $3,3$ -diaminobenzidina en H_2O_2 (DAB kit; Vector

Laboratories) y los cortes fueron teñidos con hematoxilina y deshidratados antes de ser montados.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de ambiente uterino (receptores endometriales de progesterona y estradiol), concentraciones séricas de estradiol y progesterona en el tiempo se utilizó Modelos Lineales Generales Mixtos (MLGM) R^2 para familias de datos normales con enlace identify para evidenciar el efecto de la variable independiente (Protocolos de sincronización para IATF), sobre las variables dependientes (cantidad de receptores para E2, cantidad de receptores para P4, niveles de estradiol, niveles de progesterona, diámetro de los cuerpos lúteos y tasa de preñez).

Las medias fueron ajustadas y comparadas por el test de LSD de Fisher con un alfa de 0,05 para determinar diferencias significativas. los datos fueron presentados en cuadros analizados con el software InfoStat en versión profesional (Di Rienzo *et al.*, 2021).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CANTIDAD DE RECEPTORES PARA ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN VAQUILLAS CRUZA CEBÚ

En lo que respecta a la cantidad de receptores para estradiol (Cuadro 4.1) no se encontró diferencias estadísticas entre grupos ($P>0,05$); J-Synch 7 d ($9,9 \pm 3,8$) J- Synch 6 d ($10,7 \pm 4,2$) y convencional ($9,5 \pm 3,7$), además la cantidad de receptores para progesterona fueron similares entre grupos ($P>0,05$); J-Synch 7 d ($12,9 \pm 3,3$) J- Synch 6 d ($12,7 \pm 2,2$) y convencional ($12,7 \pm 2,2$).

Si bien no hay diferencia significativa en la cantidad de receptores para estradiol y progesterona existe una cantidad de diferencia numérica, lo que puede estar relacionado a que no fueron muchas vaquillas muestreadas para receptores endometriales, por lo que habría que aumentar el número de unidades experimentales, con lo cual la investigación podría mejorar. Todo esto tomando en cuenta factores de suma importancia tales como: raza, clima, nutrición, condición corporal, estrés, evaluación previa mediante ecografía de la actividad ovárica, estricto control sanitario.

Cabe mencionar que el ambiente uterino juega un papel muy importante en la preñez, el cual se puede ver afectado por muchos de los factores descritos anteriormente, facilitando así al útero la probabilidad de perjudicar el desarrollo del embrión. Hay que destacar que la P4 es de suma importancia en la sobrevivencia del embrión ya que es la que produce la secreción suficiente del endometrio para un desarrollo favorable del mismo. Debemos tener en cuenta que en los receptores endometriales la preparación y acondicionamiento del útero en el momento de la sincronización va asociado a una cuestión de relación útero-fetal mas no a los niveles séricos de progesterona y estradiol.

Cuadro 4. 1. Cantidad de receptores para estradiol y progesterona en vaquillas cruza cebú.

Grupo	Cantidad de receptores para E2.	Cantidad de receptores para P4.
J-Synch 7 d	$9,9 \pm 3,8$	$12,9 \pm 3,3$
J- Synch 6 d	$10,7 \pm 4,2$	$12,7 \pm 2,2$
Convencional	$9,5 \pm 3,7$	$12,7 \pm 2,2$

Estos resultados son similares a los datos reportados por de la Mata (2018) que no encontró diferencia significativa en la cantidad de receptores para P4 entre los grupos Convencional y J-Synch ($9,6 \pm 0,7$ frente a $9,4 \pm 0,6$, respectivamente).

Mientras que Bosolasco *et al.* (2021) al administrar 0,5 mg de ECP en un protocolo basado en progesterona en vacas de carne anestrosas, encontró ($8,7 \pm 0,4$) de cantidad de receptores para estradiol, mientras que para cantidad de receptores para progesterona ($8,6 \pm 0,4$).

De igual forma Núñez *et al.* (2020) en su investigación no encontraron ningún efecto de los tratamientos (J-Synch 6 d; J-Synch 7 d) en la cantidad de los receptores de progesterona y estrógeno. Resultados similares a los reportados por, de la Mata *et al.* (2018) al no encontrar diferencias significativas para la cantidad de receptores para E2 para el convencional y J-Synch fue $8,9 \pm 0,2$ y $8,9 \pm 0,2$, respectivamente.

Mesquita *et al.* (2014) evidencia en la correlación positiva entre las concentraciones de estradiol durante el proestro y el estro, y la expresión del receptor alfa de estrógeno después de la ovulación. Mientras que Neirijnck y Papaioannou (2019) reportan que la expresión uterina aumentó en aquellas vacas que recibieron tratamiento con ECP, lo que sugiere una mejor respuesta del endometrio a la insulina. Por lo tanto, la mayor expresión de receptores para estradiol y progesterona sugiere que el tratamiento con ECP mejora el entorno uterino, lo que podría ser beneficioso para el crecimiento embrionario (Robinson *et al.*, 2000). Resultados no encontrados en esta investigación al obtener similar cantidad de receptores endometriales de progesterona y estradiol entre el tratamiento J-Synch y el tratamiento convencional con ECP.

Por otro lado, el estradiol durante el proestro y el estro participa en el control de los procesos fisiológicos que contribuyen al establecimiento del embarazo, incluido el efecto sobre las células foliculares, los ovocitos, el transporte de gametos y la preparación del entorno uterino (Pohler *et al.*, 2012). Por otro lado, la acción de la progesterona sobre el útero, que depende tanto de las concentraciones de progesterona como de la presencia y cantidad de sus receptores en el endometrio (Binelli *et al.*, 2019).

Además, las bajas concentraciones de estradiol circulante durante el período preovulatorio se han asociado con una alteración de la expresión génica del endometrio, particularmente en los receptores de estrógeno alfa y progesterona, lo que podría estar relacionado con bajas tasas de embarazo (Bridges *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la función uterina postovulatoria está influenciada por condiciones preovulatorias, y las concentraciones de estradiol parecen ser un factor clave para programar la función uterina durante el embarazo temprano (Binelli *et al.*, 2014).

4.2. NIVELES DE PROGESTERONA Y NIVELES DE ESTRADIOL

Como se observa en el cuadro 4.2 los grupos J-Synch 7 d ($7,0 \pm 1,2$) y J- Synch 6 d ($6,8 \pm 1,4$) presentaron mayores niveles de progesterona ($P < 0,05$) que el grupo Convencional ($5,0 \pm 1,5$). Además, mayores niveles de estradiol ($P < 0,05$) se encontró en los grupos J-Synch 7 d ($15,7 \pm 6,2$) y J- Synch 6 d ($15,0 \pm 5,7$) frente al grupo Convencional ($11,0 \pm 5,6$). Estos resultados obtenidos pueden estar atribuido a lo reportado por (Bridges *et al.*, 2013; de la Mata *et al.*, 2015) que la prolongación del proestro es un predictor constante de aumentar la tasa de preñez y se asocia con mayores concentraciones circulantes de estradiol antes de la ovulación y concentraciones de progesterona después de la ovulación.

En lo que respecta a los niveles hormonales, estos fueron mayores en los tratamientos con prolongación de proestro, esto puede estar atribuido a que en estos protocolos los folículos son de mayor tamaño, al igual que los cuerpos lúteos, y estos son mas competentes por lo cual terminan produciendo mayor cantidad de E2 y P4 respectivamente, favoreciendo el ambiente uterino para el embrión, lo que ayuda a que exista una mayor tasa de preñez en los protocolos J-Synch.

Cabe recalcar que a los protocolos de prolongación de proestro se los relaciona con una mayor tasa de crecimiento del folículo ovulatorio dominante lo cual mejora las tasas de preñez.

Cuadro 4. 2. Niveles de progesterona y niveles de estradiol.

Grupo	P ₄ (ng/mL)	E ₂ (pg/mL)
J-Synch 7 d	7,0 ± 1,2 ^a	15,7 ± 6,2 ^a
J- Synch 6 d	6,8 ± 1,4 ^a	15,0 ± 5,7 ^a
Convencional	5,0 ± 1,5 ^b	11,0 ± 5,6 ^b

^{ab} Los porcentajes difieren significativamente (P <0.05).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Ayala *et al.* (2017) que reportaron una concentración sanguínea media de P₄, en J-Synch 6 d (6,8 ng/mL), y a los obtenidos por Arteaga y Brochado (2016) que reportan que las concentraciones séricas de progesterona fueron superiores en los animales de los grupos con tratamiento J-Synch 6d y J-Synch 7d; en comparación con el grupo Convencional.

Asimismo, Ré (2018), reportó que la concentración promedio de P₄ fue mayor para los grupos que permiten un proestro prolongado (4,54 y 4,49 ng/mL; Co-Synch y J-Synch, respectivamente) respecto al grupo Convencional (proestro corto, 3,82 ng/ml). Además, Diskin *et al.* (2016) y Lonergan *et al.* (2016) reportan que la mayor concentración de P₄ durante la fase luteal temprana mejora la fertilidad, mientras que concentraciones bajas de P₄ están asociadas con menores tasas de preñez y mayores pérdidas embrionarias en el bovino

Además, mayores concentraciones de P₄ después de la extensión del proestro, sugieren un ambiente uterino más favorable que puede acelerar el crecimiento y la elongación del embrión (Menchaca *et al.*, 2015; Bó *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2018).

Bridges *et al.* (2013) reportan que la prolongación del proestro genera mayores concentraciones séricas circulantes de estradiol producido por el folículo dominante, favorece la madurez folicular y mejora la fertilidad. Perry *et al.* (2014) describieron que las vacas que manifiestan celo tienen un aumento significativo de las concentraciones de estradiol después de la aplicación de PGF₂α que el de las vacas que no manifiestan celo.

4.3. DIÁMETRO DE CUERPO LÚTEO Y TASA DE PREÑEZ

Como se observa en el cuadro 4.3 no se encontró diferencias estadísticas entre grupos para diámetro de cuerpo lúteo y de tasa de preñez ($P>0,05$), sin embargo, el grupo J-Synch 7 d, presentó un cuerpo lúteo de ($17,0 \pm 2,2$) y alcanzó una tasa de preñez del 60 %. Por lo que, Macmillan *et al.* (2020) argumenta que el protocolo J-synch puede ser utilizado tanto en vaquillas como en vacas, con un aumento y tendencia al aumento, en la tasa de preñez sin utilizar cipionato de estradiol.

Cuadro 4. 3. Diámetro de cuerpo lúteo y tasa de preñez

Grupo	Diámetro de CL	Tasa de preñez %
J-Synch 7 d	$17,0 \pm 2,2$	60,0
J- Synch 6 d	$16,5 \pm 2,6$	55,5
Convencional	$15,7 \pm 3,2$	45,0

Los resultados de esta investigación difieren a los datos reportados por de la Mata (2016), ya que la tasa de crecimiento folicular tendió a ser mayor ($P<0,01$) y el tamaño del cuerpo lúteo ($P<0,05$) en las que recibieron el tratamiento J-Synch 6 días.

Pero similares a los datos reportados por Ré (2018) que no encontró diferencias estadísticas ($P>0,05$) entre el grupo J-Synch 7d y convencional alcanzando una tasa de preñez promedio del 55 %. De la misma forma Gamboa (2020) no encontró diferencias para la tasa de preñez, reportando una tasa del 55 % para J-Synch 6 d, 35 % J-Synch 7 d y el 35 % para el tratamiento convencional.

Mientras que Yáñez *et al.* (2021) reportan que el cuerpo lúteo al día 7 post inseminación, difiriere significativamente entre los tratamientos ($P<0,05$) el tratamiento J-Synch 6 días demostró mayor diámetro de cuerpo lúteo ($25,0 \pm 0,2$ mm); además, que el porcentaje de preñez está significativamente afectado por el protocolo utilizado, el tamaño del folículo dominante y el tamaño del cuerpo lúteo.

de La Mata *et al.* (2015) reportan que el desarrollo luteal entre los días 4 y 13 posterior a la ovulación tendió a ser mayor ($P\leq 0.074$) en el grupo J-Synch

comparado con el protocolo convencional. Por otro lado (Vasconcelos *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2008; Mann, 2009) mencionan que el tamaño del cuerpo lúteo estaría relacionado con la mayor o menor concentración sérica de progesterona que afectaría la fertilidad.

Además, de la Mata *et al.* (2018), llegaron a la conclusión que extender el proestro (es decir, el protocolo J-Synch) mejora significativamente la tasa de preñez en vaquillas de carne; por lo tanto, esta mejora se relaciona con una mayor tasa de crecimiento del folículo ovulatorio dominante, resultados no observados en esta investigación, sin embargo, los grupos J-Synch generaron similares tasas de preñez que el grupo convencional con aplicación de ECP.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

El protocolo J-Synch normal y modificado genera similares cantidades de receptores endometriales para progesterona y estradiol presentes en el útero en vaquillas cruce cebú que el grupo convencional.

Los niveles hormonales fueron mayores en los tratamientos con prolongación de proestro.

El protocolo J-Synch normal y modificado genera similares diámetros de los cuerpos lúteos y tasa de preñez que el tratamiento convencional.

5.2. RECOMENDACIONES

Utilizar el tratamiento de sincronización con prolongación de proestro J-Synch para generar mayores niveles hormonales en vaquillas cruza cebú.

Estimar la cantidad de receptores endometriales de estradiol y progesterona en mayor número de vaquillas y diferentes razas tratadas con el protocolo J-Synch normal y modificado.

BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, U. (2006). Orchestration of gene expression and physiology by the circadian clock. *J Physiol Paris* 100: 243-251
- Arteaga, R y Brochado, C. (2016). *Tratamiento corto de 6 días (j-synch) para IATF en vaquillonas de carne: efecto sobre el folículo ovulatorio y el cuerpo lúteo*. (Tesis de pregrado). Biblioteca Digital Veterinaria Universidad de la República. <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2054/FV-32521.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ayala, L., Pesántez, L y Rodas, E. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Rev. prod. anim.*, 29 (2), 65-72.
- Bajaj, N., Sharma., N. (2011). Endocrine causes of early embryonic death: An overview. *Current research in dairy sciences*, 3: 1-24.
- Bó, G., Baruselli, P., Mapletoft, R.(2013). Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 10: 137-142.
- Bó, G and Baruselli, P. (2014). Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*, 8: 144-150.
- Bó, Tschopp, J., Cedeño, A., y Menchaca, A. (2015). Manejo de los horarios de inseminación en los programas de IATF. *Memorias del I Simposio de Reproducción México*. Guadalajara, pp.224-244.
- Bó, G., de la Mata, J., Baruselli, P., Menchaca, A. (2016). Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86:388-396.
- Bosolasco, D., Nuñez-Olivera, R., de Brun, V., Meikle, A., & Menchaca, A. (2021). Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrous beef cows. *Theriogenology*, 162, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.003>
- Binelli, M., Pugliesi, G., de Oliveira, E., Martins, T., Lopes, E., Sponchiado, M., Gonella-diaza, A., Oliveira, M., Rodríguez, M., de Oliveira, B., Piffero, B., Souza, M., Latorraca, L., Cuellar, F., (2019). Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte *Rev Bras Reprod Anim Belo Horiz* , 41, pp. 121 - 129
- Binelli, M., Pugliesi, G., Hoeck, G., Sponchiado, M., Ramos, R., Oliveira, M. (2014). The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow *Anim Reprod*, 11, pp. 246-253

- Bridges, G., Day, M., Geary, T., and Cruppe, L. (2013). Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *Journal of Animal Science* 91: 3002-3013.
- Bridges, G., Hesler, L., Grum, D., Mussard, M., Gasser, C., Day, M. (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843-51.
- Bridges, G., Mussard, M., Pate, J., Ott, T., Hansen, T. (2012). Day Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression *Anim Reprod Sci*, 133 pp. 16-26
- Busch, D. C., Atkins, J. A., Bader, J. F., Schafer, D. J., Patterson, D. J., Geary, T. W., and Smith, M. F. (2008). Effect of ovulatory follicle size and expression of estrus on progesterone secretion in beef cows. *Journal of animal science*, 86(3):553–563. <https://bit.ly/3iW7Wii>.
- Butler, H y Alberio, R., (2016). Mortalidad embrionaria en bovinos para carne. VIII Jornadas Taurus de Reproduccion Bovina. https://www.researchgate.net/publication/311450267_MORTALIDAD_EMBRIONARIA_EN_BOVINOS_PARA_CARNE_Es_posible_disminuirla
- Callejas, S. (2001). Fisiología del Ciclo Estral Bovino. En: Palma G, editor. *Biotechnology de la reproducción*. Buenos Aires (Argentina): Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.
- Canquil, L., Alarcón, M., y Zambrano, A. (2019). Incorporación del enfoque psicoeducativo a la gestión educativa en programas de acogimiento residencial haciendo uso de la Metodología Investigación Acción. *Educación*, 28(54), 27–44.: <https://doi.org/10.18800/educacion.201901.002>
- Chelmonska, A. (2002). Interferon Tau and Its Immunobiological Role in Ruminant Reproduction. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.50(1):47-52.
- Colazo, M. G., Mapletoft, R., Martinez, M., Kastelle, J. (2007). El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas. *Ciencia Veterinaria*, 9 (1), 4-15. <https://bit.ly/2DoGAAX>.
- de la Mata, J. (2016). Prolongación del proestro y reducción del periodo de inserción del dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne inseminadas a tiempo fijo. Previo a la obtención del grado Académico de Magister en Reproducción Bovina. Córdoba. Argentina. IRAC. <https://bit.ly/2zynMuL>.
- de la Mata, J., Bó, G. (2012). Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos de benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus* 55:17-23.

- de La Mata, J., Ré, M., and Bó, G. (2015). Combination of estrus detection and fixed-time artificial insemination in beef heifers following shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reproduction, fertility and development*, 27(1):96–97. Online: <https://bit.ly/3iWTgPZ>.
- de la Mata, J., Menchaca, A., Bó, G. (2015). Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas para carne. *Resúmenes del XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Pabellón Argentina, Córdoba*. Resúmenes pp 143-157.
- de la Mata J., Núñez R., Cuadro F., Bosolasco D., de Brun V., Meikle A., Bó G.A. and Menchaca A. (2018). Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 1541-1552. 2018, 30, 1541-1552. <https://doi.org/10.1071/RD17473>
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2019). *InfoStat versión 2019*. Grupo InfoStat, F.C.A., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Diskin, M., Walters, M., Parr, M. and Kenny, D. (2016). Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reprod. Fertil. Dev.* 28:83–93
- Gamboa, H. (2020). Evaluación de tres protocolos de sincronización para inseminación artificial a tiempo fijo en la respuesta reproductiva de vaquillas Senepol. (Tesis de posgrado). ESPAM MFL.
- Garrett, J., Geisert, R., Zavy, M., Morgan, G., (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.* 84:437–446.
- Gonella, A., Grajales, H., Hernández, A. (2010). Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Rev. MVZ Córdoba*, 15 (1), 1976-1984.
- Gray, C., Taylor, M., Ramsey, W., Hill, J., Bazer, F. W; Bartol, F. F; Spencer, T. E. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod.* 64: 1608-1613.
- Hasler, J. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415.
- Lonergan P., Forde N. and Spencer, T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 66–74.
- López, F. (2006). Relación entre condición corporal y eficiencia reproductiva en vacas holstein. *Ciencias Agropecuarias*. 4 (1).

- Mann, G. (2009). Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Animal reproduction science*, 115(1-4):296–299. Online: <https://bit.ly/3dnXqiC>.
- Mann G., Fray, M, Lamming, G. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal*: 500-503.
- Martínez, M., Kastelic J., Adams, G., Mapletoft, R. (2002). The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 80: 1746-1751.
- Macmillan, K., Gobikrushanth, M., Sanz, A., Bignell, D., Boender, G., Macrae, L., Mapletoft, R. J., & Colazo, M. G. (2020). Comparison of the effects of two shortened timed-AI protocols on pregnancy per AI in beef cattle. *Theriogenology*, 142, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.038>
- Menchaca A., Dutra S., Carrau J.M., Sapriza F., Salazar J., de la Mata J.J., Bo G.A. (2015). Melhoria da taxa de prenhez com o protocolo de 6 dias J-Synch em vacas receptoras de embriões produzidos in vitro. *SBTE* 291. (Abstract).
- Menchaca, A., Dutra S., Carrau, J., Sapriza, F., Bo, G. (2016). Improvements of the new J-Synch protocol used for fixed time embryo transfer (FTET) in beef cattle recipients transferred with in vitro produced embryos. *International Congress of Animal Reproduction (ICAR)*, Tours, Francia, P471.
- Menchaca, A., Núñez, R., García, C., y Cuadro, F. (2017). Efecto de la prolongación del proestro en la fertilidad de los programas de IATF. 12° Simposio de la Reproducción Animal. Córdoba: Universidad Nacional de Villa María.
- Mesquita, F., Pugliesi, G., Scolari, S., França, M., Ramos, R., Oliveira, M. (2014) Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, 81, pp. 861-86.
- Nakamura, T., Moriya, S., Inoue, T., Shimazoe, S., Watanabe, S., Ebihara., Shinohara, K. (2005). Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res* 82: 622-630.
- Neirijnck, Y., y Papaioannou, M. (2019). Nef The insulin/IGF system in mammalian sexual development and reproduction *Int J Mol Sci*, 20, p. 4440
- Núñez, R., Cuadro, B., Bosolasco, B., de Brun, B., de la Mata, J., Brochado, F., Meikle, B, Bó., G, y Menchaca, A. (2020). Efecto de la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG) y la longitud del proestro sobre la respuesta ovárica, la funcionalidad uterina y la tasa de preñez en vaquillas

inseminadas a una hora fija. *Revista Teriogenología* (151):16-17.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.031>

- Ochoa, R. (2013). *Evaluación de la inseminación artificial convencional y profunda, con la aplicación de prostaglandina en vaconas Holstein Friesian* (Tesis de maestría). Universidad de CUENCA. Consultado 31 may. 2019. disponible en <https://bit.ly/2W5F8by>.
- Ozturk, S., Demir, R. (2010). Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. *Histol Histopathol* 25: 1215-1228.
- Perry, G., Grant, J., Walker, J., Bridges, G., Kruse, S., Bird, S., Heaton, K., Arias, R. Lake, S. (2012). Comparison of three CIDR based fixed-time AI protocols for beef heifers. *J. Anim. Sci.* 90 (Suppl. 3): 237 (abstract).
- Perry G., Swanson L., Larimore L., Perry B., Djira G. (2014). Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 15-20.
- Pohler, K., Geary, T., Atkins, J., Perry, G., Jinks, E., Smith, M. (2012) Determinantes foliculares del establecimiento y mantenimiento del embarazo *Cell Tissue Res* , 349 págs. 649 - 664
- Ré, M. (2018). *Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas de leche*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Córdoba. <http://hdl.handle.net/11086/6733>
- Re, M., Curchod, G., Alessio, D., Caccia, M., de la Mata, J., Bó, G. (2015). Tratamientos que prolongan el proestro usando estradiol y progesterona en vaquillonas de leche. *Resúmenes XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina*, pp. 159-167.
- Ré, M., de la Mata, J., Bó, G., (2014). Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod. Fertil. Dev.* 26:118 (abstract).
- Robinson, R., Mann, G., Gadd, T., Lamming, G., Wathes, D. (2000). The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy *J Endocrinol*, 165, pp. 231-243.
- Rodríguez, A., y Pérez, A. (2017). Métodos científicos de indagación y de construcción del conocimiento. *Revista Escuela de Administración de Negocios*, 82, 10.
- Saldarriaga, F. (2009). Análisis comparativo entre inseminación artificial a tiempo fijo e inseminación artificial a celo detectado, con sus variables económicas y reproductivas. *Informe de Práctica Profesional*. Caldas, CO. p 10.

- Santos, J., Narciso, C., Rivera, F., Thatcher, W., Chebel, R. (2010). Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 2976-2988.
- Shaham, A., Folman, Y., Kaim, M., Rosenberg, M., Wolfenson, D. (2001). Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF_{2α} secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction* 122:643–648.
- Suárez, A. (2015). *Eficiencia de la inseminación artificial al primer servicio por la técnica transvaginal en hembras bovinas de la Hacienda el Prado.* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18363/1/Tesis%2032%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20350.pdf>
- Spencer, T., Burghardt, R., Johnson, G., Bazer, F. (2004) Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2004; 839: 537– 550.
- Vasconcelos, J., Sartori, R., Oliveira, H., Guenther, J., and Wiltbank, M. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56(2):307– 314. <https://bit.ly/34YE2VF>.
- Whittier, W., Currin, J., Schramm, H., Holland, S., Kasimanickam, R. (2013). Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. *Theriogenology* 80: 963 – 969.
- Yáñez, D., Barbona, I., López, J y Marini, P. (2021). Protocolo J-synch con y sin eCG en vacas Brown swiss y sus cruas con Bos indicus en la Amazonía ecuatoriana. *Revista ciencia de la vida*.5-6. <https://doi.org/10.17163/lgr.n33.2021.01>
- Yáñez, D., López, J., Moyano, J., Quinteros, R., y Marini, P. (2018). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas con proestro prolongado de 60 y 72 horas. *Revista Agronomía Mesoamericana*. 14(2): 363-373.

ANEXOS

Anexo 1. Selección de animales**Anexo 2. Toma de muestra****Anexo 3. Cepillo Citológico (Cytobrush)****Anexo 4. Muestra obtenida**

Anexo 5. Almacenamiento de muestra



Anexo 6. Muestras colectadas



Anexo 7. Medición del diámetro del cuerpo lúteo



Anexo 8. Muestras de sangre



Anexo 9. Monitoreo de preñez mediante ultrasonografía.

