



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC)
Escuela para Graduados

CONTROL DEL DESARROLLO FOLICULAR PARA LA OBTENCIÓN DE COCS POR ASPIRACIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA

Felipe Ledur Ongaratto

Tesis
Para Obtener el Grado Académico de
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba
(IRAC)

Córdoba, 2013



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC)
Escuela para Graduados

CONTROL DEL DESARROLLO FOLICULAR PARA LA OBTENCIÓN DE COCS POR ASPIRACIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA

Felipe Ledur Ongaratto

Comisión Asesora de Tesis

Director: Med. Vet. (Ph.D.) Gabriel Bó _____

Asesores: Dr. Med.Vet. Humberto Tríbulo (Codirector) _____

Biol. (Magister) Alicia Ledesma _____

Tribunal Examinador de Tesis

Biol. (Dra.) Mariana Caccia _____

Med. Vet. MSc, PhD. Maria Belen Rabaglino _____

Med. Vet. MS. Jorje A. Carcedo _____

Presentación formal académica

2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Gabriel Amilcar Bó por su apoyo como amigo y profesional, que me brindó su gran conocimiento e incentivo para desarrollar esta tesis, sin su ayuda, hubiera sido imposible su realización.

Agradezco al Dr. Humberto Tríbulo por su amistad y conocimiento, la cual me compartió durante todos estos años de estudio.

Agradezco al Dr. Ricardo Tríbulo por permitirme participar y hacer parte de muchas de las actividades que realicé y por brindarme su experiencia y conocimiento.

A los compañeros de trabajo Martín Ramos, Jahir Vicente Garzón, Andrés Tríbulo, Rodrigo Cuervo, Exequiel Barzola, José María Oviedo por permitirme trabajar con ellos y compartir muchos momentos gratificantes.

En especial a mi esposa Paula Rodríguez Villamil, sin la cual no podría haber hecho gran parte de mi tesis y por apoyarme en todos los momentos difíciles.

Agradezco a mi familia por apoyarme a seguir estudiando y por estar siempre presente en los momentos importantes.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi esposa Paula Rodriguez Villamil por ser mi compañera inseparable en estos años de estudio y ahora profesional, que me ha enseñado mucho de lo que sé y por acreditar en mi persona, siempre haciéndome dar un poco más de lo común. Sin ella mi formación personal y académica no sería lo mismo.

Dedico esta tesis también, a mis padres Carlos Alfredo Ongaratto y Vera Maria Ledur Ongaratto por brindarme su incondicional apoyo en la realización de mis estudios. Además por ser las personas que proporcionaron con su conocimiento, experiencia y amor para la formación de mi carácter.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de tratamientos de sincronización de la onda folicular y superestimulación sobre el número y calidad de COCs aspirados por ultrasonografía transvaginal (OPU) en vacas *Bos taurus* y cruce *Bos taurus* con *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*). En el experimento 1, vacas Brangus (n = 13) y Angus (n = 32) fueron distribuidas en 2 grupos. En el día 0, las donantes en el Grupo 1 recibieron 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) y 50 mg de progesterona (P4) por vía intramuscular (i.m.) y las donantes en el Grupo 2 (control) no recibieron ningún tratamiento hormonal. En el día 6 se realizó la OPU y clasificación de los COCs obtenidos. La media del número de folículos aspirados, COCs recuperados y COCs viables fue mayor en el grupo de vacas tratadas ($P < 0.05$) que en la no tratadas. En el experimento 2, vacas Brangus (n=15) y Angus (n = 15) fueron distribuidas en 4 grupos. Grupos 1 y 2 recibieron 2,5 mg de BE y 50 mg P4 i.m. en el Día 0 y los grupos 3 y 4 fueron sometidos a remoción del folículo dominante (DFR) el día 3. Todas las vacas recibieron prostaglandina F2 alpha (PGF) en el día 4 y aquellas en los Grupos 1 y 3 recibieron también 800 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) i.m., los Grupos 2 y 4 recibieron 160 mg FSH dos veces al día en dosis iguales durante 2 días. La OPU se realizó el día 7. No hubo diferencias significativas entre los métodos de sincronización, sin embargo las vacas estimuladas con FSH tuvieron un número mayor de COCs que las tratadas con eCG ($P < 0.05$). En el experimento 3, donantes Brangus (n = 10) y Angus (n=10) fueron distribuidas en dos grupos. En el día 0, todas las donantes fueron sometidas a una DFR y recibieron PGF. Además, las vacas en el Grupo 1 recibieron también un dispositivo con P4 (CIDR). En el día 1, todas las vacas recibieron

160 mg FSH dos veces al día durante 2 días y la OPU se llevó a cabo en el día 4. No hubo diferencias entre los grupos en el número y calidad de COCs obtenidos. En el experimento 4 fueron utilizadas vacas Angus (n=30), distribuidas aleatoriamente en tres grupos en un diseño cruzado. Todas las donantes fueron sometidas a DFR y recibieron 500 µg de PGF en el día 0. Las vacas del Grupo 1 recibieron 160 mg de FSH dividida en cuatro inyecciones i.m. dos veces al día (es decir, días 1 y 2); las del Grupo 2 recibieron 160 mg de FSH diluida en 4 ml de una solución al 0.5% de ácido Hialurónico (MAP-5) dada en una sola inyección i.m. en la nalga el día 1 y las del Grupo 3 fueron vacas sin ningún tratamiento de FSH. La OPU fue realizada en el día 4. El número total de folículos aspirados, COCs recuperados y COCs viables fueron mayores en los Grupos 1 y 2 en relación al Grupo 3 (P<0.05). En conclusión, los tratamientos de sincronización de la onda folicular y la superestimulación aumentan el número de folículos aspirados y COCs obtenidos por sesión de OPU en vacas Bos taurus y cruce Bos Taurus con Bos indicus (3/8 Bos indicus, 5/8 Bos taurus).

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of treatments of follicular wave synchronization and superstimulation on the number and quality of cumulus oocytes complex (COCs) retrieved per OPU session in *Bos taurus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*) cows. In Experiment 1, Brangus (n = 13) and Angus (n = 32) cows were divided into 2 groups in a crossover design. On day 0, the donors in Group 1 received 2.5 mg estradiol benzoate and 50 mg of progesterone by intramuscular (i.m.) administration, whereas donors in Group 2 (control) received no hormone treatment. The OPU was performed on day 6, and oocytes were classified. The mean number of follicles aspirated, the total number of oocytes retrieved and the number of viable oocytes was higher in the treated group ($P < 0.05$) than in the non treated group. In experiment 2, Brangus (n = 15) and Angus (n = 15) were allocated into four groups in a crossover design. Groups 1 and 2 received 2.5 mg of EB i.m. and 50 mg P4 on Day 0 and groups 3 and 4 were subjected to DFR on Day 3. All cows received PGF on Day 4 and those in groups 1 and 3 also received 800 IU of eCG i.m., Groups 2 and 4 received equal doses of 40 mg of FSH twice daily for 2 days (total dose = 160 mg). On day 7, OPU was performed and the oocytes were classified as in Experiment 1. There was no difference between the methods of synchronization, however more oocytes were obtained from FSH-stimulated cows than from those treated with eCG ($P < 0.05$). In Experiment 3, Brangus (n = 10) and Angus (n = 10) donors were stimulated by two treatments in a crossover design. On Day 0, all donors underwent DFR and received PGF and Group 1 also received a P4 intravaginal device (CIDR). On day 1, all cows received 160 mg FSH in equal doses twice daily for 2 days and OPU was performed on day 4. There were no differences between groups in the

number of oocytes obtained per OPU. In Experiment 4, Angus cows (n = 30) were allocated randomly into three groups in a crossover design. All donors were subjected to DFR and received 500 µg cloprostenol on day 0. The cows in Group 1 received 160 mg FSH divided into four twice-daily i.m. injections (i.e., days 1 and 2), cows in Group 2 received 160 mg FSH diluted in 4 ml of a 0.5 hyaluronan solution (MAP-5) and given by a single i.m. injection in the buttock on day 1. Cows in Group 3 were not treated with FSH. The OPU was performed on day 4. The number follicles aspirated, recovered oocytes and viable oocytes were higher in Groups 1 and 2 than in Group 3. In conclusion, follicular wave synchronization and superstimulation improved the the number and quality of COCs retrieved per OPU session in *Bos taurus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*) cows.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
Capítulo 1	1
INTRODUCCIÓN	1
DINAMICA FOLICULAR	3
ASPIRACIÓN FOLICULAR	8
TRATAMIENTOS HORMONALES EN DONANTES DE COCS ...	13
Sincronización de la emergencia de la onda folicular.....	14
Tratamientos superovulatórios.....	16
Tratamiento con progestágeno.....	

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Clasificación de los COCs según células del cumulus y citoplasma (Adaptado de Chaubal et al., 2006).....	32
Tabla 3.1. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas o no con BE+P4 cuatro días antes de la OPU. Efecto Tratamiento.....	35
Tabla 3.2. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas o no con BE+P4 cuatro días antes de la OPU. Efecto Tratamiento.....	36
Tabla 3.3. Numero (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto Tratamiento de sincronización de onda.....	37
Tabla 3.4. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto tratamiento superestimuladorio.....	37
Tabla 3.5. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto Raza.....	38
Tabla 3.6. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH con la inserción o no de un CIDR® durante el tratamiento realizado antes la OPU. Efecto Tratamiento....	39
Tabla 3.7. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH con la inserción o no de un CIDR durante el tratamiento realizado antes la OPU. Efecto Raza.....	39

Tabla 3.8. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables y blastocitos totales y Grado 1 producidos en donantes Angus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH en dosis múltiples, una sola inyección de FSH diluida en MAP 5 (50 MG) o no tratadas con FSH (Control) antes la OPU. Efecto Tratamiento..... 40

Tabla 3.9 Tamaño folicular (Medias \pm EE) en el día de la OPU de los animales estimulados con FSH en dosis múltiples, una sola inyección de FSH diluida en MAP 5 (50 MG) o no tratadas con FSH (Control) antes la OPU. Efecto Tratamiento..... 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Protocolo de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular (Experimento 1).....	24
Figura 2.2. Tratamientos de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular y estimulación con FSH o eCG (Experimento 2).....	25
Figura 2.3. Tratamientos de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular y estimulación con FSH con o sin un dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR) del Experimento 3.....	26
Figura 2.4. Protocolos de estimulación con múltiples dosis, dosis simples de FSH y sin estimulación con FSH (Experimento 4).....	27
Figura 2.5. Equipo de Aspiración.....	29
Figura 2.6. Aspiración folicular.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
BE	Benzoato de estradiol
BMP 15	Bone morphogenetic proteins 15 (proteína morfo genética ósea 15)
COC	Complejo cumulus ovocito
DFR	Dominant follicle remove (remoción del folículo dominante)
EGF	Epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidermal)
eCG	Gonadotrofina coriónica equina
FD	Folículo Dominante
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FSH	Hormona folículo estimulante
G6DPH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GDF 9	Growth differentiation factor-9 (Factor de crecimiento diferencial 9)
GFBP	Proteína ligante de IGF
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
IETS	Internacional Embryo Transfer
IGF	Insulin-like growth factor (Factor de crecimiento semejante a insulina)
KL-c	Kit Ligante c
LH	Hormona Luteinizante
mg	Miligramos
ml	Militros
MOET	Múltiples ovulaciones y transferencia de embriones
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero

OPU	Ovum Pick-Up (Aspiración Folicular Transvaginal)
PBS	Phosphate Buffered Solution (Solución Tamponada de Fosfato)
UI	Unidad internacional

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones junto con la técnica de obtención de ovocitos por aspiración folicular guiada por ultrasonografía, conocida mundialmente como OPU, son biotecnologías reproductivas que han tenido un avance significativo en los últimos 10 años (Stroud, 2011). Gracias a la optimización de los procesos, en especial, la obtención de ovocitos por medio de OPU, la producción *in vitro* ha avanzado considerablemente al permitir la obtención repetida de ovocitos de una donante de alto valor genético y el aumento significativo de su descendencia.

Desde hace más de una década la OPU ha sido la mejor opción para la recuperación de ovocitos *in vivo* en la especie bovina (Bols *et al.*, 2004). Varios procedimientos fueron propuestos antes de la aparición de la ecografía como laparoscopia transvaginal (Reichenbach, 2003) o laparotomía paralumbar (Lambert *et al.*, 1986), las cuales permitieron la obtención de ovocitos de animales vivos. Sin embargo, dentro de estas dos técnicas, la laparoscopia pasó a ser la más utilizada, ya que al ser un procedimiento quirúrgico menos cruento que la laparotomía, permitió no solo la recuperación de ovocitos en vaquillonas (Laurincík *et al.*, 1991), sino también en terneras con 3 semanas de edad (Armstrong *et al.*, 1994). No obstante, a pesar de las perspectivas promisorias de la técnica, varios autores han señalado sus limitaciones. Looney *et al.* (1994) señalaron el engorroso

trabajo de la técnica, además de la aparición de fibrosis y adherencias del ovario después del procedimiento. Por esta razón, Hinrichs *et al.* (1990) propusieron la recuperación de ovocitos mediante la técnica de colpotomía, en que la punción de los ovarios es posible a través de una incisión en la parte inferior del vestíbulo vaginal, pero en este caso existe el riesgo de peritonitis y evisceración a través de la incisión vaginal, lo que ha limitado la expansión de este procedimiento. Posteriormente, con la posibilidad del uso de la ultrasonografía, Callesen *et al.* (1987) reportaron por primera vez, el uso de esta técnica para la obtención de ovocitos bovinos, a través de la punción ovárica transcutánea en la región paralumbar. Un año más tarde, Pieterse *et al.* (1988) describieron la aspiración folicular transvaginal por ultrasonido, lo que posibilitó la utilización de ovocitos bovinos sin las limitaciones de los procedimientos existentes hasta el momento. De esta forma, la técnica demostró ser sencilla, adecuada y permitió la recuperación de ovocitos de forma repetida para la producción *in vitro* de embriones. Por otro lado posibilitó la producción de embriones en hembras preñadas ya que los ovarios mantienen su actividad durante la preñez (Ginther *et al.*, 1997). Además, cuando la técnica de la OPU es realizada adecuadamente, no hay riesgo de pérdida de preñez, consiguiendo ser realizada la aspiración folicular hasta el tercer mes de gestación (Bungartz *et al.*, 1995; Meintjes *et al.*, 1995).

Otra de las ventajas de la OPU es la posibilidad de poder producir embriones en situaciones de infertilidad extra-ovárica (Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1996), permitiendo la obtención de gametos viables que están presentes en vacas clasificadas como infértiles o en hembras con limitaciones reproductivas (Dawson *et al.* 1977). Sin embargo, su aplicación es más utilizada en hembras saludables, permitiendo

producir hasta cuatro veces más embriones que las técnicas tradicionales como la superovulación y colección de embriones convencional (Kruip *et al.*, 1994), aunque con mayor costo por embrión (Rodrigues y Garcia, 2000). No obstante, independiente de los alcances que ha tenido hasta hoy la técnica, las tasas de producción embrionaria han permanecido relativamente estáticas en la última década (Lonergan y Fair, 2008), motivo por el cual es importante evaluar otros factores más allá de la técnica, como la posibilidad de mejorar la calidad embrionaria y el desarrollo folicular a través de modificaciones hormonales que permitan generar poblaciones ovocitáreas más homogéneas y viables antes del momento de la aspiración (Merton *et al.*, 2003).

DINÁMICA FOLICULAR

El folículo ovárico es la unidad funcional del ovario y consiste en el ovocito y sus células somáticas asociadas. El pool de folículos en el ovario se compone principalmente de folículos primordiales, que contienen un ovocito retenido en la fase diplotena de la meiosis I, rodeados por una sola capa de células de pre-granulosa elongadas y una membrana basal (McGee y Hsueh, 2000).

Los folículos primordiales representan el pool de reserva de folículos quiescentes y son cerca de 90 – 95% de la población folicular que existe en los ovarios. El crecimiento folicular se da en un grupo de folículos, formando un pool. Es decir, que la activación de los folículos primordiales es caracterizada por el paso del pool de folículos quiescentes de reserva para el pool de folículos en la fase de crecimiento (Murphy, 2011). El primer

indicio de que el folículo empieza a crecer es el cambio de las células epiteliales que se vuelven cuboidales y el aumento del número de células por la mitosis, además los folículos pasan a ser llamados folículos primarios.

Los folículos primarios, se caracterizan por presentar el ovocito rodeado por una capa de células cuboides (Katska y Rynska, 1998). Con la proliferación de estas células pasan a ser formados los folículos secundarios, que son caracterizados por la presencia del ovocito rodeado por más de dos capas de células de la granulosa, por la presencia de la zona pelúcida y por empezar la formación de la teca (Katska y Rynska, 1998; Matos *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). Con el crecimiento folicular las células de la granulosa secretan un líquido que se acumula en los espacios intercelulares separando las células en dos poblaciones, murales y del cumulus, formando el antro folicular. Con el surgimiento de la cavidad antral el folículo pasa a ser llamado terciario o folículo de Graaf (Rajkovic, 2006). Los folículos terciarios son conformados por el ovocito rodeado por las células del cumulus, una cavidad conteniendo el líquido folicular, una membrana basal y dos capas de células de teca. El folículo de Graaf representa el estadio final de desarrollo folicular, presentando los componentes del folículo terciario y gran cantidad de líquido folicular.

El crecimiento de los folículos antrales es caracterizado por la presencia de ondas, que empiezan en distintos momentos del ciclo estral. En la fase pre-antral, predomina la regulación local, con una importante función activa del ovocito y la interacción con las células de granulosa por medio del factor de célula tronco o SCF (también conocido como kit-ligante: KL), y la proteína morfogenética ósea-15 (BPM-15 también conocida como GDF-9) (Buratini, 2007). Los péptidos intraováricos como el factor de crecimiento IGF-2,

las proteínas ligadoras IGFs y los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) por su parte, participan del mecanismo de control que determina el reclutamiento y selección de los folículos pre-antrales (Buratini, 2007).

El inicio del reclutamiento folicular de la fase antral está relacionado con el aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) (Hafez *et al.*, 2004, Adams *et al.*, 1992). El ovocito sigue su crecimiento desde la activación de los folículos pre-antrales hasta llegar a aproximadamente 3,0 mm de diámetro, después de este tamaño folicular no se observa crecimiento ovocitario (Caixeta *et al.*, 2009) y solamente el folículo crece hasta llegar al estado preovulatorio.

En las especies monovulares, todos los folículos antrales de una onda de crecimiento son semejantes y eso se da hasta el fenómeno llamado desviación (Ginter *et al.*, 2001), ya que en todas las ondas un folículo es seleccionado del pool que se está desarrollando, volviéndose dominante sobre los demás (Sirois *et al.*, 1988). Durante la fase antral, cuando los folículos llegan a aproximadamente 3 mm de diámetro se vuelven dependientes del soporte gonadotrófico (Buratini, 2007), siendo el pico de FSH el principal factor responsable del crecimiento de estos folículos hasta la desviación (Adams *et al.*, 1992). En los folículos antrales que comienzan a crecer en una onda folicular, los bajos niveles de LH circulante inducen en las células de la teca la expresión de 17 α -hydroxylase/C17-20-liase (CYP17), la síntesis de andrógenos y la expresión de lipoproteínas de baja densidad. De igual forma, el aumento en la producción de andrógenos provee el substrato para la aromatasa que es estimulado por la acción de la FSH sobre las

células de la granulosa, permitiendo a estas células que produzcan estrógeno (Dunn y Mayo, 2006).

Aparentemente, la supresión de la FSH es el factor responsable del mecanismo que provoca el cambio de las tasas de crecimiento entre el folículo dominante (FD) y los subordinados. El FD sigue creciendo debido al cambio de la dependencia de la FSH para LH y por la capacidad de responder a los bajos niveles de FSH circulantes (Xu *et al.*, 1995). Sin embargo, los folículos subordinados son FSH dependientes y, por lo tanto, sin la FSH empiezan el proceso de atresia. La FSH llega a niveles mínimos en el día de la desviación y se mantiene baja por los próximos 3 o 4 días, hasta que el folículo dominante deja de producir estrógeno e inhibina y permite el surgimiento de un nuevo aumento de FSH.

Algunos autores sostienen que antes que se dé la desviación, todos los folículos en crecimiento pueden transformarse en dominantes, lo que puede ser observado cuando es administrada FSH exógena en el inicio de la onda, estimulando muchos folículos para que alcancen el diámetro de folículos dominantes (Adams *et al.*, 1993), o cuando se punciona el folículo dominante (Ko *et al.*, 1991). Sin embargo, según Ginter *et al.* (1997), el folículo que se vuelve dominante es el folículo con mayor tamaño en el momento de la desviación. Los principales mecanismos celulares responsables por la desviación posiblemente implican alteraciones en la expresión de la enzima aromatasa (FSH/AMPC dependiente) y los cambios en la regulación de la transcripción de los receptores de LH en células de la granulosa y en las células de la teca, en el momento que el folículo dominante alcance los 8-9 mm de diámetro y se presente el aumento del IGF-1 libre a través de la lisis enzimática de la IGFBP 4 y 5. Por lo tanto, el primer folículo llega a una fase crítica donde los

receptores de LH en las células granulosas se expresan, pudiéndose así convertir en folículo dominante (Ginther *et al.*, 1996).

Para los bovinos, las concentraciones de LH son momentáneamente mayores en la desviación y existe un aumento en las diferencias de la expresión de mRNA de los receptores de LH de la granulosa en los dos folículos más grandes (Xu *et al.*, 1995). Esta diferencia se produce 8 h antes que se pueda observar una diferencia en el diámetro de los folículos (Beg *et al.*, 2001).

Al final del ciclo estral, los niveles de progesterona disminuyen gracias a la luteólisis y el folículo dominante expresa receptores de LH, después es expuesto a niveles crecientes de esta hormona, promoviendo el crecimiento hasta la ovulación. El pico preovulatorio de LH, debido a la masiva liberación de GnRH, induce la ovulación y la diferenciación de la teca y granulosa en células luteínicas, promoviendo la maduración final de los ovocitos (Dunn y Mayo, 2006), que llegan hasta metafase II al momento de la ovulación (Hafez *et al.*, 2004). Por el contrario, durante la fase luteal media, el folículo dominante de la primera onda se tornará atresico (folículo dominante no ovulatorio). Eso se da porque la progesterona presente en la fase luteínica es un potente inhibidor de la secreción pulsátil de LH, al modular las neuronas secretoras de GnRH (Herbinson, 2006). Se han descrito en la vaca ciclos estrales de 2, 3 o 4 ondas (Ginther *et al.*, 1996). Sin embargo, como ya se indicó anteriormente, aunque muchos folículos sean reclutados para que se desarrollen, generalmente solamente uno llega al estadio de Graaf y ovula (McGee y Hsueh, 2000).

ASPIRACIÓN FOLICULAR

La obtención de ovocitos guiada por ultrasonografía (normalmente abreviada por sus siglas en inglés OPU) ha sufrido innumerables modificaciones desde que se realizó con éxito por primera vez (Callesen *et al.*, 1987; Pieterse *et al.*, 1988). Las modificaciones se han realizado con la idea de optimizar la técnica y aumentar la tasa de recuperación de ovocitos viables por rutina.

Inicialmente la aspiración era hecha con agujas largas (55cm), producidas especialmente para la OPU (Pieterse *et al.*, 1991). Estos tipos de agujas representaban un alto costo y además por no ser desechables se desafilaban, disminuyendo la eficiencia en la recuperación de los ovocitos y causando lesiones en los ovarios y región periovárica. Así, Bols *et al.* (1997) demostraron la posibilidad de utilizar agujas hipodérmicas desechables de 18 y 19 Gauge (G) con 50 mm de largo. Los investigadores notaron que el largo del bisel de la aguja alteraba la tasa de recuperación de ovocitos. Se creía que las agujas con bisel más corto tendrían mejores tasas de recuperación, por la facilidad de ser introducidas en el folículo, pero por el contrario de lo esperado, las agujas con el bisel más largo presentaron una mejor recuperación y mejor calidad de los ovocitos, posiblemente porque al ser más filoso entra en el folículo con más precisión, no permitiendo que se pierda líquido folicular en el proceso (Manik *et al.*, 2003).

Otro punto que está estrechamente relacionado con la aguja utilizada es la presión de vacío (Bols *et al.*, 1996). Varios autores observaron que el uso de baja presión (50 mm Hg) presentaba poca eficiencia durante la aspiración, pero que presiones superiores a 120

mm Hg dañaban las capas de células del *cumulus oophorus*. Hay una gran variación entre los estudios existentes, con valores entre 40 a 400 mm Hg (Bols *et al.*, 1996). Sin embargo los resultados deben ser evaluados con detenimiento ya que todo el sistema (largo y grosor de las conexiones, alto del equipo de vacío, grosor de la aguja) puede influenciar la presión de vacío final. Para tener en cuenta la presión de vacío real, se vio que es mejor hacer el cálculo del volumen de agua/líquido aspirada por minuto. Aun así, existen variaciones desde 4,4 hasta 40 ml de agua/minuto entre sistemas (Pieterse *et al.*, 1988; Vos *et al.*, 1994; Bungartz *et al.*, 1995; Rick *et al.*, 1996). Actualmente se aconseja utilizar entre 10 y 20 ml de líquido por minuto, siendo aconsejada la rectificación de dicho volumen antes de cada procedimiento nuevo.

Las distintas fases de ciclo estral, incluso durante el periodo de la preñez, han sido estudiada para saber cuál es el mejor momento para la aspiración folicular. Visto que el ciclo estral de los bovinos se presenta generalmente en dos o tres ondas de crecimiento folicular (Ginther, 2000) o hasta cuatro y cinco ondas cuando se encuentra sobre efecto de progestágenos (Bols, 1997), se ha analizado la dinámica folicular con el fin de obtener un mayor aprovechamiento de los ovocitos por rutina.

Bols *et al.* (1997) observaron que los ovocitos presentaron distintos grados de capacidad de desarrollo según la fase del ciclo estral en que se encontraban al momento de la OPU. Fueron obtenidos más embriones después del cultivo de ovocitos recuperados entre los días 14 y 16 del ciclo estral según Machatkova *et al.* (1995). Sin embargo, utilizando ovarios de frigorífico, Smith *et al.* (1995) estudiaron la dominancia folicular, reportando que la producción *in vitro* de embriones no era afectada por la presencia o ausencia del

folículo dominante. Assey *et al.* (1994) por su parte, analizaron la ultraestructura de ovocitos de folículos dominantes y subordinados, observando degeneraciones prematuras del ovocito del folículo dominante, aunque Rhodes *et al.* (1997) no encontraron cambios en la capacidad de desarrollo en los ovocitos de folículos dominantes o subordinados. Estos hallazgos fueron confirmados con los resultados de Kruip *et al.* (1991) y Bungartz *et al.* (1995), los cuales demostraron que pueden ser obtenidos blastocistos viables independientemente de la fase reproductiva. Adicionalmente, Meintjes *et al.* (1995) constataron que vacas preñadas podrían ser sometidas a la técnica de OPU hasta el primer trimestre y Sauvé (1998) demostró que es posible hacerlo hasta el sexto mes de gestación, sin riesgo de pérdida de la preñez o daño a la vaca.

A pesar que los trabajos iniciales no encontraron influencia de la fase del desarrollo folicular sobre la calidad de los ovocitos, en estudios más recientes, Hendriksen *et al.* (2004) y Machatkova *et al.* (2004) demostraron que ovocitos obtenidos de folículos subordinados en la fase de dominancia tienen menos posibilidad de llegar al estadio de blastocisto que los ovocitos recuperados de folículos en la fase de crecimiento. Además el periodo de eliminación de todos los folículos que no fueron seleccionados como dominante tarda cerca de 1-2 semanas, consecuentemente cerca del 85% de los folículos presentes en el momento de la aspiración son atresicos (Kruip y Dieleman, 1982). La capacidad de desarrollo de los ovocitos es comprometida cuando los folículos se tornan atresicos, sin embargo la calidad es afectada en grados avanzados de atresia (Hagemann *et al.*, 1996). Además, está demostrado que estadios tempranos de atresia son benéficos en la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Kruip y Dieleman, 1982; Wurth y Kruip, 1992, Blondin *et al.*, 2002). En ese sentido Blondin *et al.* (2002) han propuesto que es beneficioso para la

competencia ovocitaria que los folículos pasen un periodo de aproximadamente 36 h privados de FSH antes de la OPU, concepto conocido con el nombre en inglés de “coasting” folicular.

Por otra parte no todas las vacas tienen la misma cantidad de folículos en los ovarios. En la especie bovina es sabido que la cantidad de folículos primordiales se desarrolla durante la vida fetal (Aerts y Bols, 2010) y tiene una fuerte correlación con el estadio nutricional de la madre, sobretodo en el primer tercio de la gestación (Evans *et al.*, 2010). Por lo tanto, vacas que sufrieron alguna restricción alimentaria durante la preñez, producen hijas con una población folicular menor comparado con hijas de vacas que no sufrieron ninguna deficiencia en la alimentación (Evans *et al.*, 2010). A los 110 días de la preñez, el número de folículos en los ovarios de los bovinos es de aproximadamente $2,7 \times 10^6$ (Bols *et al.*, 1997), disminuyendo hasta el día del nacimiento para 300.000 a 500.000 folículos pre-antrales, por medio de procesos degenerativos, apoptosis o atresias y la estimación es que solamente 0,1% de estos ovocitos llegan a ovulación (Gordon, 2003).

De acuerdo con Ireland *et al.* (2011), la cantidad de folículos en los ovarios varía considerablemente a través de la vida reproductiva de los bovinos. Por ejemplo, el número de folículos sanos y de los ovocitos en ovarios de las terneras recién nacidas oscila entre 10.000 y 350.000 en el nacimiento (Erickson, 1966) y de 1.920 a 40.960 en vaquillas de 12 meses de edad (Ireland *et al.*, 2008). Además, vacas al año de edad han perdido el 80% de su población original de ovocitos sanos (Erickson, 1966). Según Ireland *et al.* (2011) existen evidencias que vacas con un bajo conteo de folículos antrales, presentan varias características fenotípicas generalmente asociadas a infertilidad. El número de folículos

antrales esta positivamente correlacionado con el tamaño del ovario en animales adultos jóvenes y vacas con un bajo número de folículos antrales generalmente responden mal a la superovulación (Singh *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2011). Otra hipótesis que debe ser considerada es la renovación folicular, defendida por Johnson *et al.* (2004 y 2005). Sin embargo este nuevo concepto todavía debe ser investigado más a fondo, para una mejor comprensión.

El factor racial es otro factor que influencia el éxito de la OPU. Animales cebuinos (*Bos indicus*) presentan un mayor número de folículos reclutados por onda en comparación con las vacas *Bos taurus*. Esta observación ha sido reportada por diversos autores que igualmente observaron que la tasa de recuperación de ovocitos es superior en los animales cebuinos al ser comparados con animales taurinos, bajo los mismos protocolos (Dayan *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2009; Senatore *et al.*, 2010; Baruselli *et al.*, 2012).

Sorprendentemente, en un estudio reciente realizado por Silva-Santos *et al.* (2011), no fueron encontradas diferencias significativas en el número de folículos pre-antrales (primordiales, primarios o secundarios) en ovarios de fetos de vaquillonas *Bos taurus* o *Bos indicus*, sugiriendo que el número superior de folículos y rendimiento superior en programas OPU de animales cebuinos puede estar asociado a una tasa de atresia folicular inferior en los *Bos indicus* que en los *Bos taurus*. Estos trabajos están todavía en ejecución para confirmar esta hipótesis, no obstante el número de ovocitos reclutados por onda en una vaca cebuina es el doble del observado en una *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2012).

TRATAMIENTOS HORMONALES EN DONANTES DE OVOCITOS

La necesidad de aumentar la ganancia genética en el ganado bovino de carne y leche ha contribuido para el desarrollo de los programas de superovulación y colección de embriones *in vivo* (abreviada en inglés como MOET), así como los programas de producción de embriones *in vitro* (PIV). Actualmente, la OPU es un procedimiento estandarizado que permite la obtención de ovocitos en cualquier momento del ciclo estral. Sin embargo, con el objetivo de aumentar las tasas de recuperación y calidad embrionaria, ha sido necesario la modificación de protocolos hormonales a fin de obtener grupos ovocitarios más homogéneos y de mejor calidad en vacas *Bos taurus* que generalmente tienen pocos folículos (Merton *et al.*, 2003). La mayoría de los protocolos apuntan a sincronizar la emergencia de la onda folicular y a estimular el final del crecimiento folicular y tal vez inclusive favorecer la maduración de los ovocitos.

Existen diferentes factores que van a afectar la respuesta de una donante a los tratamientos hormonales como: el estado nutricional, la historia reproductiva, la edad, la estación del año, la raza, el estado ovárico al momento del tratamiento y los efectos de superestimulaciones repetidas, que pueden generar variaciones en los diferentes tratamientos hormonales (Adams *et al.*, 1992, 1993; Mapletoft *et al.*, 2002; Bó *et al.*, 2002).

Por otro lado, el uso generalizado de la ecografía y la fecundación *in vitro* en la última década ha permitido la evaluación morfológica de los folículos y ovocitos, sometidos a diferentes protocolos de tratamientos hormonales. Esta información ha sido

fundamental para redefinir los protocolos de tratamientos hormonales en un esfuerzo por mejorar los resultados generales de la superovulación y producción de embriones convencional (*in vivo*) y proporcionar una mejor atención de las vacas que no responden o responden poco. Los estudios recientes sobre la dinámica folicular han demostrado que la ecografía podría ser utilizada para evaluar el número de pequeños folículos antrales en los ovarios y predecir el número de folículos disponibles para la recuperación de ovocitos después de la estimulación hormonal (Bó *et al.*, 2004; Baracaldo *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2004).

Sincronización de la emergencia de la onda folicular

En un ciclo estral natural, el total del número de ovocitos está determinado por la dinámica folicular al momento de la aspiración. Además, se ha visto que los folículos pequeños contienen ovocitos que son más competentes en cuanto a su desarrollo que los folículos de mayor tamaño (Blondin *et al.*, 1995), y con tasas de recuperación mayores (Seneda *et al.*, 2001). Por lo tanto, la recuperación al comienzo de la onda folicular permitiría la recuperación de un mayor número de ovocitos, además de obtener una población mucho más homogénea al momento de la aspiración.

Sin embargo, estudios recientes mostraron que cuando vacas de razas taurinas son estimuladas con FSH, tienen una mejor producción embrionaria con los ovocitos provenientes de folículos entre 7 – 10 mm de diámetro (Blondin *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la sincronización de la onda folicular emergente puede ser hecha de forma mecánica a través de la ablación folicular (Bergfelt *et al.*, 1994) o

farmacológicamente a través de tratamientos hormonales con estradiol y progesterona, obteniendo respuestas superovulatorias similares (Bó *et al.*, 1995; Baracaldo, 2000). Además, se ha visto que la no presencia del folículo dominante en el inicio del tratamiento aumenta la respuesta superovulatoria (Adams, 1994; Mapletoft *et al.*, 2002), así como aumenta las tasas de ovocitos competentes para la producción de embriones *in vitro* (Hagemann *et al.*, 1999a,b).

Un procedimiento muy utilizado para el control de la onda folicular para la realización de OPU es la aspiración del folículo dominante (De Roover *et al.*, 2008), conocido como remoción del folículo dominante (DFR). El nombre de esta técnica no es el más correcto porque el folículo no es removido sino puncionado y es aspirado el líquido folicular. Existen varios autores que diferencian el tamaño del folículo dominante a ser aspirado entre $\geq 6\text{mm}$ (Barros *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2009) o $\geq 5\text{mm}$ (Bergfelt *et al.*, 1994; Hendriksen *et al.*, 2004), o los dos folículos de mayor tamaño presentes en el ovario sin importar el diámetro del mismo (Baracaldo *et al.*, 2000). Sin embargo todos acuerdan en que dicha ablación genera la aparición de una nueva onda folicular aproximadamente 1,5 días después.

Otro intento para aumentar la calidad y la homogeneidad de los ovocitos al inicio del tratamiento es la remoción de todos los folículos que están presentes en el ovario. Esto puede ser alcanzado realizando aspiraciones foliculares cada 2 o 3 días antes del inicio del tratamiento superestimulador. Hanenberg *et al.* (1997) demostraron que disminuyendo el intervalo de días entre cada aspiración, al comparar aspiraciones con 3 días de intervalo vs 7 días de intervalo, aumentó considerablemente el porcentaje de embriones obtenidos por

sesión de OPU (19.7% vs 13.5%, respectivamente) ($P < 0.05$). Esto puede ser debido a que después de algunas sesiones seguidas de OPU solamente los folículos en la fase de crecimiento estarán presentes, lo que ha demostrado que reduce el número de embriones infertilizados/no viables, y aumenta la proporción de ovocitos y embriones viables.

Tratamientos superovulatorios

El periodo de crecimiento folicular y de dominancia previa a la ovulación es crítica en el desarrollo potencial de los ovocitos (Blondin *et al.*, 1995). Además, se sabe que la estimulación ovárica previa a la aspiración folicular con gonadotrofinas permite un rápido crecimiento folicular y que los ovocitos completen su maduración final (Blondin *et al.*, 1997). Dentro de los fármacos superovulatorios utilizados para la producción *in vivo* de embriones podemos citar la gonadotrofina coriónica equina (eCG) en una única dosis (Boland *et al.*, 1991) o combinada con suero o anticuerpos anti-eCG (Dieleman *et al.*, 1987) y la hormona foliculo estimulante extraída de hipófisis de cerdos, ovinos o equinos (Donaldson, 1989). Se sabe que en algunas donantes que poseen un reducido número de folículos, el crecimiento folicular puede ser estimulado con combinaciones de FSH/LH y gonadotrofina coriónica equina (eCG) que son hormonas muy conocidas y utilizadas masivamente en protocolos clásicos de colecta y transferencia de embriones *in vivo* (TE; Mapletoft *et al.*, 2012). Sin embargo, alteraciones en la dosis, calendario de aplicaciones o momento de la aplicación del tratamiento, son muchas veces necesarios para alcanzar los objetivos de estimulación previos a la OPU, para generar una ganancia en la cantidad de folículos disponibles para la aspiración (de Roover *et al.*, 2008).

La respuesta superovulatoria es muy variable entre los animales. De Roover *et al.* (2005), trataron donantes con FSH y observaron una respuesta exacerbada para el número de folículos y de los complejos cumulus-ovocitos (COC's) recuperados en el 9% de las sesiones de OPU (59/665). Al contrario, una baja respuesta ocurrió en 9% de las sesiones (61/665). Por lo tanto, estos autores demostraron que el número de animales que no producen embriones puede ser menor que lo esperado en protocolos tradicionales de superovulación y TE, donde es esperado que un 10% de animales no respondan a la estimulación y un 20% no produzcan ningún embrión viable/transferible (Mapletoft *et al.*, 2002).

La respuesta a la superestimulación convencional es ideal cuando el tratamiento empieza junto con la emergencia de una nueva onda folicular (Nasser *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1994). Estudios muestran que el potencial de un animal para producir un número reducido o elevado de ovocitos es influenciado principalmente por el pool de folículos menores de 5 mm (Singh *et al.*, 2004; Durocher *et al.*, 2006; Ireland *et al.*, 2011). Los datos sugieren que diferentes animales no responden igual ante la misma dosis de FSH (Mapletoft *et al.*, 2002). Los animales con bajo conteo de folículos tienen la tendencia de producir folículos más grandes comparados con animales con mayor número de folículos (De Roover *et al.*, 2005).

La estimulación ovárica con el uso de gonadotrofinas ha sido reportada por diversos autores, con un aumento en la recuperación de ovocitos por OPU de hembras bovinas *Bos taurus* estimuladas en comparación con las que no recibieron estimulación (Pieterse *et al.* 1992; Looney *et al.* 1994; Stubbings y Walton 1995; Goodhand *et al.* 1999). Esto pudo ser

alcanzado utilizando distintos procedimientos con gran variación del periodo entre la última aplicación de FSH y la recolección de los ovocitos. Blondin *et al.* (1997) encontraron una mejor competencia ovocitaria cuando el período entre la última aplicación de FSH y la aspiración folicular fue de 48 h, proceso conocido internacionalmente como “coasting” folicular. Además, la estimulación del crecimiento del pool de folículos a un tamaño > 5 mm parece ser esencial. Esto sugiere que este periodo induce cambios en los COC's que se parecen a una atresia temprana y que se asemejan a los cambios que ocurren en la pre-maduración *in vivo*, es decir antes que ocurra el pico preovulatorio de LH. Bousquet *et al.* (1999) aplicaron este tratamiento comercialmente en vacas Holstein en Canada, con aspiraciones cada 2 semanas, reportando una media de 4,7 embriones por sesión de OPU, semejante al número obtenido por superovulación y lavado uterino convencional (MOET), que fue de 4,3 embriones.

Goodhand *et al.* (2000) también reportaron que la administración de FSH aumentó el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados Grado A, y un incremento en el número de embriones transferibles cuando eran utilizadas múltiples dosis de la hormona. Estos resultados muestran que el tratamiento con múltiples dosis de FSH antes de la aspiración mejora el número de folículos disponibles para aspiración y el número y la calidad de ovocitos recuperados y embriones producidos (Goodhand *et al.*, 2000). Goodhand *et al.* (1999) igualmente reportaron un aumento en la tasa de producción de embriones del 22% al 39% (embriones por COCs procesados) después de 3 días de dosis decrecientes de FSH. Por su parte, Merton *et al.* (2003) encontraron un efecto positivo en la estimulación ovarica con FSH antes de la OPU en la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Blondin *et al.* (1997) reportaron variación en la calidad de los ovocitos según el

tiempo entre la última aplicación de FSH y la aspiración, con el mejor porcentaje de ovocitos competentes cuando se extendió el periodo de “coasting” a 48h.

Por otro lado, Sendag *et al.* (2008) compararon el uso de la eCG y FSH en protocolos de estimulación folicular previos a la OPU y encontraron que ambas hormonas aumentaron el número de folículos disponibles para la aspiración, con ventaja para los animales tratados con FSH con relación a los tratados con eCG. La principal diferencia observada fue que en el número de ovocitos Grado A recuperados fue menor con la eCG, además algunos animales no respondieron al eCG. La FSH afectó positivamente la calidad de los COCs recuperados en el día de la OPU, con un pool de folículos de mejor calidad para la aspiración en comparación al grupo no estimulado (control).

Tratamiento con progestágenos

La progesterona (P4) es una hormona esteroide producida principalmente por el cuerpo lúteo y la placenta. La progesterona producida por la placenta es liberada en la circulación materna y está relacionada con muchas funciones en la gestación, como el mantenimiento estructural y funcional del útero, estableciendo un ambiente propicio para el desarrollo embrionario y favoreciendo el crecimiento de la glándula mamaria (Hadley, 1996). La progesterona luteal está involucrada en la regulación del desarrollo folicular, causando atresia cuando está asociada con estradiol, por la inhibición de la secreción de gonadotrofinas (Bó *et al.*, 1995) y hay una relación inversa entre los niveles sanguíneos de progesterona y la frecuencia de los pulsos de LH. Es decir, concentraciones bajas de progesterona resultan en una alta pulsatilidad de LH de baja amplitud que estimulan el crecimiento y maduración final del folículo dominante (Stock y Fortune, 1993). Por el

contrario altos niveles de progesterona causan una baja pulsatilidad de LH (y de gran amplitud) que inducen la regresión del folículo dominante.

Pfeifer *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la progesterona en el número de folículos aspirados y ovocitos recuperados, así como el número de embriones producidos en donantes *Bos Indicus*, sugiriendo que la progesterona puede tener una importante función en el desarrollo folicular y en la maduración del ovocito. En ese trabajo tanto la muy alta como la muy baja concentración de progesterona afectó negativamente la producción de embriones *in vitro* y se lo asoció a una menor cantidad de folículos (con progesterona alta) o una menor calidad de los ovocitos (con progesterona muy baja). Esta noción ha sido recientemente confirmada por los estudios de Nasser *et al.* (2011) y Rivera *et al.* (2011) en que la adición de progesterona mediante un CIDR aumento la calidad de embriones producidos *in vivo* en vacas superovuladas durante la primera onda folicular, concordando también con lo sugerido por Fair y Lonergan (2012) y Wiltbank *et al.* (2012). Sin embargo, Chaubal *et al.* (2007) no observaron estos efectos positivos con el uso de la progesterona para la estimulación del crecimiento y reclutamiento folicular previos a la OPU y producción *in vitro* de embriones.

HIPÓTESIS GENERAL

Los tratamientos de sincronización de la onda folicular y la superestimulación aumentan el número y mejoran la calidad de los ovocitos aspirados por sesión de OPU en donantes *Bos taurus* y cruce *Bos taurus* con *Bos indicus*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tratamientos de sincronización de la onda folicular y superestimulación sobre el número y calidad de ovocitos aspirados por sesión de OPU en vacas *Bos taurus* y cruce *Bos taurus* con *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la sincronización de la onda folicular con benzoato de estradiol (BE) y progesterona (P4) sobre la cantidad y calidad de ovocitos aspirados por OPU (Experimento 1).
- Comparar el efecto de la sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular utilizando la remoción del folículo dominante (DFR) con la del tratamiento con BE y P4 sobre la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos por OPU (Experimento 2).
- Comparar la efectividad del tratamiento superestimulatório con eCG o con FSH para aumentar el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por OPU (Experimento 2).

- Evaluar el efecto de la inserción de un dispositivo intravaginal con progesterona durante el tratamiento superestimulatório sobre el número y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU (Experimento 3).
- Evaluar la tasa de recuperación de ovocitos y la producción in-vitro de embriones en donantes superestimuladas con FSH administrada en dos inyecciones diarias o diluída en un polímero de liberación lenta (MAP 5; 5 mg/ml, Bioniche Animal Health, Canada) y administrada mediante una inyección única (Experimento 4).

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

EXPERIMENTO 1

Para este experimento se utilizaron vacas Brangus (n = 13) y Angus (n = 32), ciclando, multíparas, con un peso de 400 a 550 kg y condición corporal entre 2,5 a 3,5 (Escala del 1 al 5), siendo distribuidas aleatoriamente en dos diferentes grupos de tratamiento. Para disminuir la influencia de la variación individual sobre los resultados del experimento, todas las vacas fueron tratadas dos veces, de forma que todas recibieron ambos tratamientos, y los dos tratamientos estuvieron representados equitativamente en cada replica. En el Día 0, las donantes en el Grupo 1 recibieron 2,5 mg de BE (Benzoato, Laboratorio Zoovet, Santa Fe, Argentina) y 50 mg de P4 (Progesterona, Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) por vía intramuscular (i.m.). Las donantes en el Grupo 2 (Control) no recibieron ningún tratamiento hormonal. En el Día 6, se realizó la OPU mediante aspiración folicular guiada por ecografía y los COCs se clasificaron según su apariencia citoplasmática y número de células del cumulus según lo descrito por Chaubal *et al.* (2006).

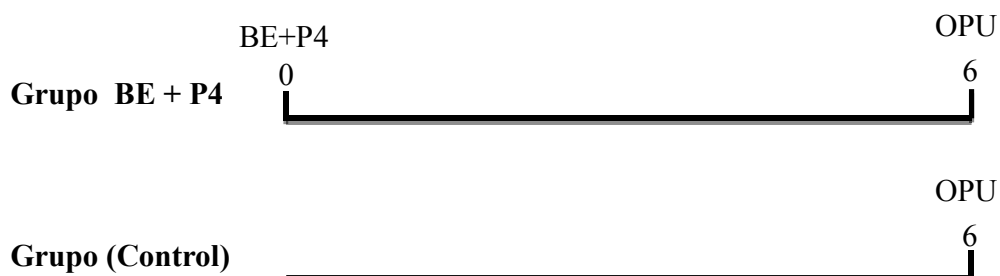


Figura 2.1. Protocolo de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular (Experimento 1).

EXPERIMENTO 2

Para este experimento se utilizaron vacas Brangus ($n = 16$) y Angus ($n = 16$), ciclando, multíparas, con un peso de 400 a 550 kg y condición corporal entre 2,5 a 3,5 (Escala del 1 al 5), siendo distribuidas aleatoriamente en cuatro diferentes grupos de tratamiento, en un diseño 2 x 2 factorial. Para disminuir la influencia de la variación individual sobre los resultados del experimento, todas las vacas fueron tratadas cuatro veces, de forma que todas recibieron todos los tratamientos y los cuatro tratamientos estuvieron representados equitativamente en cada replica. Las donantes pertenecientes a los Grupos 1 y 2 recibieron 2,5 mg de BE y 50 mg P4 i.m. en el Día 0, mientras que las donantes en los Grupos 3 y 4 fueron sometidas a la remoción del folículo dominante (DFR) el Día 3. El DFR fue realizado mediante la aspiración todos los folículos > 6 mm de diámetro (Barros *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2009). Todas las vacas recibieron 500 μ g cloprostenol (PGF, Ciclase, Syntex SA, Argentina) en el Día 4 para disminuir el efecto de la presencia del CL sobre la eficiencia en la aspiración folicular (Rodríguez *et al.*, 2010), y

aquellas en los Grupos 1 y 3 recibieron también 800 UI de eCG (Novormon 5000, Syntex SA) i.m., mientras que las donantes en los Grupos 2 y 4 recibieron 160 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (BionicheAnimal Health, Belleville, ON, Canadá) en dosis iguales cada 12 h durante 2 días (es decir, Días 4 y 5). En el Día 7, se llevó a cabo la OPU y los COCs fueron clasificados como en el Experimento 1

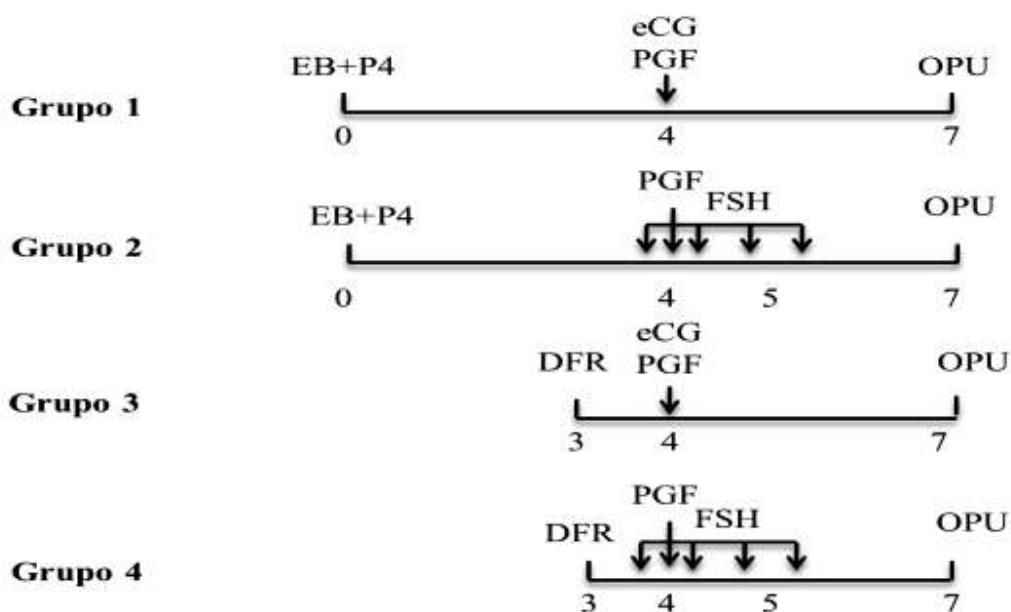


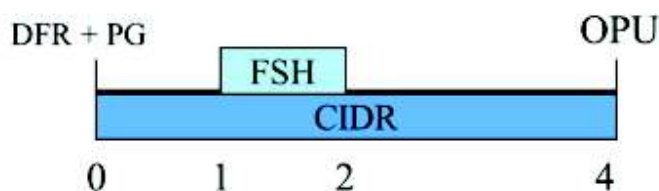
Figura 2.2. Tratamientos de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular y estimulación con FSH o eCG (Experimento 2).

EXPERIMENTO 3

Para este experimento se utilizaron vacas Brangus (n = 16) y Angus (n = 16), ciclando, multíparas, con un peso de 400 a 550 kg y condición corporal entre 2,5 a 3,5 (Escala del 1 al 5), siendo distribuidas aleatoriamente en dos diferentes grupos. Para disminuir la influencia de la variación individual sobre los resultados del experimento,

todas las vacas fueron tratadas dos veces, de forma que todas recibieron todos los tratamientos y los dos tratamientos estuvieron representados equitativamente en cada replica. En el Día 0, todas las donantes fueron sometidas a DFR y recibieron PGF. Adicionalmente las del Grupo 1 recibieron un dispositivo CIDR con 1,9g de P4 (CIDR-B, Pfizer Sanidad Animal, Argentina) el mismo día. En el Día 1, todas las vacas recibieron 160 mg Folltropin-V en dosis iguales dos veces al día durante 2 días, siendo realizada la OPU en el Día 4.

Grupo 1:



Grupo 2:

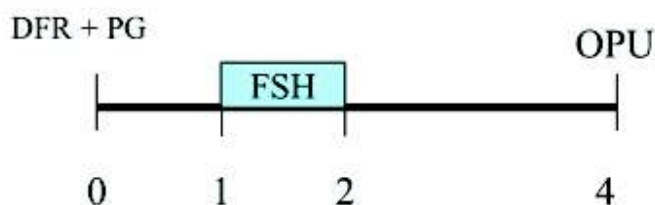


Figura 2.3. Tratamientos de sincronización del desarrollo de una nueva onda folicular y estimulación con FSH con o sin un dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR) del Experimento 3.

EXPERIMENTO 4

Para este experimento se utilizaron vacas Angus ($n = 31$), ciclando, multíparas, con un peso de 450 a 550 kg y condición corporal entre 3 a 3,5 (Escala del 1 al 5), siendo

distribuidas aleatoriamente en tres diferentes grupos. Para disminuir la influencia de la variación individual sobre los resultados del experimento, todas las vacas fueron tratadas tres veces, de forma que todas recibieron todos los tratamientos y los tres tratamientos estuvieron representados equitativamente en cada replica. Todas las donantes fueron sometidas a DFR y recibieron PGF en el Día 0 y fueron tratadas de la siguiente manera:

Grupo 1 (FSH múltiple): 160 mg de Folltropin-V dividida en cuatro inyecciones i.m. cada 12 h por dos días (es decir, días 1 y 2); Grupo 2 (FSH simple): 160 mg de Folltropin-V diluidos en 4 ml de una solución al 0,5% de hialuronato de sodio (MAP-5 (50 MG)[®] 5 mg/ml, Bioniche Animal Health) y dada por una sola inyección i.m. en la nalga el día 1 y Grupo 3 (Control): vacas sin ningún tratamiento de FSH. La OPU fue realizada en el Día 4.

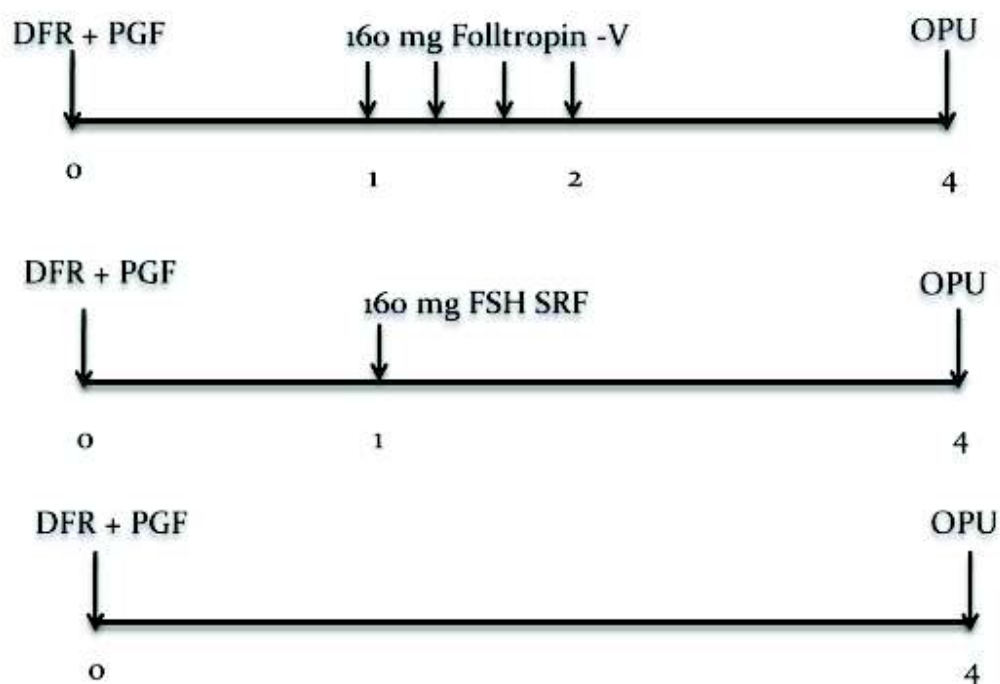


Figura 2.4. Protocolos de estimulación con múltiples dosis, dosis simples de FSH y sin estimulación con FSH (Experimento 4).

OBTENCIÓN DE OVOCITOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA (OPU).

Las donantes fueron restringidas en un brete y aplicado 7-9 ml de anestesia epidural (lidocaína 2%, Laboratorio Vetue, Argentina). Se retiró manualmente la materia fecal del recto y posteriormente se lavó la vulva y región peri-rectal con una solución de amonio cuaternario al 0,4% (Bagodryl, Biogenesis-Bago, Argentina). Se utilizó un equipo de ultrasonido Chison 600Vet (Chison Medical Imaging Co., China) equipado con un transductor de 5 MHz micro-convexo y una guía de teflón utilizada para procedimientos de OPU WTA (WTA, Cravinhos, Brasil). Se utilizó una aguja descartable 18G (40:12; Terumo, Brasil) para la punción y aspiración de los ovocitos la cual fue conectada a un tubo siliconado que pasó a través de la guía a lo largo del mango de teflón del transductor. Una vez armada la guía, esta era protegida por una funda plástica desechable (WTA, Brasil) para evitar la contaminación de la guía y de las vacas durante el procedimiento. Tanto la funda plástica como la aguja fueron remplazadas entre vaca y vaca durante la OPU.

Para realizar la OPU, se introdujo la guía en la vagina hasta el fondo de saco a dorsal del cérvix. Después de fijar el ovario contra el transductor por manipulación a través del recto, la aguja era avanzada para perforar la pared vaginal y penetrar en el folículo ovárico. Al momento de penetrar el ovario se aplicó vacío proporcionado por la bomba de aspiración (WTA, Cravinhos, Brasil) de manera que los ovocitos y líquido folicular eran aspirados por la vía siliconada y almacenados en el tubo de recolección (tubo cónico de 50 ml Falcon BD, EE.UU). La presión utilizada para la generación de vacío fue de 60-70 mm Hg, generando un flujo de fluido de 10-15 ml/min. Los COCs fueron recogidos en PBS con

pluronato de sodio como surfactante (PICTOR-GEN, Biogen Argentina SA, Córdoba, Argentina), suplementado con heparina (10 UI/mL) y mantenidos en el cono de colección a 37°C hasta su búsqueda.

Inmediatamente después de la aspiración, se volcó el contenido del tubo colector en un filtro de embriones con una malla de 50 μ (Millipore, Brasil) y luego se lavó el filtro con PBS y su contenido depositado sobre una placa de Petri plástica estéril (Falcon BD, EE.UU.) para facilitar la localización de los ovocitos bajo un estéreomicroscopio (Nikon, Japon).



Figura 2.5. Equipo de Aspiración.



Figura 2.6. Aspiración folicular.

CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS

El objetivo principal de la clasificación de los ovocitos es poder identificar los ovocitos con mayor capacidad de desarrollo, que permitan la producción no solo de blastocistos sino que tengan la suficiente capacidad de competencia para producir gestaciones y nacimientos bovinos.

La selección de ovocitos para maduración generalmente se basa en la evaluación morfológica visual de las estructuras, teniendo en cuenta la calidad del citoplasma y de las células del cumulus. La calidad de las células del cumulus está asociada con altas tasas de maduración, y a su vez, con tasas mayores de fertilización y de clivaje, así como con porcentajes más altos de blastocistos (Khurana y Niemann, 2000).

Sin embargo, debido a que no todos los ovocitos colectados tienen la misma apariencia ni el mismo potencial de desarrollar embriones viables cuando sometidos a los procesos *in vitro* (Hahn, 1984), es necesaria la selección y clasificación de los ovocitos para el proceso de maduración. El potencial de desarrollo de los ovocitos está dado por sus características morfológicas. Para los experimentos de esta tesis se utilizó la clasificación descrita por Chaubal *et al.* 2006, siendo la clasificación de la siguiente manera (Tabla 2.7):

COCs Tipo A: Tienen un gran potencial de desarrollo embrionario, cubiertos por 4 o más capas de células del cumulus (Hasler *et al.*, 1995), o más de 6 capas de células del cúmulus adheridas a la zona pelúcida (Hamano y Kuwayama, 1993), ooplasma oscuro, finamente granuloso y homogéneo (Moyo *et al.*, 1995).

COCs Tipo B: Poseen de hasta 3 capas de células del cúmulus (Hamano y Kuwayama, 1993), con ooplasma totalmente granulado y oscuro (Moyo *et al*, 1995), el 40% de éstos comienzan el clivaje después de la fertilización, el 8% desarrollan embriones (Hasler *et al.*, 1995).

COCs Tipo C: según Hamano y Kuwayama (1993) poseen 1 o 2 capas de células del cúmulus y citoplasma granulado irregularmente y vacuolado. El 38% de este tipo de oocitos desarrolla clivaje y <1% se desarrolla hasta blastocisto (Hasler *et al.*, 1995);

COCs Tipo D: Son aquellos oocitos desnudos sin ninguna capa de células del cumulus, con citoplasma homogéneos y en algunos casos con presencia de vacuolas. (Hamano y Kuwayama, 1993).

COCs Tipo E: Son aquellos oocitos con presencia de una o varias capas de células del cumulus expandidas, con citoplasma irregular con presencia de granulos y vacuolados. Oocitos con proceso de degeneración.

Tabla 2.1 Clasificación de los COCs según células del *cumulus* y citoplasma (Adaptado de Chaubal *et al.*, 2006).

Clasificación	Grado	Células del cumulus	Citoplasma
Excelente	A	> 3 capas	Homogéneo y denso
Bueno	B	<3 capas	Homogéneo no tan denso
	C	1 capa o parcialmente desnudo	Homogéneo, denso finamente granuloso
Regular	D	Desnudo	Homogéneo no tan denso, gránulos mayores y oscuros
Malo	E	Expandido, degenerado	Heterogéneo, citoplasma descolorido, con gránulos oscuros, áreas claras

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

Para la producción de los embriones *in vitro* en el Experimento 4 los complejos cúmulos-ovocitos (COCs) fueron recuperados por medio de OPU según como se describió anteriormente, de folículos con diámetros entre 3 a 12 mm. Los COCs obtenidos en la placa de búsqueda fueron recuperados, lavados y trasladados a un medio de manutención TCM-199 suplementado con 2,381 mM NaHCO₃ y 0,2 mM piruvato de sodio, 50 ug de Gentamicina y 1 mg de BSA, para así ser evaluados y seleccionados según lo descrito anteriormente. Se consideraron como viables solo los ovocitos tipo A, B o C, según la descripción anterior, con citoplasma homogéneo y aspecto esférico.

Para la obtención de embriones, los COCs fueron lavados en el medio TCM-199 y transferidos en gotas (máx. 30-50 COCs), en placas de cultivo de 4 pozos NUNC (Nunc, Dinamarca), las cuales contenían 500µL de medio/pozo, para así ser madurados de manera *in vitro* por un periodo entre 18 a 24 h a 38.8°C, bajo atmósfera controlada y 5 % de CO₂. El medio utilizado para la maduración fue el medio TCM-199 (Sigma, USA),

suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Natocor, Argentina), 0,2 mM de piruvato de sodio, 35 mg/ml de FSH porcina (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 15 mg/ml de LH (Lutropin; Bioniche Animal Health) y antibioticos. Posteriormente, los COCs fueron lavados y trasladados a un medio de fertilización FERT-TALP. Para la fertilización de los COCs fue utilizado semen convencional de toros con fertilidad comprobada. Una pajueta de 0,5 mL de semen fue utilizada de rutina, siendo descongelada a 37°C por 60 segundos en baño maria. Para su selección y capacitación fue utilizado un sistema de gradientes de partículas de sílica (Isolate[®], Irving Scientific). Una vez que el semen era descongelado se depositaba en la parte superior de los gradientes para así ser centrifugados a una velocidad de 2500 rpm por 15 min. El pellet resultado de esta centrifugación era re diluido en 1 mL de medio de fertilización FERT-TALP y nuevamente centrifugado a 2500 rpm por 5 min, para retirar el polímero. Con este segundo pellet se realizaba el conteo de la concentración espermática final y se re diluyó, para poder utilizar la muestra en una concentración final de 1×10^6 de spz/mL, sobre cada gota de cultivo (500 μ L) que contenía los COCs (30-50 COCs/gota). Después de 20 h, los cigotos ya formados eran desnudados por medio de vortex, lavados y colocados en medio cultivo (SOFaa) en grupos de 20 ovocitos/gota, en gotas de 500 μ L, cubierto por aceite mineral a 38.8°C, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ y máximo porcentaje de humedad. Los embriones fueron observados al día 2 y 7 para determinar el porcentaje de clivaje y de blastocistos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los estudios fueron realizados con diseños cruzados (cross-over), donde todas las vacas recibieron todos los tratamientos para tratar de disminuir el efecto de la variabilidad de población folicular entre los animales sobre los resultados. El número de folículos aspirados, el número de COCs recuperados, el número de ovocitos viables (Experimentos 1, 2, 3 y 4) y la cantidad de blastocitos obtenidos en el Experimento 4 fueron analizados por ANOVA para modelos mixtos y utilizando el/los tratamiento/s y la raza como variables fijas y la vaca (ID) como variable aleatoria. Se utilizó el software Infostat 1.0 ® (Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, 2010).

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Los resultados de este experimento están indicados en la Tabla 3.1. El número medio de folículos aspirados y el número total de COCs aspirados fueron mayores en las vacas tratadas con BE y P4 cuatro días antes de la OPU que en las del Grupo Control ($P<0,05$). Del mismo modo, el número de ovocitos viables también fue superior ($P<0,05$) en las vacas tratadas con BE y P4 que en las del Grupo Control. Hubo un efecto raza significativo ($P<0,05$) que se muestra en la Tabla 3.2, en el que las vacas Brangus tuvieron mayor número de folículos disponibles para la punción, mayor número de COCs recuperados y viables ($P<0,05$) y hubo interacción entre tratamientos y razas ($P<0,05$).

Tabla 3.1. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas o no con BE+P4 cuatro días antes de la OPU. Efecto Tratamiento.

Grupo	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
1- BE+P4	44	12,9 \pm 1,1 ^b	7,9 \pm 1,3 ^b	5,2 \pm 0,9 ^b
2 - Control	47	7,3 \pm 0,7 ^a	3,2 \pm 0,5 ^a	2,1 \pm 0,4 ^a

^{a,b} Medias dentro de la misma columna con letras distintas difieren significativamente ($P<0.05$)

Tabla 3.2. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas o no con BE+P4 cuatro días antes de la OPU. Efecto raza.

Raza	Grupo	n	Total de Folículos	Total de Ovocitos	Ovocitos Viables
A.Angus	BE+P4	29	11,5 \pm 0,7 ^b	6,5 \pm 0,9 ^b	3,7 \pm 0,5 ^b
	Control	36	7,6 \pm 0,6 ^a	3,1 \pm 0,4 ^a	2,1 \pm 0,4 ^a
Brangus	BE+P4	15	18,5 \pm 1,4 ^c	13,1 \pm 1,4 ^c	9,1 \pm 1,2 ^c
	Control	11	10,5 \pm 1,6 ^{ab}	5,6 \pm 1,4 ^{ab}	3,2 \pm 1,0 ^{ab}

^{a,b,c} Medias dentro de la misma columna difieren significativamente (P<0,05)

EXPERIMENTO 2

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3.3, 3.4 y 3.5. No hubo diferencias significativas (P=0,4) entre los tratamientos de sincronización de la onda folicular (DFR vs BE + P4) en el número total de folículos aspirados, número de COC's recuperados y el número de COC's viables. Sin embargo, todos los parámetros evaluados fueron mayores en las vacas tratadas con FSH que en aquellas tratadas con eCG (Tabla 3.4; P <0,05). En este experimento no hubo diferencias entre las vacas Brangus y las Angus (P=0,7; Tabla 3.5), ni tampoco interacción raza-tratamiento (P=0,3).

Tabla 3.3. Numero (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto Tratamiento de sincronización de onda.

Grupo	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
DFR	32	16,3 \pm 1,2	9,1 \pm 0,8	5,8 \pm 0,6
BE+P4	32	15,1 \pm 1,2	8,3 \pm 0,8	4,7 \pm 0,6
Valor – P		0,52	0,52	0,3

Tabla 3.4. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto tratamiento superestimuladorio.

Grupo	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
FSH	32	17,9 \pm 1,2 ^b	10,0 \pm 0,8 ^b	6,8 \pm 0,6 ^b
eCG	32	13,6 \pm 1,2 ^a	7,3 \pm 0,8 ^a	3,7 \pm 0,6 ^a

^{a,b} Medias dentro de la misma columna con letras distintas difieren significativamente (P<0,05)

Tabla 3.5. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con BE+P4 o sometidas a DFR y luego estimuladas con FSH o eCG antes de la OPU. Efecto Raza.

Raza	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
A.Angus	31	15,8 \pm 1,4	8,7 \pm 0,9	5,2 \pm 0,8
Brangus	33	15,7 \pm 1,1	8,7 \pm 0,8	5,7 \pm 0,6
Valor - P		0,95	0,98	0,49

EXPERIMENTO 3

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3.6 y 3.7. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos (con CIDR o sin CIDR) en el número total de folículos aspirados ($P=0,8$), número de COC's recuperados ($P=0,5$) y el número de ovocitos o COCs viables ($P=0,6$). Tampoco hubo diferencias ($P=0,5$) entre las vacas Angus y Brangus en los parámetros evaluados (Tabla 3.7).

Tabla 3.6. Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH con la inserción o no de un CIDR® durante el tratamiento realizado antes la OPU. Efecto Tratamiento.

Grupo	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
DFR + CIDR	36	15,4 \pm 1,2	8,6 \pm 0,9	6,3 \pm 0,7
DFR	36	15,9 \pm 1,2	8,3 \pm 0,9	5,8 \pm 0,7
Valor - P		0,80	0,83	0,64

Tabla 3.7 Numero (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables en donantes Angus y Brangus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH con la inserción o no de un CIDR durante el tratamiento realizado antes la OPU. Efecto Raza.

Raza	N	Total de folículos aspirados	Total de COCs recuperados	COCs Viables
A. Angus	34	15,9 \pm 1,4	8,0 \pm 0,9	5,5 \pm 0,8
Brangus	38	15,6 \pm 0,9	8,9 \pm 0,9	6,5 \pm 0,7
Valor - P		0,81	0,49	0,34

EXPERIMENTO 4

Los resultados de este experimento están indicados en la Tabla 3.8. El número medio de folículos aspirados, el número total de COCs recuperados y el total de ovocitos viables fue mayor ($P < 0,05$) en las vacas tratadas con FSH que en las del Grupo Control. El número medio de blastocistos después de 7 días de cultivo fue numéricamente mayor pero

no significativo ($P=0,2$) en las vacas tratadas con FSH que en las del Grupo Control. A su vez no hubo diferencias significativas ($P=0,9$) entre las vacas tratadas con dosis múltiples de FSH que en las tratadas con una dosis simple de FSH diluida en MAP 5 (50 mg).

Tabla 3.8 Número (Medias \pm EE) de folículos aspirados, COCs recuperados y viables y blastocitos totales y Grado 1 producidos en donantes Angus tratadas con DFR y luego estimuladas con FSH en dosis múltiples, una sola inyección de FSH diluida en MAP 5 (50 MG) o no tratadas con FSH (Control) antes la OPU. Efecto Tratamiento.

Tratamiento	Total de Folículos Aspirados	COCs		Blastocitos	
		Total	Viables	BI	BI (G1)
Dosis Múltiples de FSH (n=31)	14,1 \pm 1,0 ^b	8,5 \pm 0,6 ^{ab}	5,5 \pm 0,5 ^b	1,8 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3
Dosis Simple de FSH en MAP 5 (50 mg) (n=31)	13,3 \pm 1,1 ^b	8,8 \pm 0,8 ^b	5,7 \pm 0,6 ^b	1,8 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3
Control (n=31)	8,5 \pm 0,6 ^a	6,4 \pm 0,7 ^a	3,7 \pm 0,5 ^a	1,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2

^{a,b} Medias dentro de la misma columna con distinta letra difieren significativamente ($P<0,05$)

Tabla 3.9 Tamaño folicular (Medias \pm EE) en el día de la OPU de los animales estimulados con FSH en dosis múltiples, una sola inyección de FSH diluida en MAP 5 (50 MG) o no tratadas con FSH (Control) antes la OPU. Efecto Tratamiento.

Tratamiento	Folículos (Aspirados)			
	Grande ($\geq 9\text{mm}$)	Mediano ($>5 < 9\text{mm}$)	Pequeño ($\leq 5\text{mm}$)	Total
Dosis Múltiples de FSH (n=31)	4,6 \pm 0,7 ^b	8,5 \pm 0,8 ^b	1,0 \pm 0,3 ^a	14,1 \pm 1,0 ^b
Dosis Simple de FSH en MAP 5 (50 mg) (n=31)	3,8 \pm 0,6 ^b	8,0 \pm 0,7 ^b	1,3 \pm 0,2 ^a	13,3 \pm 1,1 ^b
Control (n=31)	1,2 \pm 0,3 ^a	4,7 \pm 0,4 ^a	2,5 \pm 0,3 ^b	8,5 \pm 0,6 ^a

^{a,b} Medias dentro de la misma columna con distinta letra difieren significativamente (P<0,05)

DISCUSIÓN

La hipótesis de que la sincronización de las ondas foliculares aumenta el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por OPU fue confirmada. El número y la calidad de los ovocitos recuperados por aspiración folicular dependen en gran medida de la fase de la onda folicular en el que los animales se encuentran en el momento de OPU (Seneda *et al.*, 2001). El mayor número de folículos disponibles y en particular la ausencia de un folículo dominante, se puede encontrar inmediatamente después de la emergencia de una nueva onda folicular, debido que la dominancia no se ha alcanzado todavía, y no existe un folículo dominante o folículos en un avanzado estado de atresia (Ginther *et al.*, 1996). De acuerdo con Hagemann *et al.* (1999b) y Seneda *et al.* (2001) la calidad de los ovocitos no se ve afectada por el tamaño del folículo, pero si por causa de la fase folicular de la donante.

Por otra parte, las tasas de recuperación de ovocitos son mayores cuando la OPU se realiza en los folículos ≥ 4 mm pero menores a 10 mm. Caccia y Bó (1998) y Martinez *et al.* (2005) demostraron que la aplicación de BE y P4 producen la atresia folicular y el comienzo de una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después. Por lo tanto, la siguiente aspiración en el día 6 de tratamiento coincide con el día 2 de la onda folicular que prosee una alta población de folículos que tienen entre 5 y 7 mm de diámetro disponibles en el momento de la OPU, según lo sugerido por Seneda *et al.* (2001). Aunque Kruip *et al.* (1991) y Bungartz *et al.* (1995) reportaron que se pueden producir blastocistos viables con independencia de la fase estral, los experimentos de esta tesis concuerdan con los de

Hagemann *et al.* (1999a) que reportaron mejores resultados en la producción de embriones cuando se utilizaron ovocitos que provenían de folículos que no estaban bajo la influencia de un folículo dominante. También está en acuerdo por lo sugerido por Bols *et al.* (1996) que reportó que cuanto más ovocitos viables son recuperados, mayor será la posibilidad de obtener un gran número de embriones transferibles.

Otro hallazgo importante del Experimento 1 es que hubo un efecto de raza, lo que confirma que la población folicular es mayor en animales *Bos indicus* que en los *Bos taurus*, tal cual lo reportan varios autores (Dayan *et al.*, 2000; Bó *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2012). Esta particularidad posibilitó el crecimiento rápido de la técnica de PIV en Brasil debido a la preponderancia de la raza Nelore (*Bos indicus*) en ese país.

En el Experimento 2 se comparó el método de sincronización de onda, no encontrándose diferencias significativas entre los dos métodos. Estos resultados demuestran que los dos tratamientos pueden ser utilizados indistintamente en programas de producción *in vitro* de embriones, de la misma manera que se puede hacer en los programas de superovulaciones y colecta de embriones *in vivo*. Bergfelt *et al.* (1998) compararon el efecto de la aspiración de todos los folículos >5 mm presentes en el ovario, 1,5 días antes de comenzar un tratamiento de superestimulación con FSH con un tratamiento utilizando estradiol-17 β y progesterona 4 días antes de la FSH, no encontrando diferencias significativas en el número y calidad de los embriones obtenidos. De la misma manera Baracaldo *et al.* (2000) no encontraron diferencias entre vacas que fueron superovuladas 1,5 días después de la aspiración de los dos folículos mayores presentes en el ovario y las tratadas con estradiol-17 β y progesterona. Sin embargo, Bacelar *et al.* (2006) observaron un mayor número de ovocitos disponibles en el momento de la aspiración folicular y un mayor

número de estructuras recuperadas por sesión OPU cuando utilizó BE + P4 para sincronizar la emergencia de la onda. Es posible que esto ocurra porque encontraron menos CLs en el momento de OPU utilizando el método farmacológico, pero en nuestro protocolo se utilizó prostaglandina dos días antes de la aspiración para evitar la presencia de esas estructuras luteales que se pueden formar después de la aspiración folicular. Además, en nuestro experimento solo fueron aspirados los folículos > 6 mm de diámetro y no todos los folículos presentes en el ovario para la DFR.

En el Experimento 2 se evaluó además el efecto de la estimulación con eCG o FSH antes de la OPU. Los resultados fueron muy favorables al uso de FSH, en comparación al grupo eCG y el grupo control (sin tratar). El uso de tratamientos que producen la estimulación del crecimiento de los folículos es una técnica ya utilizada por varios grupos (Bungartz *et al.*, 1995; Goodhand *et al.*, 1999; Van de Leemput *et al.*, 1999) lo que facilita la visualización de los folículos, además de mejorar la calidad de los ovocitos recuperados (Chaubal *et al.*, 2006). La eCG es una hormona económica, accesible en el mercado, y de fácil utilización, ya que requiere de una única dosis de aplicación. La FSH es mucho más cara y debido a su corta vida media requiere múltiples aplicaciones (Monniaux *et al.*, 1983; Mapletoft *et al.*, 2002). Hay estudios que reportan una mejor respuesta a los tratamientos superovulatorios con FSH en comparación al eCG (Boland *et al.*, 1991; Rouillier *et al.*, 1996; Goodhand *et al.*, 1999; De Roover *et al.*, 2005). Sin embargo, Martins *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares con FSH o eCG en la superovulación de vacas *Bos indicus*. Una menor producción de embriones viables con el uso de eCG en un tratamiento de superovulación convencional puede atribuirse al tiempo de exposición largo, debido a la larga vida media y la excesiva estimulación de los folículos después de la ovulación, ya que

los niveles de eCG permanecen en la sangre durante 5-7 días después de la administración (Siddiqui *et al.*, 2002). Sin embargo este no sería el caso en la utilización de eCG para OPU porque los ovocitos son aspirados antes de que ocurra la ovulación. Otra posibilidad es que la eCG tiene tanto acción FSH como LH (Murphy y Martinuk, 1991) y esta actividad de LH puede tener un efecto adverso sobre los ovocitos. Se ha demostrado que los extractos pituitarios con alta cantidad de LH afectan la calidad de los embriones producidos *in vivo* (Mapletoft *et al.*, 1991) y la LH puede conducir a la luteinización prematura de los folículos (Herrler *et al.*, 1991; Boland *et al.*, 1991).

Otro resultado interesante cuando se compara el Experimento 1 con el Experimento 2 es que cuando se estimularon las donantes con gonadotrofinas la diferencia entre las razas dejó de existir, indicando que es posible utilizar gonadotrofinas en animales *Bos taurus* para mejorar la producción de embriones *in vitro*, pero no está indicada para el uso en animales *Bos indicus*. Trabajos realizados por Dayan *et al.* (2000) y Seneda *et al.* (2001) sugieren que el uso de gonadotrofinas no aumenta el número de ovocitos aspirados y embriones producidos *in vitro* en razas cebuinas, mientras que otros autores sugieren un efecto benéfico en la utilización de FSH solamente en las razas taurinas (Blondin *et al.*, 2012).

Con respecto al efecto de la presencia de progesterona en la población folicular, hay varios estudios que asocian la progesterona alta con la calidad de los ovocitos, tanto en vacas superovuladas (Nasser *et al.*, 2011, Rivera *et al.*, 2011) como en vacas sincronizadas para IATF (Wiltbank *et al.*, 2012). Fair *et al.* (2012), también reportaron un efecto benéfico de las vacas con alta progesterona en la competencia ovocitaria. Pfeifer *et al.* (2009), por su parte encontraron que los niveles de progesterona intermedios eran mejores que los muy

altos y los muy bajos en donantes para OPU de la raza Nelore. Finalmente los resultados de Chaubal *et al.* (2007) no obtuvieron diferencias en el número y calidad ovocitaria utilizando o no la progesterona antes de la OPU, confirmando los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Tanto el experimento de esta tesis como el de Chaubal *et al.* (2007) se diferencian del de Pfeifer *et al.* (2009) y los de Fair *et al.* (2012) en los que se utilizaron el tratamiento con progesterona en combinación con un estimulación con FSH, por lo tanto es posible que la utilización de FSH pueda enmascarar los efectos de la progesterona sobre la competencia ovocitaria.

Aunque la administración de FSH antes de OPU ha sido una práctica común para aumentar la población folicular disponible, la mayoría de los estudios han adoptado una dosificación múltiple convencional para administrar la FSH. En el Experimento 4 de esta tesis, la eficacia de la FSH administrada en dosis múltiples cada 12 h a lo largo de 2 días se comparó con el efecto de una sola dosis diluida en una formulación de liberación lenta. Algunos estudios han utilizado una sola administración de FSH para la estimulación ovárica antes de la OPU. Yamamoto *et al.* (1994) administró pFSH diluida en una solución de 30% de polivinilpirrolidona (PVP) en una única aplicación i.m. antes de la OPU en vacas cíclicas, así como vacas preñadas y reportó respuesta folicular satisfactoria y recuperación de ovocitos semejantes a nuestro estudio utilizando ácido hialurónico. En otro estudio, la administración de 100 mg de Folltropin-V en vacas y vaquillas Holstein como una dosis única i.m. 4 días antes de la OPU, produjo significativamente más folículos, pero la aspiración de los ovocitos y la producción de blastocistos no se vieron afectados (Bungartz *et al.*, 1995). Todos estos estudios se realizaron con el objetivo de simplificar la

estimulación para la OPU e incrementar la población folicular y la producción de embriones.

En el Experimento 4 se eligió la dosis de 160 mg de FSH porque es la mitad de la dosis comúnmente utilizada en protocolos de superovulación en vacas Angus (Mapletoft *et al.*, 2002, Bó *et al.*, 2006, 2008). Además se ha demostrado, en experimentos realizados en laboratorio, que la utilización de FSH diluido en una solución de ácido hialurónico resulta en un respuesta superovulatória semejante al tratamiento superovulatório de dosis múltiples de FSH (Tribulo *et al.*, 2011). La misma concentración de ácido hialurónico utilizada en este experimento (5 mg/ml) fue la utilizada en el experimento de Tribulo *et al.* (2012) donde se demostró que se podía obtener la misma respuesta superovulatória usando un tratamiento con FSH cada 12 horas por 4 días que un tratamiento con solo dos inyecciones de FSH diluido en ácido hialurónico cada 48 h.

Las concentraciones circulantes de FSH después de la inyección dependen de la absorción, variando de acuerdo al lugar de la administración y la depuración metabólica de la circulación. Basado en las tasas de eliminación metabólicas se esperaría que la FSH sea eliminada de la circulación a la misma velocidad, independientemente de su concentración y método de administración (Demoustier *et al.*, 1988). Los resultados preliminares recolectados como parte de un estudio publicado anteriormente (Bó *et al.*, 1994) indicaron que tras la administración i.m. única de FSH en solución salina (o la inyección subcutánea en animales delgados), las concentraciones en sangre de FSH fueron más altas y posteriormente disminuyeron más rápidamente que en las vacas en condición corporal alta que recibieron una única inyección subcutánea, probablemente debido la presencia de grasa subcutánea que produjo una absorción más lenta de la FSH en las vacas con condición

corporal alta. También se ha demostrado que la adición de FSH a una solución de polivinilpirrolidona (Takedomi *et al.*, 1993), de gel de hidróxido de aluminio (Kimura *et al.*, 2007) o polietilenglicol (Choi *et al.*, 2002), dio lugar a una absorción más lenta y más prolongada que cuando se administra FSH en un vehículo salino. Lo mismo se dedujo cuando se evaluó el patrón de crecimiento folicular por ultrasonografía en vacas tratadas con FSH diluida en ácido hialurónico (Tribulo *et al.*, 2011).

Como se pudo dilucidar del número de folículos aspirados el día de la OPU (tabla 3.8), el crecimiento folicular fue similar en los grupos tratados con FSH (dosis múltiple o simple), demostrando que el ácido hialurónico fue eficaz para reclutar los folículos y promover el crecimiento folicular. El número de folículos medianos y grandes fue mayor en las vacas tratadas con FSH en comparación con el grupo control. Sin embargo, el número de folículos grandes fue un problema, porque se sabe que las tasas de recuperación de los folículos de gran tamaño es inferior a los folículos medianos y pequeños (Seneda *et al.*, 2001). Por lo tanto se deberían hacer más estudios para tratar de reducir la dosis de 160 mg. En base a resultados de experimentos preliminares no reportados en esta tesis, es posible que 100 mg de FSH en una única dosis sea suficiente, promoviendo la estimulación folicular y mejorando la recuperación de ovocitos (Ongaratto, datos no publicados).

A pesar que el número de ovocitos fue mayor en los grupos tratados con FSH, el número de embriones producidos no fue significativamente mayor, sólo numéricamente superior. De acuerdo con Blondin *et al.* (2002), la simple estimulación de los folículos con el uso de FSH no produce un ambiente ideal para el desarrollo de ovocitos saludables. Existen evidencias de que el "coasting", período comprendido entre el término de la estimulación hormonal del ovario y la aspiración del ovocito, afecta de manera significativa

el potencial de desarrollo de los COCs (Blondin *et al.*, 1997). En este caso, los folículos en fase de pseudo-dominancia o atresia temprana proporcionará al COC un entorno ideal para adquirir competencia de desarrollo (Blondin *et al.*, 2002). En este experimento, el “coasting” fue de 36 horas y probablemente debería ser más largo para ser eficaz (48 h, como sugiere Blondin *et al.*, 2002). Podría ser necesario ajustar la dosis de FSH y el período de “coasting” para obtener mejores resultados en la raza Angus. Sin embargo, el período de “coasting” en el grupo tratado con MAP-5 no estaba garantizado, porque no se sabe exactamente en qué momento los niveles de FSH retornan a ser basales después de la administración de FSH diluida en ácido hialurónico. Basado en los patrones de crecimiento folicular observados con ultrasonografía se estima que los niveles de FSH vuelven a ser basales después de las 48 h de la administración de Folltropin diluida en la solución de 5 mg/ml de ácido hialurónico (Tribulo *et al.*, 2011). Por lo tanto, se puede deducir que el “coasting” fue similar en las vacas tratadas con dosis múltiples de FSH y las tratadas con la dosis simple. El “coasting”, necesario para obtener ovocitos competentes, puede explicar también porque los resultados de la FSH fue superior al eCG en los experimentos de esta tesis. Debido a la larga vida media de la eCG (Murphy y Martinuk, 1991) es posible que los folículos de las vacas tratadas con eCG hayan estado recibiendo todavía estímulo gonadotrófico hasta la OPU, no dando lugar al “coasting”.

Por último, otros experimentos utilizan LH antes de la OPU para producir la maduración de los ovocitos (Blondin *et al.*, 2002; Chaubal *et al.*, 2006) con mejores resultados en la producción de embriones. Blondin *et al.* (2002) sugirieron que un período de 33 h de “coasting” después de cuatro dosis de FSH (200 mg Folltropin-V) dieron lugar a una mayor competencia ovocitaria si se administró LH 6 horas antes de la OPU, pero

cuando se utilizó un periodo de “coasting” de 48 h, la administración de LH no tuvo ningún resultado benéfico y las tasas de desarrollo embrionario fueron comparables entre el período de 33 horas de “coasting” más LH y las 48 h de “coasting” sin LH. Se concluyó que con 33 h de “coasting” los folículos no han alcanzado la fase de atresia avanzada como los sometidos a 48 horas de restricción de FSH (Blondin *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis permiten confirmar la hipótesis propuesta que los tratamientos de sincronización de la onda folicular y la superestimulación aumentan el número de folículos aspirados y COCs obtenidos por sesión de OPU en vacas *Bos taurus* y cruce *Bos Taurus* con *Bos indicus* (3/8 *Bos indicus*, 5/8 *Bos taurus*).

Las conclusiones específicas de la tesis son:

- La sincronización de emergencia de la onda folicular incrementa el número de COCs obtenidos por OPU.
- El número de folículos aspirados y COCs obtenidos por OPU es mayor en los animales cruce *Bos taurus x Bos indicus* que en los *Bos Taurus*.
- Tanto el tratamiento con BE+P4 ó DFR son igualmente eficientes para la sincronización del crecimiento de una onda y posterior OPU.
- El tratamiento con eCG resultó en un menor número de COCs aspirados que el tratamiento con FSH.
- Cuando se utiliza FSH el número de COCs aspirados por OPU en los animales cruce *Bos indicus* y los *Bos taurus* no es diferente.
- La adición de un dispositivo intravaginal con 1,9 g de progesterona (CIDR®) durante el tratamiento no tuvo efecto sobre el número y calidad de los ovocitos obtenidos por OPU.
- El tratamiento superestimulatório con FSH aumentó el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por OPU en vacas *Bos taurus*.

- La superestimación con una sola inyección intramuscular de FSH diluida en MAP-5 produjo un número de ovocitos recuperados y blastocitos producidos *in vitro* similar al tratamiento con inyecciones de FSH cada 12 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of FSH and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 177–88.
- Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginter OJ. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Animal Reproduction Science* 30: 259-271.
- Adams GP. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 4: 19-24.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part 1: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animal* 45: 171-179.
- Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, Mclean D, Seamark RF. 1994. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo productions from calf oocytes. *Theriogenology* 42: 1227- 1236.
- Assey RJ, Hyttel P, Kanuya N. 1994. Oocyte structure in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*Bos indicus*). *Anatomy and Embryology, Berlin* 190: 461-468.
- Bacelar DS, Padilha LC, Baruselli OS, Seneda MM. 2006. Incremento da obtenção de oócitos em vacas Nelore com utilização de um protocolo com progesterona injetável. *Acta Scientiae Veterinariae* 34: 461.
- Baracaldo MI, Martinez M, Adams GP, Mapletoft RJ. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53: 1239-1250.

- Baruselli PS, Sa Filho MF, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Vieira LM, Mendanha MF, Bo GA. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 47(Suppl. 4): 134–141.
- Barros CM, Nogueira MFG. 2001. Embryo transfer in *bos indicus* cattle. *Theriogenology* 56: 1483-1496.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 2001. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*. 64:432–441.
- Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. *Theriogenology*, 41(1), 161.
- Bergfelt DR, Brogliatti GM, Adams GP. 1998. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology*. 50:15-25.
- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. *Molecular Reproduction Development* 41: 54–62.
- Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA. 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*. 48: 803–13.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M. 2002. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent. *Bovine Oocytes*. *Biology of Reproduction* 66: 38–43.
- Blondin P, Vigneault C, Nivet *al*, Sirard MA. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction* 9(3):281-289.

- Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42: 963–75.
- Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez MF, Pierson RA; Mapletoft RJ. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 39: 193-204.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72.
- Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 78:307-26.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF. 1991. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35: 5-17.
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, Kruif A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 1001-1014.
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, Kruif A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221-1236.
- Bols PEJ, Leroy JLMR, Vanholder, T, Van Soom A. 2004. A comparison of a mechanical sector and alinear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 62: 906-914.

- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51: 59–70.
- Bungartz L, Nieman H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 583-591.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43: 667–75.
- Buratini Jr. J. 2007. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 31: 190-196.
- Caccia M, Bó GA. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef heifers with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, 49:341. (abstract).
- Caixeta ES, Ripamontec P, Franco M, Buratini J, Dode MAN. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence, *Reproduction Fertility and Development* 21: 655–664.
- Callesen H, Greve T, Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27: 217.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X, Yang, X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631-1648.

- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PEJ, Rezamand P, Tian X, Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67: 719-728.
- Choi SH, Park YS, Cho SR, Kang TY, Sin SH, Kang SS, Rho GJ, Choe SY. 2002. Superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol. *Korean Journal of Embryo Transfer* 17: 67-77.
- Dawson FLM. 1977. Reproductive potential in female cattle discarded as infertile. *Journal of Reproduction and Fertility* 51: 53-56.
- Dayan A, Watanabe MR, Watanabe YF. 2000. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* 28: 181-185.
- 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: 13-25.
- De Roover, R, Feugang JMN, Bols PEJ, Genicot G, Hanzen CH. 2008. Effects of Ovum Pick-Up Frequency and FSH Simulation: A retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reproduction in Domestic Animal* 43: 239-245.
- Demoustier MM, Beckers JF, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard JL, Ectors F. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30: 379-86.
- Dieleman SJ, Bevers MM. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of

- ovulations in PMSG/PG-treated cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 533–42.
- Donaldson LE. 1989. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology* 31: 183.
- Dunn MH, Mayo K. 2006. Gonadotropin Signaling in the Ovary In Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction* 1: 547-592.
- Durocher J, Morin N, Blondin P. 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* 65: 102–115.
- Erickson, BH. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25: 800-805.
- Evans ACO, Mossa TF, Lonergan P, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Ireland JJ. 2010. Variation in the number of ovarian follicles in cattle: possible causes and consequences. *Acta Scientiae Veterinarie* 38: 537-543.
- Fair T, Lonergan P. 2012. The Role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reproduction in Domestic Animal* 47:142–147.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55: 1187-1194.
- Ginther O J, Kot K., Kulick L.J, Wiltbank MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48: 75-87.
- Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 60: 61-79.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction* 65: 638-647.

- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51: 951-961.
- Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. 2000. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Animal Reproduction Science* 63: 145-158.
- Gordon IR. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2. Ed. CABI: London, UK 42-78.
- Hadley ME. 1996. *Endocrinology* 4: 581.
- Hafez ESSE, Jainudeen MR, Rosnina Y. 2004. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In. *Reprodução Animal*, 7ª ed. São Paulo: Manole 3: 33-53.
- Hagemann LJ. 1999a. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51: 449-59.
- Hagemann LJ, Beaumont S, Berg M, Donnison M, Ledgard A, Peterson A, Schurmann A, Tervit HR. 1999b. Development during single IVPs of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction Development* 53: 451- 458.
- Hahn J. 1984. The value of laboratory animal models in embryo transfer research. *Theriogenology* 21: 45-59.
- Hamano S, Kuwayama M. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*.39:703-712.

- Hanenberg EHAT, van Wagtenonk-de Leeuw AM. 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collections for *in vitro* embryo production results. *Theriogenology* 47: 158.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Mccauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61: 909–920.
- Herbison AE. 2006. Physiology of the GnRH neuronal network. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* 15: 1482.
- Herrler A, Elsaesser F, Parvizi N, Niemann H. 1991. Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amount of LH. *Theriogenology* 35: 633–643.
- Hinrichs K, Kenney DF, Kenney RM. 1990. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* 34: 107-112.
- Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction Fertility and Development* 23: 1-14.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150.

- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Nikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Eorkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122: 303-315.
- Kastka L, Rynska B. 1998. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology* 50: 213-222.
- Khurana NK, Niemann H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54:741-756.
- Kimura K, Hirako M, Iwata H, Aoki M, Kawaguchi M, Seki M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 68: 633-639.
- Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 91: 511-519.
- Kruip TAM, Dieleman SJ. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction and Nutrition Development* 22: 465-473.
- Kruip TA, Pieterse MC, Beneden TH van, Vos PL, Wurth YA, Taverne MA. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Veterinary Record*, London 128: 208-210.
- Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofs MWM, Pieterse MC. 1994. Potential use of ovum pickup for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-684.

- Lambert RD, Sirard MA, Bernard C, Béland R, Rioux JE, Leclerc P, Ménard, DP, Bedoya M. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy. *Theriogenology* 25: 117-133.
- Laurincík J, Pícha J, Píchoá D, Oberfranc M. 1991. Timing of laparoscopies aspiration of preovulatory oocytes in heifers. *Theriogenology* 35: 415-423.
- Loneragan, P, Monaghan P, Rizos D, Boland M, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction Development* 37: 48–53.
- Loneragan P, Fair T. 2008. *In vitro*-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41: 67-72.
- Machatkova JE, Petilikova J, Dvoracek V. 1995. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 44: 801-810.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 61: 329-335.
- Manik RS, Singla SK, Palta P. 2003. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Animal Reproduction Science* 76: 155-161.

- Mapletoft RJ, Bo GA, Murphy BD. 1991. The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. IX. Brazilian Anim Reprod 74–92.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. Reproduction and Nutrition Development 42: 1-11.
- Martínez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. Animal Reproduction Science 86: 37-52.
- Martins CM, Torres-Junior JRS, Souza AH, Sousa MG, Baruselli PS. 2006. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. Acta Scientiae Veterinarie 34: 227.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KDB, Rocha RMP, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR. 2007. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 19: 677–684.
- Mcgee EA, Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrinology 21: 200–214.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, PauJ B, Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for *in vitro* fertilization. Journal of Animal Science 73: 967-974.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 59: 651–74.
- Monniaux D, Chupin D, Saumande J. 1983. Superovulatory response of cattle. Theriogenology 19: 55-81.

- Monteiro FM, Melo DS, Ferreira MMG, Carvalho LM, Sartoreli ES, Ederhardt BG, Nogueira GP, Barros CM. 2009. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. *Animal Reproduction Science* 110: 128-138.
- Moyo P, Dobson H.1995. Collection, *in vitro* fertilisation and culture of bovine oocytes intravaginally or in a conventional incubator. *Vet Rec.* 136:115-8.
- Murphy BD, Martinuk SD.1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev.*12:27-44.
- Murphy BD. 2011. La reserva folicular. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC 2011.
- Nasser LF, Adams GA, Bo GA, Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-24.
- Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS.2011.Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 15,76:320-327.
- Pfeifer LF, Schneider A, Castilho EM, Luz EM, Ataíde PF, Dionello NJL, Pivato I, Rumpf R, Corrêa MN. 2005. Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção *in vitro* de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 33: 184.
- Pfeifer LFM, Sartori R, Pivato I, Rumpf R, Nogueira GP, Xavier EG, Dionello NJL, Corrêa MN. 2009. Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction* 6: 473-480.
- Pieterse MC. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35:19-24.

- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip THAM, Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip THAM, Wurth YA., van Beneden, TH, Willemse AH, Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in PMSG-treated cows. *Theriogenology* 37: 273.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 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: 690-697.
- Rajkovic A, Panjas SA, Matzuk MM. 2006. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models In Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction* 10: 383-422.
- Reichenbach HD. 2003. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. *Acta Scientiae Veterinariae* 31: 28-50.
- Rhodes FM, Peterson AJ, Jolly PD, McMillan WH, Donnison M, Ledgard A, Parton G, Hall DR. 1997. Bovine ovarian follicle and oocyte characteristics after emergence of the first follicular wave. *Theriogenology* 47: 149.
- Rick G, Hadelers KG, Lemme E, LucasHahn A, Rath D, Schindler L, Niemann H. 1996. Long-term ultrasound guided ovum pickup in heifers from 6 to 15 months of age. *Theriogenology* 45: 356.
- Rivera FA, Mendonça LG, Lopes G Jr, Santos JE, Perez RV, Amstalden M, Correa-Calderón A, Chebel RC. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141:333-42.

- Rodrigues CFM, Garcia JM. 2000. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. Archivos Facultad Veterinaria UFRGS 28: 186-187.
- Rodriguez PR, Tríbulo A, Ramos M, Ongaratto FL, Bó GA. 2010. Comparison of oocyte recovery rates and morphology obtained by opu after diferent hormonal treatments in cattle. Proceedings of the 26th Congress of the World Association for Buiatrics, 2010 - Santiago de Chile.
- Rouillier P, Guilbault LA, Lussier JG, Matton P. 1996. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. Theriogenology. 46: 1053-1061.
- Sauvé R. 1998. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. Anais Reunião Anual da SBTE 141-145.
- Senatore EM, Xu J, Novoa MVS, Gong G, Lin T, Bella A, Moreno JF, Mannino ME, Tian, X, Presicce GA, Wu SC, Du F. 2010. Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. Theriogenology 74: 1643-1651.
- Sendag, S, Cetin, Y., Alan, M., Hadeler, K. and Niemann, H. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pickup in Holstein cows. Animal Reproduction Science 106: 208-214.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia J.M, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. Animal Reproduction Science 67: 37-43.
- Siddiqui MA, Shamsuddin M, Bhuiyan MM, Akbar MA, Kamaruddin KM. 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. Reproduction in Domestic Animal 37: 37-41.

- Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturion L, Melo-Sterza FA, Seneda MM. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology* 76: 1051–1057.
- Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62: 227–243.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography'. *Biology of Reproduction* 39: 308-317.
- Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. 1995. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *Journal Experimental Zoologic* 273: 317-326.
- Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 193-199.
- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132(3):1108-14.
- Stroud B. 2011. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter* 29: 14-24.
- Stubbings RB, Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology* 43: 705-712.

- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G. 1993. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39: 327.
- Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 129:7-13
- Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Mapletoft RJ, Bó GA. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77: 1679–1685.
- Van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. 1999. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 52: 335–49.
- Vos PLAM, Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM, Dieleman SJ. 1994. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. *Theriogenology* 41: 829-840.
- Wiltbank MC, Souza AH, Giordano JO, Nascimento AB, Vasconcelos JM, Pereira MHC, Fricke PM, Surjus RS, Zinsly FCS, Carvalho PD, Bender RW, Sartori R. 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Animal Reproduction* 9: 231-241.
- Wurth YA, Kruij TAM. 1992. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: *Proceedings of the Twelfth International Congress on Animal Reproduction*, Vol. I, 387–389.

- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction* 53: 951–957.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41: 747–55.