

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**MANIPULACIÓN DE LA DINÁMICA FOLICULAR EN DONADORAS
BRAHMAN COMO ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA
PRODUCCIÓN *In Vitro* DE EMBRIONES.**

KEVIN E. CHAVARRÍA M.

4-806-1082

PANAMÁ, PANAMÁ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

**MANIPULACIÓN DE LA DINÁMICA FOLICULAR EN DONADORAS
BRAHMAN COMO ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA
PRODUCCIÓN *In Vitro* DE EMBRIONES.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDA PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA**

APROBADO:

PROF. DR. JULIO RAMOS _____
ASESOR

DR. ROLANDO JIMÉNEZ _____
ASESOR EXTERNO

**PANAMÁ, PANAMÁ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2023

AGRADECIMIENTOS

Al haber terminado este gran proyecto de manera satisfactoria no que más que decir: “Gracias”

Me gustaría comenzar por aquellos que han sido mi guía en este trabajo, mis tutores: Dr. Julio Ramos quien desde el comienzo brindó su apoyo para que este trabajo fuese posible, poniendo siempre a disposición su tiempo, sus conocimientos y motivación para no desmayar ni desistir ante las adversidades. Al Dr. Rolando Jimenes y al Dr. Luiz Nasser quienes han sido maestros para mí en el campo de la Biotecnología de la Reproducción Animal a través de sus conocimientos, tiempo y paciencia, quiero agradecerles también por su empeño en el fomento del estudio e investigación de la Medicina Veterinaria basada en ciencia. A todo el equipo de trabajo de la empresa Born Animal Biotechnology ya que gracias a su labor todas estas investigaciones y proyectos son posibles. De manera especial también al Ing. Alberto Barahona por su disposición y talento para el procesamiento y representación de los datos aquí mostrados.

A todos les deseo éxitos y bendiciones en su camino.

DEDICATORIA

A Dios, que a través de sus dones nos hace capaces de adquirir conocimientos además es quien nos da la gracia de superar las pruebas y lecciones que se presentan en el camino. A mi madre y a mi padre quienes han sido mis héroes y pilares en el caminar de la vida con su amor, todo lo que haga es gracias a su ejemplo de sencillez, humildad y superación. A mi abuelo Pablo y mi abuela Esperanza por ser un ejemplo de paciencia, perseverancia y amor. A mi tía Margarita, mi tía Vilma y mi tío Victor por brindarme un apoyo incondicional día con día desde antes de comenzar mi carrera universitaria, además de también brindarme un espacio en su hogar. A mi tía Paula quien ha sido un ejemplo de vida a seguir para mí con sus convicciones, disciplina y perseverancia. A mis tíos César y Nelson quienes me han brindado grandes lecciones a través del trabajo duro y la dedicación. A Sisbeth Araúz quien con su motivación y apoyo moral me ha ayudado a superarme. Este trabajo también es dedicado a todos los que compartimos un gusto e interés por la ciencia y la Medicina Veterinaria para que sea un incentivo al enriquecimiento del conocimiento y la investigación.

RESUMEN

En el siguiente estudio se evaluó el efecto de la manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman *bos indicus* con el objetivo de determinar si la manipulación puede aumentar la producción *in vitro* de embriones (PIV) por medio de los resultados que se obtengan en dicho proceso como también en los procesos de Ovum pick-up (OPU). Para este estudio se utilizaron donadoras Brahman multíparas de alto valor genético, todas las vacas del experimento fueron sometidas a dos sesiones de OPU, la primera fue del grupo tratado que se sometió a un protocolo de sincronización para ser aspiradas el día dos después de la ovulación. La segunda sesión fue del grupo control en la que las vacas fueron aspiradas en un día aleatorio del ciclo estral. Los principales parámetros a evaluar fueron: calidad y cantidad de ovocitos totales, cantidad de ovocitos viables y tasa de conversión a embrión. El método estadístico que se determinó a utilizar para llevar a cabo el análisis de esta investigación fue la prueba de T-Student. En base a los resultado obtenidos en los ovocitos totales, ovocitos viables y tasa de conversión a embriones se concluyo que la manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman no ejercio una diferencia significativa, sin embargo, los porcentajes de ovocitos viables y porcentajes de producción de embriones presentaron una tendencia numérica al aumento cuando se comparó el grupo tratado con el control, lo que podría tener una influencia económica en la aplicación de esta práctica.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema a investigar	2
1.2 Antecedentes	4
1.3 Justificación	8
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo general	9
1.4.2 Objetivos específicos	9
1.5 Hipótesis	9
1.5.1 Hipótesis Alternativa	9
1.5.3 Hipótesis Nula	9
1.6 Alcance y Limitaciones del estudio	10
1.6.1 Alcance:	10
1.6.2 Limitaciones:	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1 Ovogénesis	11
2.2 Foliculogénesis	12
2.3 Dinámica folicular:	13
2.4 Ultrasonografía:	16
2.4.1 Transductores:	17
2.4.2 Examen ecográfico de ovarios	17
2.4.3 Bomba de vacío	18
2.4.4 Técnicas de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía OPU	18
2.4.5 Procedimientos para la aspiración folicular OPU:	19
2.4.5.1 Preparación de la donadora	19
2.4.5.2 Aspiración folicular	19
2.5 Filtrado	20
2.6 Clasificación de Ovocitos.	21
2.7 Hormonas utilizadas para la manipulación de la dinámica folicular	21
2.7.1 Hormonas hipotalámicas.	21
2.7.2 Estrógeno	23
2.7.3 Progesterona	24
2.7.4 Prostaglandina F2 alpha (PGF)	24
2.8.1 Priming Folicular	24
2.8.2 Aspiración folicular	26

2.8.3 Tratamiento con progestágenos / progesterona asociada a estradiol.
27

3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Materiales	30
3.1.1 Materiales de Sincronización:	30
3.1.2 Materiales de OPU:	31
3.2 Metodología	32
Sincronización	32
Fuente: El Autor.	33
Aspiración folicular (OPU - Ovum Pick-Up)	33
Producción de embriones	34
Análisis de datos	34
3.3 Parámetros a evaluar	36
4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	37
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	48
7. RECOMENDACIONES	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	51

ÍNDICE DE CUADROS

- ❖ CUADRO I . CATEGORÍAS DE COMPLEJO CUMULUS OVOCITO (COC).....pág.21
- ❖ CUADRO II. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES EN LOS DÍAS DEL PROTOCOLO EN CONJUNTO AL SUCESO FISIOLÓGICO QUE SE PRESENTA.pág. 33
- ❖ CUADRO III. TABLA PARA LOS DATOS DE PRODUCCIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES RESPECTIVAMENTE.pág. 35

ÍNDICE DE TABLAS

- ❖ TABLA I. PRUEBAS DE MUESTRAS INDEPENDIENTEpág. 37
- ❖ TABLA II. MEDIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES DEL GRUPO TRATADO Y CONTROL.pág. 38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- GRÁFICO I.** COMPARACIÓN DEL TOTAL DE OVOCITOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.....pág. 39
- GRÁFICO II.** COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE OVOCITOS VIABLES DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.....pág. 39
- GRÁFICO III.** COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE OVOCITOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.....pág. 40
- GRÁFICO IV.** COMPARACIÓN DEL CLIVAJE DE LAS DONADORAS DEL GRUPO TRATADO CONTRA LAS DONADORAS DEL GRUPO CONTROL.....pág. 40
- GRÁFICO V.** COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE CLIVAJE DE LAS DONADORAS TRATADAS Y EL DE LAS DEL GRUPO CONTROL.....pág. 41
- GRÁFICO VI.** COMPARACIÓN DEL TOTAL DE EMBRIONES OBTENIDOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DONADORAS DEL GRUPO CONTROL.pág. 41
- GRÁFICO VII.** COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN TOTAL DE EMBRIONES DEL GRUPO DE DONADORAS TRATADAS CONTRA LAS DEL GRUPO DE DONADORAS CONTROL.....pág. 42

1. INTRODUCCIÓN

La Sociedad Internacional De Tecnología Embrionaria en el 2021 presenta su informe anual sobre actividades de transferencia de embriones realizadas en el 2020, hace resaltar que en este año a pesar de la pandemia de COVID-19 y sus efectos negativos, la producción mundial de embriones se incremento en la mayor parte de las regiones (Viana, 2021). Declara que por primera vez, se registraron más de 1,5 millones de embriones bovinos, lo que demuestra un incremento del 7,0% respecto al 2019 (Viana, 2021).

Para la República de Panamá según Embryo Technology Newsletter, (2019) expone que se producen 5,162 embriones de los cuales 2,886 son de ganado de carne. Este aumento en la producción a nivel mundial nos incentiva a optimizar los métodos y las técnicas que se implementan en el país. Las nuevas biotecnologías son grandes herramientas que nos ayudan a tener un mejor aprovechamiento del ganado bovino. Al implementar estas herramientas podemos también desarrollar nuevas técnicas, protocolos y maneras de aprovecharlas a partir de los principios ya conocidos.

Una de ellas es la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU - Ovum pick-up) que nos ayuda a tener un mejor aprovechamiento de animales de producción incluso en distintas condiciones como lo son las donadoras jóvenes,

gestantes y post parto temprano. (Santi, 2018). Este procedimiento de OPU resulta ser efectivo al momento de obtener ovocitos de animales vivos, caracterizándose por ser un procedimiento no invasivo y repetible que nos ayuda a aumentar el rendimiento reproductivo de las hembras que son superiores genéticamente al permitirnos utilizar esos ovocitos para la producción *in vitro* de embriones (PIV) (Douar, 1998)

Otro de los métodos de los cuales ayudan tener un mejor aprovechamiento de los animales es la aplicación de protocolos hormonales para la manipulación de su estado reproductivo incluso aumentando la producción del mismo, como lo menciona ADAMS, (1994) "la aplicación de gonadotropinas, promueve un aumento en el número de folículos reclutados que emergen en una nueva onda posterior al tratamiento". Sin embargo la información de la implementación de ambas técnicas en conjunto en Panamá aún es escasa y sería de gran ayuda que realicen más estudios. Por lo que en este trabajo realizaremos una investigación respecto a la manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman al momento de ser sometidas a OPU.

1.1 Planteamiento del problema a investigar

La implementación de PIV ha sido de las biotecnologías reproductivas con avances más significativos en los últimos 10 años (Stroud, 2011). Esto ha sido impulsado por el aumento de la demanda de los productores que implementan

estas biotecnologías para así conseguir genéticas de alta calidad y mejores índices de producción.

Para la obtención de una buena genética es necesario contar con animales ejemplares, es aquí donde las donadoras juegan un papel muy importante desde el comienzo de su vida reproductiva hasta el final de esta. Aportando a lo largo de toda su carrera la imprescindible genética materna.

Ha sido publicado que para las hembras mamíferas después de cierta edad, la fertilidad disminuye gradualmente a causa del agotamiento folicular y una disminución de la calidad de los ovocitos que se relaciona directamente al valor cuantitativo de una población folicular (Herrera Álvarez, et al, 2021).

En investigaciones realizadas también se ha evidenciado que las donadoras muy jóvenes requieren de estimulación hormonal antes de ser sometidas a una OPU con posterior PIV para lograr resultados dentro de los parámetros (Taneja, 2000, 206-213). Posteriormente también nos encontramos con estudios en donadoras nelore longevas y senescentes en donde se evidencia que las mismas tienen una mejor producción de ovocitos cuando estas son sometidas a un protocolo hormonal previo a la OPU (Herrera Álvarez, et al et al., 2021). Por lo que son estas situaciones las que nos impulsan a implementar estrategias como la manipulación de la dinámica folicular para mejorar los procesos de OPU y PIV

Bacelar et al., (2009) menciona que la implementación de protocolos pre-aspiración se desarrollaron con la finalidad de controlar la onda de crecimiento folicular. Por parte de Baruselli, P; Nasser, L. et al en (2006)

mostraron que con la aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol y 50 mg de progesterona en el momento de la inserción del implante de progestágeno, se pudo observar la aparición de una nueva onda folicular, en una media de 4 días. Otro método es el descrito por Adams et al. (1992b), quien sustenta que al día siguiente de la remoción del folículo dominante (DF) por electrocauterización, comienza un pico de hormona foliculoestimulante (FSH), responsable de la aparición de una nueva ola de crecimiento folicular aproximadamente dos días después de la cauterización. Aunado a esto Bacelar et al., (2009) sustentan que cuando la aspiración folicular es realizada independientemente de la fase del ciclo estral, más del 85% de los folículos ováricos son atrésicos. Lo que nos lleva a cuestionar que si aplicando un protocolo hormonal para manipular la dinámica folicular y realizar una OPU en un día exacto en el que haya una nueva onda en crecimiento será capaz de aumentar la cantidad de los folículos que puedan ser aspirados y la calidad de ovocitos recuperados respecto a las donadoras que son sometidas a OPU sin protocolo hormonal.

1.2 Antecedentes

Por parte de Adams, (1992) tenemos que " estudiaron los efectos de la ablación de un folículo dominante y el tratamiento con líquido folicular sobre las concentraciones circulantes de hormona foliculoestimulante (FSH) y se estudiaron las relaciones temporales entre oleadas de FSH y ondas foliculares

en novillas con dos o tres ondas foliculares/intervalo interovulatorio. La cauterización del folículo dominante en el día 3 o el día 5 (ovulación en el día 0) (seis novillas de control y seis tratadas / día) resultó en un aumento (P inferior a 0,05) en la FSH a partir del día después de la cauterización. El aumento de FSH antes de la ola 2 (primera onda folicular posterior al tratamiento) ocurrió 4 días (cauterización del día 3) y 2 días (cauterización del día 5) antes del aumento en los grupos de control, lo que corresponde a un avance de 4 días y 2 días en la aparición de la onda 2 en comparación con los controles. Los resultados de la cauterización del FD y aplicación de líquido folicular en este experimento mostraron que hay un aumento de FSH que precede la aparición de una nueva onda.

Por Goodhand et al., (2000) quien realizó un estudio del efecto de tratamiento del ganado donante con progestágeno y estradiol o FSH sobre la recuperación de ovocitos in vivo y la producción embrionaria in vitro, sometió a tratamiento a cuarenta y ocho vacas holstein dividiéndolas en tres grupos, un grupo que no se le administró ninguna dosis de FSH, otro grupo con una dosis única y otro grupo con múltiples dosis de FSH. Los resultados mostraron que la FSH aumentó el número de folículos medianos y de folículos grandes y disminuyó el número de folículos pequeños, además mostró un aumento en número total de folículos aspirados en los animales que recibieron dosis múltiples de FSH cuando se le comparó con el grupo que no recibió tratamiento y también demostró un aumento significativo en el número de ovocitos de categoría 1 recuperados.

Baruselli et al.(2016) desarrollaron una investigación en donde evaluaron protocolos hormonales con la finalidad de recolectar ovocitos seguido de una producción de embriones *in vitro* en *bos indicus* (nelore) y *bos taurus* (holsteins) jóvenes. Se usaron un total de 45 donadoras Nelore: 30 terneras y 15 novillas. Para las donantes holstein se utilizaron un total de 34 animales: 24 terneras y 10 novillas. La selección se dio al azar para los que recibirán un tratamiento de super estimulación con FSH y los que fueron seleccionados fueron tratados antes de la OPU con un dispositivo intravaginal de progesterona, lo retiraron 5 días después y se administraron 4 tratamientos de FSH para después de 12 horas realizar la OPU. Determinaron que para las *bos indicus* que la tasa de complejos cúmulo ovocito (COC, por sus siglas en inglés) y el número de recuento de folículos antrales (AFC, por sus siglas en inglés) recuperados fue mayor en las donadoras tratadas que en las que no, sin embargo, el número de blastocistos producidos fue similar en los animales que recibieron el tratamiento que en los que no lo recibieron. En el caso de las *bos taurus* el número de AFC cultivados fue mayor para las donadoras tratadas con FSH a pesar de esto el número de blastocistos producidos fue similar en los animales con y sin tratamiento.

En un estudio realizado por Ongaratto et al., (2020) se evaluó la colecta de ovocitos y producción *in vitro* de embriones de donantes que fueron estimuladas para el desarrollo folicular ovárico con FSH, se realizaron dos experimentos en el primero compararon donantes que recibieron múltiples dosis

de FSH contra donantes que no recibieron FSH y en el segundo se compararon donantes que recibieron una sola dosis de FSH contra donantes que no recibieron FSH. Para el experimento uno el número de folículos aspirados y el número de COC recuperados fue mayor en las donadoras que tratadas con múltiples dosis cuando se comparó con el control. En el experimento dos el número de folículos aspirados y el número de COC recuperados fue mayor en las donantes tratadas con FSH cuando se compararon con el grupo control.

En el año 2021, Herrera Álvarez, et al. buscaron comparar el AFC, la producción de ovocitos y la competencia de desarrollo embrionario de animales jóvenes, longevos y senescentes. Recibieron un protocolo hormonal en un día aleatorio del ciclo estral, compuesto por: Sal sódica de cloprostenol (0,5mg, IM), benzoato de estradiol (1 mg, IM) y un dispositivo intravaginal P4 (1,4 g). Después de 5 días, retiraron el dispositivo de P4 y se realizó la OPU. Cinco días después a partir de la primera OPU, se realizó una segunda aspiración, siendo dirigida solamente a los folículos en crecimiento. Lo recolectado lo colocaron en medios de maduración estándar (IVM), lo fertilizaron e incubaron durante 9 días. Posterior al análisis de los datos obtenidos indicaron que el AFC fue menor en vacas longevas y senescentes en la OPU 1 y también en la OPU 2 en comparación de las vacas jóvenes. Para la tasa de formación de blastocistos determinaron que fueron mayor en vacas jóvenes y longevas en comparación de las vacas senescentes.

1.3 Justificación

Por medio de este estudio, se busca mejorar el aprovechamiento del material genético que es aportado por las donadoras para los procesos de OPU y PIV. Teniendo en cuenta que, es indispensable para estos procedimientos contar con una buena cantidad y calidad de gametos, se origina la necesidad de buscar métodos capaces de aumentar dichos índices de producción.

Lo que nos lleva a la descripción de Seneda et al., (2001) donde menciona que, naturalmente el número de folículos disponibles para la aspiración folicular varía considerablemente según la fase del desarrollo folicular, siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación, debido al mayor número de folículos y a la mejor eficiencia en la captación de ovocitos a partir de folículos de menores. Esta descripción está relacionada directamente con el planteamiento de Baruselli et al. (2016) 'El éxito de PIV depende en última instancia del número y la calidad de los complejos cumulus-oocyte (COC) recolectados durante el procedimiento de OPU'.

Por lo que si se mejora la eficiencia de los procedimientos y técnicas lograremos el máximo aprovechamiento de los animales con cualidades genéticas superiores como lo son generalmente las donadoras.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar si la manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman aumenta la producción *in vitro* de embriones.

1.4.2 Objetivos específicos

Verificar si hay diferencia en la cantidad y calidad de COC, tasa de clivaje y tasa de blastocisto en las donadoras cuando fue manipulada su dinámica folicular vs. cuando no fue manipulada.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis Alterna

La manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman aumenta la producción *in vitro* de embriones.

1.5.3 Hipótesis Nula

La manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman no aumenta la producción *in vitro* de embriones.

1.6 Alcance y Limitaciones del estudio

1.6.1 Alcance:

Este trabajo dejará como evidencia que maximizar las técnicas de OPU corresponderá a una mejor utilización de las donadoras de los sistemas de producción que buscan mejorar su genética. A base de aumentar la cantidad y calidad de ovocitos recolectados lo que representaría un posible aumento en la producción de embriones y conseguir un mayor número de embriones por aspiración. El obtener más embriones por el mismo costo de trabajo también representa ganancias directas para el productor.

1.6.2 Limitaciones:

En donadoras que se encontraban en un determinado estado reproductivo como gestante o prepúberes se inhabilita el uso de esta técnica por el empleo de hormonas exógenas que intervienen en el ciclo de la donadora.

Las donadoras pertenecen a clientes de la empresa por lo que son ellos quienes decidirán cuándo aspirar o no una donadora.

Se agregó un día más de visita a la finca respecto a los protocolos comerciales.

Algunas de las fincas se encontraban lejos de la ciudad lo cual representaría un aumento en lo presupuestado de la investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Ovogénesis

Según la revisión bibliográfica por parte de Murugavel, (2003) la describe de la siguiente forma:

“ Durante el tercio medio de la gestación el ovario del feto bovino se encuentra saturado de ovogonias que luego se convierten en ovocitos que son almacenados en folículos primordiales preantrales. Gran parte de esos ovocitos se inactivan durante la última mitad de la vida fetal naciendo así el animal con un único número de ovocitos encapsulado en su respectivo folículo. Existen cerca de 0.5 millones de folículos en los ovarios bovinos que gradualmente abandonaran su estado de latencia e iniciarán su desarrollo hacia folículos antrales” (Murugavel, 2003, 137).

También se encuentran descripciones por parte de Mattioli et al., (1994) en donde:

Los ovocitos presentes en el ovario se originan a partir de un número de células germinales primordiales (CGP) que derivan del endodermo del embrión en desarrollo; posteriormente migran hasta el mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Una vez establecidas en el ovario primordial, estas células pierden su motilidad y son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis, hasta que la última generación de ovogonias

entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios (Mattioli et al., 1994, 21, 223-232)

2.2 Foliculogénesis

Es descrita por Picton en 2001 de la siguiente forma:

“ Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, rodeado por un número específico de especies de células planas pre-granulosas (Picton, 2001) ”.

Que se continúa con la descripción de Santi, L. C. (2018) en la que se dice que:

“ Al adquirir la zona pelúcida se conoce como folículo preantral primario. En este estadio, comienzan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) que implica la transformación de células pre-granulosas que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH, se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular, a medida que la cantidad de líquido folicular aumenta, las cavidades también aumentan de tamaño formando la cavidad antral, denominándose folículo antral (folículo terciario)”. (Santi, 2018)

2.3 Dinámica folicular:

Explicada por Murugavel, (2003) de la siguiente manera:

“ El desarrollo folicular en el ovario del ganado bovino es una asociación dinámica de eventos organizados bajo control hormonal, creando ondas foliculares, la cual es definida con el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos de 4 a 5 mm de diámetro, pasando por diversas fases de reclutación, selección y dominancia por parte del folículo dominante (FD) y la consecuente regresión de los folículos subordinados ” (Murugavel, 2003, 137).

La primera onda de crecimiento folicular se identifica inicialmente en el día de la ovulación (día 0) y se reconoce ultrasonográficamente por la visualización de un grupo de folículos antrales (3 a 5 mm) que responden a las gonadotropinas. Esta etapa, denominada fase de reclutamiento, está asociada a la elevación de las concentraciones plasmáticas de la hormona foliculoestimulante – FSH (Adams, Matteri, Kastelic, Ko & Ginther, 1992b).

La concentración de FSH alcanza su máximo pico cuando el folículo más grande, denominado folículo dominante, alcanza el tamaño de 4-5mm (Ginther, Kastelic & Knopf, 1989b). En el inicio de esta fase, el crecimiento del FD y de todos los demás folículos, identificados como subordinados, ocurre gracias al FSH circulante (Adams et al., 1992b). A partir de ese momento, el FD crece de forma lineal, fase de crecimiento, por seis días, y las concentraciones periféricas

de estrógenos y andrógenos aumentan (Sunderland, Crowe, Boland, Roche, & Ireland, 1994).

Alrededor del día 3, y con un diámetro de aproximadamente 8,5 mm, el FD adquiere receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa, momento denominado (divergencia) desvío, y pasa entonces a ejercer su dominación (Garverick, Zollers, & Smith, 1993). Incluso con niveles basales de FSH, el FD alcanza su meseta tras la desviación (divergencia), gracias al efecto positivo del LH y tiene su crecimiento limitado por la progesterona (P4) secretada por el cuerpo lúteo – CL (Rajamahendra & Manikkan, 1994), que promueve la disminución de la frecuencia y aumenta la amplitud de los pulsos de LH (Bergfelt, Kojima, & Wehrman, 1995). El aumento de receptores para el LH permite que el folículo responda a la alta amplitud de los pulsos de esa hormona y continúe creciendo.

Al alcanzar la meseta, el FD entra en la fase denominada estática, en la que ejerce su dominio sobre los folículos subordinados, causando la atresia de estos, por seis días más (Ginther & Kastelic, 1989b). Después del período de dominación, y sin la secreción continua de los andrógenos producida por el FD, ocurre un nuevo pico de FSH. Este pico es responsable del inicio de una nueva onda de crecimiento folicular, que hace que el folículo dominante de la primera onda entre en atresia (Adams et al., 1992b). Este mecanismo puede ocurrir dos,

tres o cuatro veces en un mismo intervalo entre ciclos estrales (Ginther & Kastelic, 1989a).

De acuerdo con Fortune (1993), por un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotalámico-hipofisiario, la presencia de altas concentraciones de estradiol e inhibina producidas por el FD provoca la disminución de las concentraciones plasmáticas de FSH a niveles basales, bloqueando el crecimiento de los folículos FSH -dependientes y acarreado su atresia.

En un estudio, Fortune, Rivera & Yang (2004) demostraron la importancia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) en el mecanismo de dominancia. En el desarrollo folicular, parte de las acciones del IGF-I está involucrada en la estimulación de la célula de la granulosa, en la proliferación de la teca y en la esteroidogénesis (Spicer, Alpizar, & Echternkamp, 1993), responsables de la biodisponibilidad de receptores para FSH. La biodisponibilidad de los receptores para el FSH ya está presente en mayor cantidad en el folículo dominante tan pronto se identifica morfológicamente como FD, lo que demuestra su actuación de dominación concomitantemente a la emergencia de la onda folicular (Fortune et al., 2004).

El proceso de crecimiento y de atresia de los folículos perdura mientras el cuerpo lúteo se mantiene funcional y produciendo progesterona, lo que ocurre

incluso durante la gestación (Ginther et al, 1989b). Cuando no hay el reconocimiento materno de la gestación, determinado principalmente por el concepto, a través de la producción de interferón trofoblástico, y señalado para las células del endometrio, ocurre el proceso de luteólisis (Thatcher et al., 2001). El momento de la regresión del cuerpo lúteo determina si el FD será el folículo ovulatorio (Ginther et al, 1989b). El crecimiento del FD promueve el aumento de las concentraciones de estrógenos, que desencadena el mecanismo de retroalimentación positiva para la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y el consecuente pico de LH, promoviendo la ovulación (Fortune, 1993).

2.4 Ultrasonografía:

Es explicada por Santi, L. C. (2018) de la siguiente forma:

“ El principio de funcionamiento consiste en una corriente eléctrica que llega al transductor, donde produce una vibración en sus cristales; éstos emiten ondas sonoras que llegan a los órganos en estudio ”. (Santi, 2018).

Y Según Rosell et al., (2008) que completa con la siguiente descripción:

“Los tejidos tienen la capacidad de reflejar las ondas de sonido, y el eco resultante es recibido por el transductor, que lo convierte nuevamente en corriente eléctrica. Dentro del equipo la misma es decodificada y transformada en imágenes bidimensionales en tonos grises, blanco y negro”. (Rosell et al., 2008,)

2.4.1 Transductores:

Santi, (2018) nos da una breve explicación. "Un transductor o sonda emite ondas de sonido de baja intensidad y frecuencia elevada hacia los tejidos donde interaccionan con las interfases de los mismos. Las ondas que se reflejan de vuelta al transductor, son enviadas a través de la sonda al ecógrafo en donde son analizadas y convertidas en una imagen en una escala de grise".

Al aumentar la frecuencia del sonido emitido por el transductor , la imagen obtenida será precisa en la que podremos ver incluso estructuras más pequeñas (folículos de 2 mm). Por otra parte, entre menor es la frecuencia, podremos ver estructuras más alejadas del transductor como gestaciones más avanzadas. (Hofer, 2006, p. p. 6-9)

2.4.2 Examen ecográfico de ovarios

En la descripción de las estructuras encontradas en ultrasonografía del ovario por parte de Bellenda, (2002) tenemos que:

" Los Folículos son visibles como cavidades negras o anecogénicas, con un borde muy fino, a veces de contorno irregular por la compresión de otras estructuras del ovario, su tamaño va creciendo durante el ciclo estral, llegando el folículo dominante a 15-20 mm previo a la ovulación; mientras que el cuerpo lúteo (CL) se aprecia de forma circular con una protuberancia, más o menos prominente sobre la superficie del ovario, de un tono gris oscuro, en su interior se puede apreciar una pequeña cavidad con líquido".

2.4.3 Bomba de vacío

La bomba de aspiración es un dispositivo diseñado para la aspiración ovárica en bovinos y para el almacenamiento de los ovocitos en condiciones óptimas de temperatura para su posterior procesamiento. (Minitube, 2018)

Se realizan los siguientes pasos:

- Los ovocitos se aspiran del ovario de la vaca.
- Los ovocitos extraídos se recogen en una OPU precalentada medio.

Propiedades:

- Cuenta con un bloque de calentamiento de medios.
- Transmisión extremadamente rápida del vacío a la aguja.
- Vacío de aspiración regulable hasta -400 mmHg
- Temperatura de calentamiento ajustable hasta +50°C

2.4.4 Técnicas de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía OPU

La técnica de aspiración folicular transvaginal para la colección de ovocitos es una técnica que comenzó a implementarse en la mujer en la década de 1980 y es descrita en bovinos por Pieterse & Kappen, (1988, 30: 751-762). Posteriormente en la década de los noventa se abren nuevos horizontes en el campo de las biotecnologías de la reproducción (Santi, 2018).

Según Corredor and Paez, (2012) describe el procedimiento de la siguiente manera. "La técnica se realiza introduciendo el transductor por la vagina, manipulando desde el exterior de la vaca, mientras que la otra mano es introducida por el recto para fijar el ovario hacia la cabeza del transductor visualizando el ovario y los folículos en la imagen ecográfica, una vez fijado el ovario, con movimientos suaves y cuidadosos se atraviesa la pared vaginal con la aguja, puncionando los folículos, cuyo contenido es aspirado por la bomba de vacío y recolectado".

2.4.5 Procedimientos para la aspiración folicular OPU:

2.4.5.1 Preparación de la donadora

El animal debe ser inmobilizado en un brete, posterior a esto se le aplica anestesia epidural con (clorhidrato de lidocaína al 2%) 5 mL (Kruip et al., 1994), después de esto se extraen las heces que están en el recto y se realiza una buena desinfección de toda el área genital y perineal (Bols, 1997).

2.4.5.2 Aspiración folicular

Esta técnica es descrita por Bols, (1997) de la siguiente manera.

" Es llevada a cabo con equipo de ultrasonido y su respectivo transductor micro-convexo de 5 – 7.5 MHz, el mismo será acoplado con una guía de aspiración. La cual es introducida por la vagina y con ayuda de la otra mano del operador introducida por el recto, se procede a la localización y acercamiento del ovario al transductor, una vez seleccionado y ubicado el folículo mediante el

ecógrafo, se procede a la punción haciendo coincidir estos con la línea discontinua que aparece en la pantalla del ecógrafo (previa activación del menú punción), posteriormente se inicia la presión negativa, visualizando la aspiración al desaparecer de la pantalla la imagen del folículo”.

Para llevar a cabo la punción de los folículos se dispone de distintos tipos de agujas, largas o cortas, generalmente de 20 G, en conjunto a una línea de aspiración (tubo de silicona), conectada a tubos de centrifuga de 50 mL (Fry et al., 1994). Con una presión de aspiración ajustada entre 50 a 85 mmHg, se ha obtenido buenos resultados (Gibbons et al., 1994).

2.5 Filtrado

Santi, (2018) describe lo acontece después de la punción diciendo.

“El contenido de la punción cae directamente a un tubo de recolección, el cual se mantiene a una temperatura favorable para los ovocitos (36 - 38.5°C) hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los ovocitos colectados”.

Después de ser recolectados deberán ser filtrados con ayuda de un filtro mayor de 100 micras, posteriormente el contenido se lava con PBS y 10 UI/mL de heparina sódica (37° C), con la finalidad de eliminar la sangre (Nibart et al., 1995).

2.6 Clasificación de Ovocitos.

Según Lonergan et al, (1991) explica la clasificación de la siguiente manera.

“Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma, de estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV”.

CUADRO I . CATEGORÍAS DE COMPLEJO CUMULUS OVOCITO (CCOS)

Clase	Nº De Células Cumulus	Citoplasma
A	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (> 4).	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (1 a 3).	Homogéneo con zonas periféricas oscuras.
C	Desnudados	Irregular con zonas oscuras.
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras.

Lonergan et al. (1991).

Los ovocitos que presentan un cumulus oophorus compacto presentan mayores porcentajes de maduración, fertilización y desarrollo hasta la etapa de blastocisto a diferencia de los que presentan solo corona radiada (Gonella, et al., 2013).

2.7 Hormonas utilizadas para la manipulación de la dinámica folicular

2.7.1 Hormonas hipotalámicas.

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

Según Viscarra et al., (1997) explica que “ Esta hormona es transportada a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario al lóbulo anterior de la hipófisis, donde estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotrópicas de la hipófisis ”.

Que se continúa con la explicación de Jiménez & Rojas, (2020)

“Proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisiario para la liberación de FSH y LH de la hipófisis anterior. La secreción de las hormonas liberadoras hipotalámicas es modulada por los niveles de las hormonas secretadas en los órganos blanco primarios y secundarios. En el caso del GnRH, el control de la secreción es hecho por las propias gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, como por la progesterona y el estradiol (en la hembra)”.

Hormonas adenohipofisarias.

Segun Jiménez & Rojas, (2020) describen que:

“ La secreción de las gonadotropinas hipofisarias obedece a una modulación o feedback negativo por parte de los esteroides gonadales (estrógeno y progesterona en la hembra). La secreción basal de FSH y LH es pulsátil, siendo interrumpida por un pico masivo de LH durante el estro, el cual es disparado por un pico de GnRH, ocasionado por la mayor liberación de 17 beta estradiol durante el proestro (feedback positivo) ”.

2.7.2 Estrógeno

Es un esteroide que se secreta en la células de la teca interna del folículo el mismo tiene un efecto de retroalimentación positivo en el hipotálamo e hipófisis esto genera un aumento de la frecuencia de los pulsos de GnRH (Jiménez & Rojas, 2020). Por encima de un cierto nivel umbral de estrógeno, el hipotálamo responde con una descarga de GnRH, la cual induce una liberación de LH que inicia la ovulación (Garverick & Smith, 1993). El otro efecto principal del estrógeno es la inducción de síntomas de celo. El celo representa los síntomas físicos y de comportamiento que indican al macho que la hembra está en su fase fértil y de aceptación de la monta (Garverick & Smith, 1993).

Se describen diferentes tipos de estrógenos comerciales, que se distinguen entre sí por su vida media o duración (Jiménez & Rojas, 2020). Dentro de los diferentes tipos de estrógenos disponibles en el mercado se pueden citar:

- 17 Beta estradiol (17 β E). Estrógeno natural, vida media muy corta (24-36 horas).
- Benzoato de estradiol (BE). Se caracteriza por ser de vida media corta (3 días).
- Valerato de estradiol (VE). Tiene vida media larga, variando entre 7 a 9 días.
- Cipionato de estradiol (CE). Posee vida media muy larga, entre 10 a 12 días.

2.7.3 Progesterona

Esta es una hormona indispensable en el ciclo normal de la hembra bovina, la misma es la responsable de mantener la gestación después de haberse dado una concepción (Jiménez & Rojas, 2020). Disminuye la descarga pulsátil de GnRH y por ello impide nuevas ovulaciones (Erb & col, 1968); además, prepara el endometrio para la implantación del embrión en desarrollo, inhibe las contracciones de la pared uterina y juega un papel importante en la producción de interferón tau y en el reconocimiento de la gestación (Inskeep, 2004) (Spencer & col, 2007).

2.7.4 Prostaglandina F2 alpha (PGF)

La PGF se produce en el endometrio. La PGF₂ α es luteolítica, lo que significa que inicia la regresión del cuerpo lúteo. Esto trae como consecuencia que la concentración de la progesterona en la sangre descienda, desapareciendo el bloqueo ejercido por la progesterona sobre la liberación de la GnRH (Inskeep, 2004).

2.8 Métodos de manipulación de la dinámica folicular

2.8.1 Priming Folicular

Priming fue diseñado para imitar el pico endógeno de FSH que ocurre antes del inicio de cada ola folicular mediante la aplicación de gonadotropinas, promoviendo un aumento en el número de folículos reclutados que emergen en una nueva ola posterior al tratamiento (Adams, 1994). Rajamahendran et al.

(1987) y Touati et al. (1991) demostraron un efecto beneficioso de los pretratamientos con gonadotropinas sobre las respuestas superovulatorias, pero otros autores como Rieger, Desaulnier y Goff (1988) no obtuvieron el mismo resultado. Grasso et al. (1989) y Guilbault et al. (1991) encontraron que los pretratamientos tienen un efecto adverso sobre la superovulación. Este efecto adverso podría estar relacionado con el momento de inicio de los tratamientos, ya que los iniciados después del segundo día del ciclo pueden estimular el desarrollo de la FD, llevando los folículos subordinados a la atresia.

Murphy et al. (1984) observaron que las gonadotropinas derivadas de extractos crudos de hipófisis presentaban una variación contaminada con LH en su constitución. Este producto contaminado con LH, cuando se usa para cebado, podría promover la luteinización del DF y no la estimulación de otros folículos. Sin embargo, cuando se usó FSH altamente purificada del extracto pituitario, mejoró la respuesta superovulatoria, lo que demuestra el efecto beneficioso de la FSH en la estimulación de los folículos antrales pequeños para que respondan mejor a las gonadotropinas en tratamientos posteriores (TOUATI et al., 1991)

Sin embargo, la eficiencia del cebado en protocolos de la superovulación todavía suscita dudas, ya que los estudios enfocados en el tema no mostraron regularidad, ni en relación a las fechas de los pretratamientos, ni en relación a la bioactividad de las gonadotropinas administradas.

2.8.2 Aspiración folicular

De acuerdo con Adams et al. (1992b), al día siguiente de la remoción del DF por electrocauterización, comienza un pico de FSH, responsable de la aparición de una nueva ola de crecimiento folicular aproximadamente dos días después de la cauterización.

En un intento de aprovechar este método de sincronización de ondas foliculares para programas de superovulación, Bergfelt et al. (1997) compararon dos grupos de vaquillonas superovuladas: en el primer grupo, la superovulación se inició un día después de la aspiración y extracción del FD; en el segundo grupo -control-, los tratamientos con FSH se iniciaron los días 8, 9, 10, 11 y 12 después de observado el estro. El número medio de embriones y/o estructuras recolectadas, así como el número y porcentaje de embriones viables no difirieron entre grupos. Aunque no hubo diferencia significativa entre los grupos, los autores identificaron una deficiencia en el diseño experimental del grupo aspirado, que podía controlar inadecuadamente la fase lútea, provocando ovulaciones prematuras y regresión incompleta del CL.

Para superar esta situación, se llevó a cabo un segundo experimento, en el que los animales del grupo evaluado recibieron un implante auricular de progestágeno que contenía 6 mg de norgestomet (Syncro-Mate-B) después de la aspiración. Nuevamente, no hubo diferencia significativa en la respuesta superovulatoria entre los grupos, pero el grupo de aspiración + progestágeno mostró una respuesta más consistente en relación con el número de embriones

viables y transferibles, lo que confirma que el control de CL es necesario (BERGFELT et al., 1997).)

En otro estudio, animales sometidos a aspiración del FD dos días antes del inicio de la superovulación -realizada durante el diestro- tuvieron una mayor respuesta superovulatoria que aquellos en los que se inició SPO en presencia de un FD (BUNGARTS; NIEMAN, 1994).

2.8.3 Tratamiento con progestágenos / progesterona asociada a estradiol.

En la actualidad, se encuentran en el mercado varios productos a base de progestágenos o progesterona asociada a estradiol que se utilizan en protocolos de sincronización de la dinámica folicular y del celo.

Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado varios productos a base de progestágeno o progesterona asociada a estradiol para protocolos de sincronización de la dinámica folicular y el celo. El propósito de estos productos es reemplazar el CL natural por uno artificial, para evitar el celo y la ovulación. Inicialmente, la asociación entre progestágeno/progesterona y estradiol tenía como objetivo inducir al útero a liberar prostaglandina (PGF) y, en consecuencia, provocar la luteolisis (WILTBANK; KASSON, 1968). Sin embargo, tras el descubrimiento de su capacidad luteolítica en rumiantes, la prostaglandina y sus análogos se convirtieron en los agentes luteolíticos de elección, ya que promueven mejores respuestas que las obtenidas con estradiol (LEMON, 1975).

Pierson y Maplesoft (1991) y Bo et al. (1993, 1994a, 1995a) llevaron a cabo una serie de experimentos destinados a evaluar el efecto del estradiol y los progestágenos sobre la dinámica folicular. Los resultados mostraron que el estradiol exógeno inhibe el crecimiento del DF, efecto que es más pronunciado cuando se utiliza la combinación progestágeno + estradiol. La DF de vaquillas tratadas con 5 mg de estradiol 17 beta (E-17 β) un día después de la inserción del implante de progestágeno detuvo el crecimiento, entrando en atresia, al día siguiente de la aplicación de E-17 β . Este evento condujo a la aparición de una nueva ola de crecimiento folicular $4,3 \pm 0,2$ días después de la aplicación del fármaco (BO et al., 1995a). Sin embargo, cuando se aplicó 17 β estradiol a novillas sin el progestágeno, no se observó supresión de la FD y, en consecuencia, la aparición de la nueva onda folicular fue impredecible (BO et al., 1996a).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Finalidad del estudio: analítico.

Secuencia Temporal: transversal.

Control de asignación de los factores de estudio: experimental.

Inicio del estudio en relación a la cronología de los hechos: prospectivo.

Lugar:

El estudio fue llevado a cabo en distintas provincias del país en fincas dedicadas a cría de ganado Brahman puro de registro, los que se dedican a la venta de reproductores y hembras para el mejoramiento genético del rebaño panameño. Las distintas fincas estaban distribuidas en las provincias de Panamá, Panamá Oeste y Chiriquí.

Animales:

Para este estudio se utilizaron 17 donadoras Brahman multíparas de alto valor genético con edades (6 - 15 años) escogidas entre sus rebaños por sus características productivas sobresalientes y su progenie. Dentro del manejo nos encontramos con animales que estaban en pasturas y que recibían suplementación con sales minerales *ad libitum*, las mismas tenían su control sanitario al día y con buen estado de salud.

Las donadoras fueron escogidas por un muestreo a conveniencia; a razón de las aspiraciones que fue realizando la empresa, en los meses de agosto a diciembre de 2022, en las fincas que fueron destinadas al estudio.

Criterio de inclusión:

- Bovinos hembras donadoras de raza brahman, registradas.
- De edad entre 4-15 años.
- Vacas multíparas.
- Vacas de características productivas sobresalientes.
- Vacas con buena alimentación y suplementación de sales minerales.

Criterios de exclusión:

- Vacas que no sean donadoras de raza brahman registradas.
- Vacas que estén preñadas.
- Vacas que no se ha comprobado sus características reproductivas.

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales de Sincronización:

- Guantes de Latex.
- Dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PROCICLAR Zoovet®).
- Aplicador de DIB.
- Benzoato de estradiol Von Franken®.
- Cipionato Von Franken®.

- gonadotropina coriónica equina (eCG) (FOLLIGON®).
- PGF-2 (D-Cloprostenol) (Ciclar-Prostaglandina sintética -Zoovet®).
- Jeringas de 5 ml.
- Jeringas de 3 ml.
- Jeringas de 1 ml.
- Agujas de calibre 20 G 1 x 1.5".

3.1.2 Materiales de OPU:

- Equipo de ultrasonido (ecógrafo) Mindray Dp 20.
- Transductor micro-convexo multifrecuencia.
- Guía de Aspiración folicular WTA.
- Bomba de vacío para aspiración folicular BV-003 .
- Tapón de aspiración (WTA Brazil).
- Línea de aspiración folicular.
- tubos de ensayo Thermo de 50 ml esteril.
- Platos petri de 60 y 100mm.
- Solución PBS.
- Heparina Sódica.
- Estereoscópico leica zoom Mr.
- Pipeta de 10 ul y 100 ul.
- jeringas de 5 ml.
- Agujas de calibre 20 G 1 x 1.5".
- Lidocaína 2%.
- transportador-12 compacto de ovocitos.

3.2 Metodología

La sincronización fue llevada a cabo por el personal técnico de la empresa Born Animal Biotechnology, todas las vacas del experimento fueron sometidas a dos sesiones de OPU, la primera fue del grupo tratado que se sometió a un protocolo de sincronización para ser aspiradas el día dos después de la ovulación. La segunda sesión fue del grupo control en la que las vacas fueron aspiradas en un día aleatorio del ciclo estral.

Sincronización

Todas las donadoras para su primer sesión de OPU recibieron en el día 0 del protocolo un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PROCICLAR Zoovet®) que contenía 0.75 g, además 2 mg de BE (Benzoato de estradiol ZOOVET®) i.m. En la mañana del día 8, se retiró el dispositivo intravaginal liberador de P4 y se aplicó 0.5 mg de cipionato de estradiol (Cipionato ZOOVET®) i.m., 0.15 mg de PGF-2 (D-Cloprostenol) (Ciclar-Prostaglandina sintética -Zoovet®) i.m. El día 10 del protocolo recibieron 0.008 mg de buserelina acetato (Buserelina ZOOVET®) (grupo tratamiento) y se consideró este día como el día de la ovulación.

Para su segunda sesión de aspiración no se realizó ningún tratamiento hormonal y fueron aspiradas en un día aleatorio del ciclo estral (grupo control).

CUADRO II. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES EN LOS DÍAS DEL PROTOCOLO EN CONJUNTO AL SUCESO FISIOLÓGICO QUE SE PRESENTA.

Día 0	Día 8	Día 10	Día 12
DIV+BE	Retiro de DIV Cipionato, Prostaglandina	Gnrh	OPU
Día aleatorio del ciclo estral.	El retiro representa una disminución brusca de P4 y la eliminación del cuerpo lúteo.	Se coloca gnrh para asegurar la ovulación y se considera teóricamente como el día de la ovulación.	Se aspira porque los folículos deben encontrarse en el mismo estado de desarrollo.

Fuente: El Autor.

Aspiración folicular (OPU - Ovum Pick-Up)

Las donadoras fueron inmovilizadas con un brete, a estas se les colocó anestesia epidural, 3 ml de lidocaína 2%, se administró entre la última vértebra sacra y la primera coccígea para facilitar la manipulación de los ovarios, se comprobó que hubiese pérdida del reflejo caudal y se limpió con agua y papel la parte externa de la vulva. Posteriormente se introdujo por la vagina hasta el final del saco ciego la guía de aspiración compuesta por un transductor micro-convexo multifrecuencia de 5- 8.5 MHz.

Para la aspiración se utilizaron agujas desechables 20G 1 x 1.5 (nipro), conectadas a un sistema de aspiración que va conectado a una bomba de vacío con una presión negativa entre 90 y 110 mmhg y con un caudal de 13 a 15 ml por minuto. Todos los folículos que eran visibles mayor a 2 mm, fueron aspirados y enviados a un tubo colector de 50 ml. Posteriormente fueron evaluados y seleccionados por su calidad.

Se realizó la selección y clasificación de los ovocitos totales y viables. Posteriormente los que se seleccionaron fueron transportados al laboratorio en una incubadora a una temperatura de 37-39 °C. y después fueron fertilizados *in vitro*.

Producción de embriones

Los embriones fueron producidos *in vitro* por la compañía panameña Born Animal Biotechnology por el mismo técnico bajo los mismos métodos de producción y estos fueron evaluados el día 7 post-fertilización *in vitro* y se determinó el porcentaje final de producción.

Análisis de datos

Los datos fueron recolectados a través del programa Microsoft office Excel, detallados según los parámetros que necesitamos evaluar basados en la tabla que nos proporcionó la empresa.

CUADRO III. TABLA PARA LOS DATOS DE PRODUCCIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES RESPECTIVAMENTE.

DONANTE	TORO	OVOCITOS			CIV	CLIVAJE		EMBRIONES Total
		Total	Viables	% Viables		Clivaje	%Clivaje	
TOTAL								

Fuente: Born Animal Biotechnology.

Definiciones de datos:

- Ovocitos totales: cantidad total de ovocitos recuperados por cada donante aspirada.
- Ovocitos viables: son los ovocitos que fueron clasificados según su calidad (COC) y que cumplen con las características necesarias para ser fertilizados.
- Porcentajes de viables: en el resultado de la división de ovocitos viables entre el total de ovocitos.
- CIV: son los ovocitos que llegaron a ser cultivados *in vitro*.
- Tasa de clivaje: es el porcentaje de ovocitos totales que luego de ser cultivados inician el proceso de división celular.
- Embriones totales: son todos obtenidos después de un proceso de PIV.
- Porcentaje de producción de embriones: se define como la cantidad total de blastocistos entre la cantidad de ovocitos totales.

- **Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba de T-Student para llevar a cabo el análisis de esta investigación. Está es descrita por Sánchez, (2015) como: el procedimiento utilizado para examinar las diferencias entre dos muestras independientes y pequeñas que tengan distribución normal y homogeneidad en sus varianzas, permitiéndonos comparar muestras, $N \leq 30$ y/o establece la diferencia entre las medias de las muestras.

3.3 Parámetros a evaluar

Los principales parámetros a evaluar fueron: calidad y cantidad de ovocitos totales, cantidad de ovocitos viables y tasa de conversión a embrión.

- Tasa de conversión de embriones que se define como la cantidad total de blastocistos entre la cantidad de ovocitos totales.
- Cantidad de ovocitos totales en los animales tratados y no tratados.
- Cantidad de ovocitos viables entre las donadoras tratadas y no tratadas.

4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se llevó a cabo una prueba de Leven para evaluar la igualdad de las varianzas en una variable calculada para dos o más grupos y posteriormente se realizó una prueba de t student que tiene la finalidad de examinar las diferencias entre dos muestras independientes y pequeñas que tengan distribución normal y homogeneidad en sus varianzas.

TABLA I. PRUEBAS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES.

Prueba de muestras independientes						
	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias			
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
Total ovocitos	0.00	0.986	-0.51	32	0.612	-1.18
Viabiles	0.03	0.856	-0.34	32	0.733	-0.59
% Viabiles	0.62	0.438	1.02	32	0.313	0.06
CIV	0.01	0.925	-0.42	32	0.678	-0.88
Clivaje	0.03	0.871	-0.60	32	0.556	-1.00
%Clivaje	2.37	0.134	-0.08	32	0.938	-0.01
Total embriones	0.58	0.453	-0.05	32	0.963	-0.06
% Producción Total	0.06	0.816	0.76	32	0.454	0.08

El resultado de la prueba de t student nos permitió conocer si en las variables a analizar había alguna diferencia estadística entre el grupo control y el grupo tratado; por medio de los valores de la significancia bilateral, en estos valores para que haya diferencia significativa deben ser menores de que 0.05 y en este

caso los valores son superiores al 0.05 demostrando que no hay una diferencia estadística entre los grupos que recibieron un tratamiento y el grupo control.

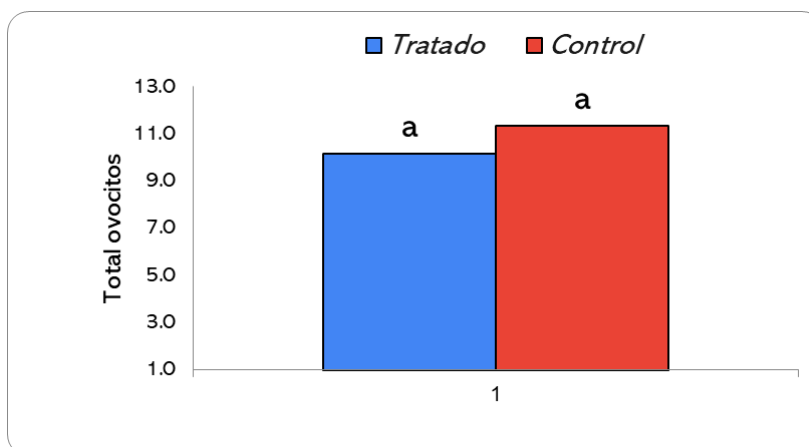
TABLA II. MEDIA DE LAS DISTINTAS VARIABLES DEL GRUPO TRATADO Y CONTROL.

Tratamiento	Total ovocitos		Viables		% Viables		CIV		Clivaje		%Clivaje		Total embriones		% Producción Total	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
Media	10.2	11.4	7.9	8.5	79.6%	73.1%	9.1	10.0	6.4	7.4	78.8%	79.4%	3.6	3.7	43.2%	35.5%
Desviación estándar	6.6	6.7	5.0	4.9	13.5%	22.3%	6.0	6.3	4.7	5.0	15.5%	26.8%	3.4	4.0	29.2%	30.1%
Error estándar	1.6	1.6	1.2	1.2	3.3%	5.4%	1.4	1.5	1.2	1.2	3.8%	6.5%	0.8	1.0	7.1%	7.3%

Se agruparon los datos recopilados de los animales tratados y los del grupo control para realizar un mejor análisis, en el que se comparan la media de los valores obtenidos en cada variable a investigar. Los resultados demostraron que en cada una de las variables medidas respecto a su media no hay una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado.

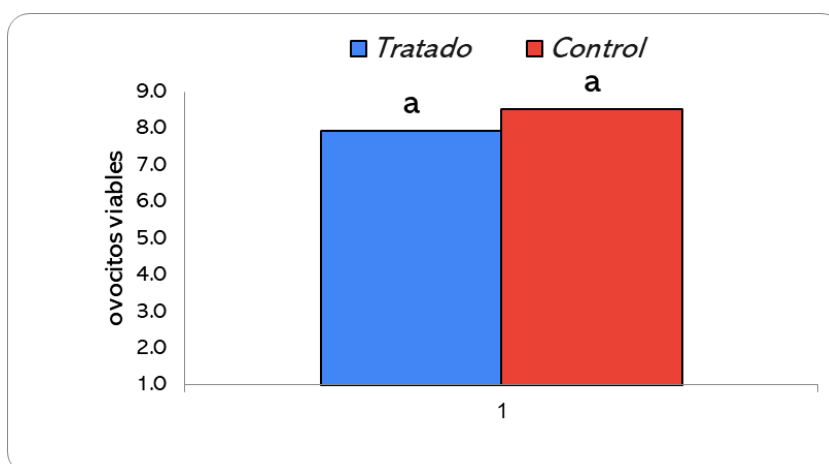
Solo en dos de las variables se encontró la particularidad de que la media de las donadoras tratadas tenía una tendencia numérica al aumento cuando se compara con la media del grupo control.

GRÁFICO I. COMPARACIÓN DEL TOTAL DE OVOCITOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.



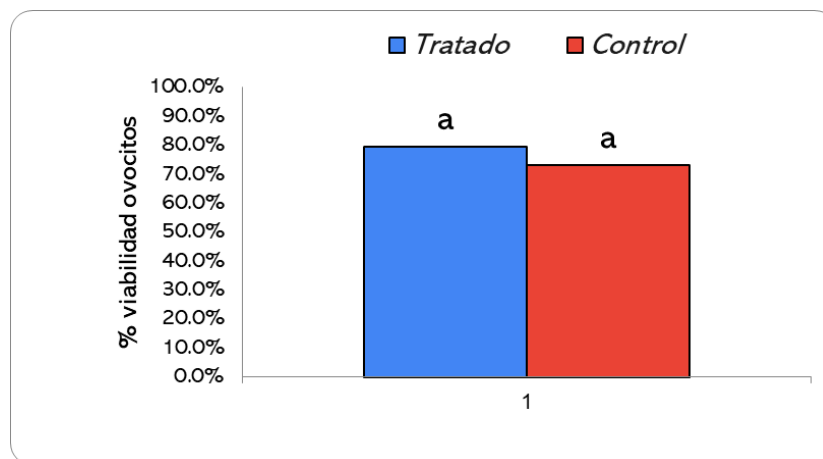
En el total de ovocitos obtenidos no hubo diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado.

GRÁFICO II. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE OVOCITOS VIABLES DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.



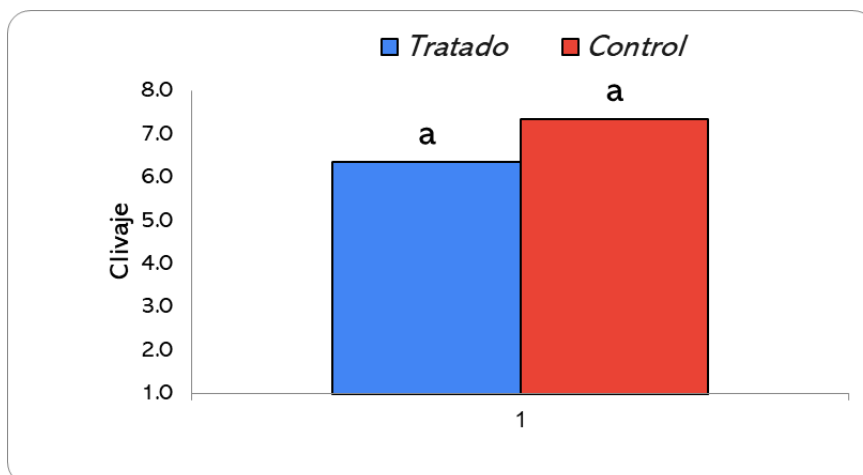
En cuanto al número de ovocitos viables no se presentó una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado.

GRÁFICO III. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE OVOCITOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DEL GRUPO CONTROL.



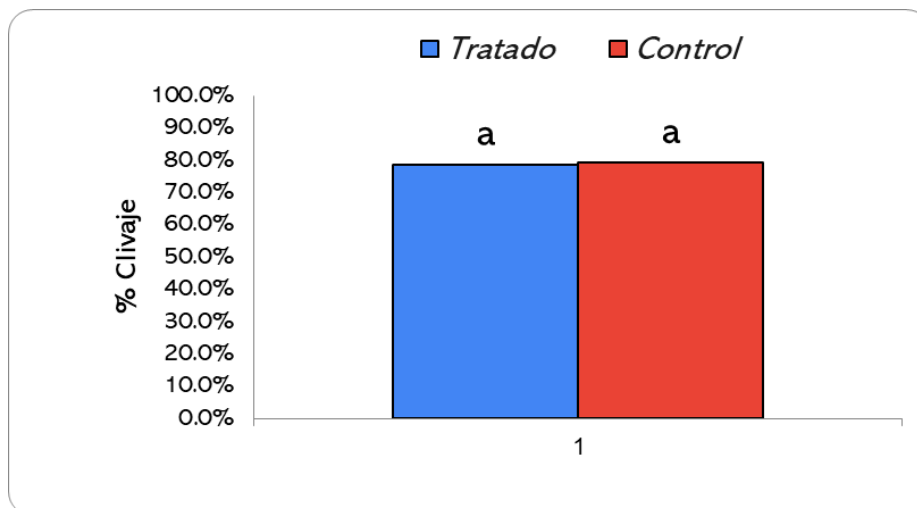
En el porcentaje de viabilidad no se encontró diferencia significativa entre las donadoras del grupo control y las tratadas.

GRÁFICO IV. COMPARACIÓN DEL CLIVAJE DE LAS DONADORAS DEL GRUPO TRATADO CONTRA LAS DONADORAS DEL GRUPO CONTROL.



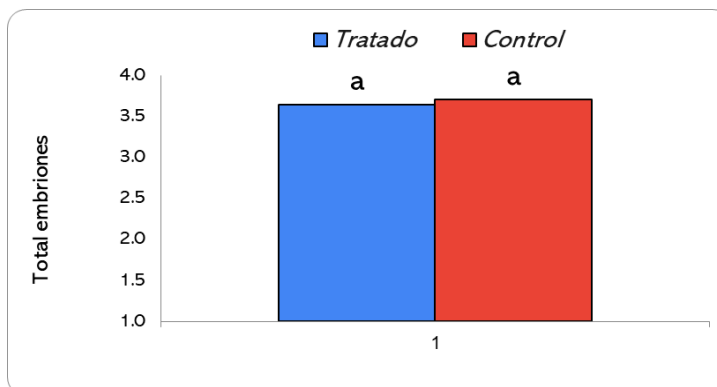
En cuanto al clivaje no se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y el de donadoras tratadas.

GRÁFICO V. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE CLIVAJE DE LAS DONADORAS TRATADAS Y EL DE LAS DEL GRUPO CONTROL.



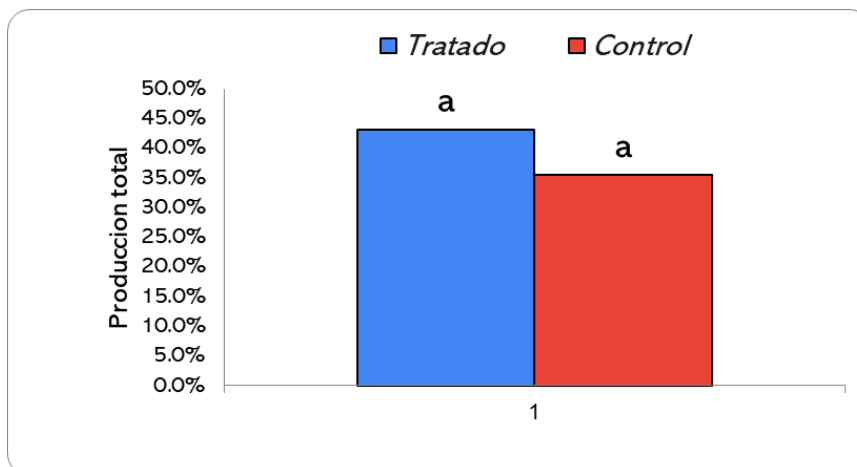
En el porcentaje de clivaje no hubo una diferencia significativa entre el grupo control y las donadoras tratadas.

GRÁFICO VI. COMPARACIÓN DEL TOTAL DE EMBRIONES OBTENIDOS DE LAS DONADORAS TRATADAS Y LAS DONADORAS DEL GRUPO CONTROL.



Para el total de embriones nos encontramos que no hubo diferencia significativa entre las donadoras del grupo control y las que fueron sometidas a tratamiento.

GRÁFICO VII. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN TOTAL DE EMBRIONES DEL GRUPO DE DONADORAS TRATADAS CONTRA LAS DEL GRUPO DE DONADORAS CONTROL.



En el porcentaje de producción total de embriones no se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de donadoras tratadas.

5. DISCUSIÓN

En nuestro estudio se evaluó el efecto de la manipulación de la dinámica folicular en donadoras Brahman como estrategia para llevar a cabo una OPU en un momento específico del desarrollo folicular dado que, naturalmente, el número de folículos disponibles para aspiración folicular presenta una variación considerable conforme a la fase de crecimiento folicular, siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación, por el mayor número de folículos y la mayor eficiencia en la captación de los ovocitos a partir de folículos menores, Seneda et al., (2001). Adicionalmente a esto hay evidencia de que cuando la OPU es realizada independientemente de la fase del ciclo estral se presenta hasta un 85% de folículos atrésicos (Bacelar et al., 2009).

En nuestros resultados, para el total de ovocitos se obtuvieron valores de media de 10.2 en el grupo tratado y 11.4 en el grupo control con una significancia bilateral de ($P > 0.05$), indicando que no hubo una diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Estos resultados fueron para donantes brahman *bos indicus*. Resultados parecidos fueron obtenidos por Bols (1998) con donadoras holstein *bos taurus*, aunque son especies distintas, también fueron sometidas a sincronización de la dinámica folicular y otro grupo a un tratamiento placebo para posteriormente realizar OPU dos veces por semana, este estudio mostró que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el total de ovocitos para el grupo tratado y el grupo control; dicho resultado se lo

atribuyó a que las OPU repetidas pudieron inducir un cierto grado de aciclicidad tanto en el grupo tratado como en el grupo control. En cambio P, Baruselli (2016) describió un artículo en el que un grupo de donadoras *Bos indicus* fue tratado para la manipulación de la dinámica folicular mientras que otro grupo no fue tratado, las donadoras que recibieron el tratamiento presentaron una mayor cantidad de ovocitos recuperados que aquellas que no recibieron tratamiento. Es posible que el tratamiento utilizado por P, Baruselli (2016) que incluía FSH; distinto del nuestro puesto que es una hormona difícil de adquirir en el mercado, ocasionó una mejor respuesta en los folículos de la nueva onda folicular, que se genera cuando se manipula la dinámica, aumentando así el total de ovocitos, esta teoría se sustenta con lo dicho por Touati et al., (1991) quien demostró un efecto beneficioso de la FSH en la estimulación de pequeños folículos antrales.

Nuestra siguiente variable analizada fue la cantidad de ovocitos viables cuyos resultados mostraron que no hubo una diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control. Diferente a nuestros resultados, Ongaratto et al., (2020) realizó un estudio en que comparó los de resultado de OPU y PIV de tres grupos de donadoras Angus *bos taurus* de los cuales a los dos primeros se les manipuló la dinámica y al último no se le manipuló para ser tomado como grupo control, los resultados mostraron que el número de viables fue mayor en los grupos tratados que en el grupo control. Sin embargo, Barboza et al., (2017) realizó un estudio de dos tipos de manipulaciones ováricas en donadoras holstein *bos taurus* contra un grupo control no manipulado y reportó que dicho tratamiento no aumentó el número de ovocitos viables en el grupo tratado

cuando se le comparó con el grupo control, en este estudio se relaciono el resultado con la población de folículos antrales sugiriendo que cuando las donadoras tienen mayores poblaciones de folículos antrales se ha presentado mayor número de ovocitos viables.

En el mismo sentido nos encontramos con el porcentaje de viables, esta variable nos indicó que no hubo una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado pero sí se presentó una tendencia numérica al aumento por parte de las donadoras tratadas (T=79.6% vs C=73.1%). Esto es concordante con los resultados de Barboza et al., (2017) quien tampoco encontró una diferencia significativa para la misma variable pero sí una tendencia al aumento en el grupo tratado respecto al grupo control, esto nos podría indicar que a pesar de que las donadoras sean de especies distintas los ovocitos presentan mejores características para llegar a ser fertilizados cuando son aspirados en la misma etapa del desarrollo folicular.

Las tasas de clivaje no mostraron una diferencia significativa en nuestro estudio entre el grupo tratado y el grupo control. De igual manera resultó en el estudio de P. Baruselli (2016) en el cual las tasas de clivaje no se vieron alteradas por la manipulación de la dinámica folicular con FSH, demostrando que en ambos estudios el clivaje de los ovocitos no fue afectado al manipular la dinámica de las donadoras aun cuando se utilizaron protocolos distintos.

Concerniente al análisis del total de embriones producidos, los resultados de nuestro estudio no mostraron una diferencia significativa, representandose en valores de (3.6 para las donadoras tratadas y 3.7 las donadoras control);

resultado que es concordante con el de Goodhand, K.L. et al (2000) quien realizó un estudio sobre la OPU y PIV en un grupo de donadoras *Bos taurus* tratadas para la manipulación de su dinámica y concluyó que no hubo una diferencia significativa en el número total de embriones producidos entre el grupo tratado y el grupo control. De igual manera Ongaratto et al., (2020) sustenta que a pesar de estimular hormonalmente las donadoras no difirió el número de blastocistos obtenidos en sus grupos de tratamiento y control. Todos estos resultados son semejantes a los de Bols (1998) quien expone que en su estudio el número promedio de blastocistos cultivados por vaca por sesión no difirió significativamente entre el grupo tratado y el control. El número final de blastocistos cultivados está determinado por la calidad inicial del COC, así como de muchos otros factores relacionados con las condiciones de PIV (Bols, 1998).

En relación con esto, los resultados que obtuvimos en los porcentajes de producción total de embriones tampoco encontramos una diferencia significativa estadísticamente hablando entre los grupos tratados y no tratados. Similar a lo ocurrido en el estudio presentado en la revisión de P. Baruselli (2016) en el que donadoras *Bos indicus* sometidas a manipulación de la dinámica folicular antes de la OPU no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de producción total de embriones entre el grupo tratado y el control. Aunque en nuestro estudio no hubo diferencia significativa es importante destacar que los porcentajes de producción de embriones de las donadoras tratadas fueron numéricamente mayor en las donadoras tratadas cuando se les comparó con el grupo control, presentándose en porcentajes de (43.2% para las tratadas y 35.5% para el

control), concordante a los ocurrido en los resultados de los porcentajes de ovocitos viables. Siendo esto congruente con el estudio antes mencionado por parte de Ongaratto et al., (2020) quien propone que el aumento del porcentaje de blastocistos producidos en las donadoras que trató es gracias a que estas tuvieron un mayor número de ovocitos colectados que las no trató. Permitiéndonos a nosotros teorizar que nuestros porcentajes de ovocitos viables con una tendencia numérica al aumento en las donadoras tratadas podrían ser indicadores de una posible mejoría en la calidad de los ovocitos en los animales tratados cuando se compara con el control, para que así estos mejoren los porcentajes de producción total de embriones.

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación podemos concluir que:

- El manipular la dinámica folicular de donadoras brahman con un protocolo comercial no ejerce una diferencia significativa entre grupos para el total de ovocitos aspirados.

- La manipulación de la dinámica folicular en donadoras brahman no produjo una diferencia significativa para el número de ovocitos viables recuperados, como tampoco lo hace en sus porcentajes, sin embargo, el porcentaje de ovocitos viables recuperados presenta una tendencia numérica al aumento en el grupo de donadoras tratadas, esto nos podría sugerir que manipulando la onda folicular y logrando aspirar en el inicio del desarrollo de los folículos, se mejora la calidad de los ovocitos recuperados, no obstante, más estudios deben ser llevados a cabo para comprobar esta teoría.

- El clivaje de ovocitos no se ve afectado al manipular la dinámica folicular de las donadoras brahman con un protocolo comercial.

- Utilizar un protocolo comercial para manipular la dinámica folicular de donadoras brahman en Panamá no tiene diferencia significativa para el porcentaje de producción de embriones. Sin embargo, tuvo tendencia a un mayor porcentaje producción de embriones, en donadoras tratadas, lo que por consecuencia genera un aumento en la producción de ganado puro y esto a su vez podría influir en el resultado económico final de estas prácticas. Sin embargo, más estudios deben ser realizados para comprobar la viabilidad económica de la aplicación de esta estrategia.

7. RECOMENDACIONES

Al finalizar esta investigación podemos proponer las siguientes recomendaciones:

- Procurar realizar evaluación de la población folicular de las donantes previo a la OPU ya que esto nos permitirá conocer cuales son las mejores donadoras del rebaño y también nos deja estimar su futuro desempeño en la OPU y PIV.
- Se sugiere que para futuros estudios se realicen con un (n) mayor para así aumentar la confiabilidad estadística a los resultados.
- Se aconseja realizar un análisis de costo/beneficio para determinar la viabilidad económica de esta práctica.
- Se propone que en futuras investigaciones se clasifiquen los grupos según su edad para obtener resultados más homogéneos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Adams, G. P. (1994). *Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization & superstimulation*. sciencedirect.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80044-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80044-5)
- Adams G.P., Matteri RL, Ginther OJ. 1992a. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J Reprod Fertil*;95:627-640.
- Adams, G. P.; Matteri, R. L.; Kastelic, J. P.; Ko, J. C. H.; Ginther, O. J. 1992b. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 94, p. 177- 188
- Bacelar, D., Contanstino, M., Padilha, L. C., & Barreiro, T. (2009, Marzo 31). *Enhancement of oocytes obtainment in Nelore heifers (Bos taurus indicus) treated with progesterone injection and benzoate of estradiol*. redalyc.org.
<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744095015.pdf>
- Barboza, J. C., Ferreira, R. M., & Maturana, M. (2017, Marzo 1). *Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows*. sciencedirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X1630556>
- 8
- Barros, C. M.; Figueiredo, R. A.; Pinheiro, O. L. 1995. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 19, p. 9-12.

- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., Guerreiro, B. G., Bayeux, B. M., Sales, J. N. S., Souza, A. H., & Gimenes, L. U. (2016). Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction*, 13(3), 264–272. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar861>
- Bellenda, O. (2003). *La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo*. Montevideo, Uruguay.
- Bergfeld, D.R.; Kojima, F. N.; Wehrman, M. E.; Cupp, A. S.; Peters, K. E.; Mariscal, V.; Sanchez, T.; Kittok, R. J.; Garcia-Winder, M.; Kinder, J. E. 1995. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the 76 progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. *Animal of Reproduction Science*, v. 37, p. 257-265.
- Bols, P.E., M.T. Ysebaert, A. Van Soomand and A. Kruif 1997. Effects of needle tip level and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocytes complexes. *Theriogenology* 47:1221-1236.
- Bols, P. E. (1998, Abril 1). *Efectos del tratamiento a largo plazo con somatotropina bovina sobre la dinámica folicular y el posterior rendimiento de ovocitos y blastocistos en un programa de opu-fiv*. sciencedirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X9800047>

- Corredor, E. and E. Páez. 2012. "Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión." *Ciencia y Agricultura* Vol. 9 - Nº. 2; pag 2937 http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_agricultura/article/view/2813/2581
- Douar, C. 1998. Effect de la composante maternelle sur le development in vitro de l'embryon bovin. *Maitrise Sciences Vétérinaires. Physiologie de la Reproduction. Ecole Nationale Vétérinaire Maison-Alfort*: 17-24.
- Embryo Technology Newsletter. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. v. 36(n.4).
- Erickson, B. h. (1966, agosto 1). Desarrollo y senescencia del ovario bovino postnatal. Oxford Academic. Retrieved June 8, 2022, from <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/25/3/800/4700168?redirectedFrom=fulltext>
- Fortune, J.E. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: A limiting factor in improvement of fertility. *Animal Reproduction Science*, v.33, p.111-125
- Fortune, J.E.; Rivera, G.M.; Yang, M.Y. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in the selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.109-126.
- Fry, R.C., T.C. Simpson, T.J. Squires, R.A. Parr, and R.M. Damanik. 1994. Factors affecting transvaginal oocytes pick-up in heifers. *Therionelogy* 41:197.

- Garverick H.A.; Smith M.F. 1993. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9:223-247
- Gibbons, J.R., W.E. Beal, R.L. Krisher, E.G. Faber, R.E. Pearson and F.C. Gwazdauska. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 94, 41:206 abstr.
- Ginther, O. J.; Kastelic, J. P.; Knopf, L. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal of Reproduction Science*, v. 20, p.187-200
- Ginther, O. J.; Kastelic, J. P.; Knopf, L. 1989b. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, v.32, p. 787-795.
- Gonella, A., J. Atuesta, S. Bernal and L. Chacón. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*; Volumen 4 Número; pag 65-80.
- Goodhand, K. L., Staines, M. E., Hutchinson, J. S., & Broadbent, P. J. (2000). Recuperación de ovocitos in vivo y producción embrionaria in vitro a partir de donantes de ovocitos bovinos tratadas con progestágeno, estradiol y FSH. *Ciencia de la reproducción animal*, 63(3-4), 145–158.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00186-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00186-x)
- Guilbault, L. A., Grasso, F., Lussier, J. G., Rouillier, P., & Matton, P. (1991, Febrero). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in

the presence of a dominant follicle. *Journals of Reproduction and Fertility*

Lid. file:///C:/Users/Pc/Downloads/81.pdf

Herrera Álvarez, et al, R. (2021, agosto 15). Antral follicle count, oocyte production and embryonic developmental competence of senescent

Nellore (*Bos indicus*) cows. <https://www.bovigenese.com.br/>.

file:///C:/Users/Pc/Documents/QUINTO%20A%C3%91O/PRIMER%20SEMESTRE/ANTEPROYECTO/ARTICULOS%20EN%20ESPA%C3%91OL/S0093691X2100282X.en.es.pdf

Hofer, M. (2006). *Curso básico de ecografía (5ª Edición ed.)*. Editorial medica panamericana.

Kruip, T., R. Boni, Y.A. Wurth, M.W. Roelofsen and M.C. Pieterse. 1994. Potential use of Ovum Pick-Up for embryoproduction and breeding in cattle.

Theriogenology; 42: 675-684.

Malhi, P. S., Adams, G. P., & Singh, J. (2005). Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of reproduction*, 73(1), 45–53.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038745>

Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M., & Seren, E. (1994). . Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cell and oocyte Gamete. *Res.*

Minitube. (2018). ASPIRATION PUMP FOR BOVINE OPU. minitube.com.

file:///C:/Users/Pc/Downloads/Technical-Data-Sheet-Aspiration-Pump-for-Bovine_en_181113.pdf

- Murugavel, K. (2003). Reproductive performance of dairy cows following different estrous synchronization protocols. Ph. D. dissertation.
- Nasser, L. F., Adams, G. P., Bo, G. A., & Mapletoft, R. J. (1993, Octubre). Respuesta superestimuladora ovárica en relación con la aparición de ondas foliculares en novillas. sciencedirect.com.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9390207L?via%3Dihub>
- Nibart, M., Le-Marquant and B. Guienne. 1995. Production d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. Elevage et Insémination 266:1-23
- Ongaratto, F. L., Cedeño, A. V., Rodríguez, P., & Tribulo, A. (2020, Enero 8). *Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows*. PubMed.
Retrieved January 13, 2023, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32087924/>
- Picton H. M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology, 55(6), 1193–1210.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00478-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00478-2)
- Rajamahendran, R.; Manikkan, M. 1994. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a norgestomet implant in heifers. Canadian Journal of Animal Science, v.74, p. 457-46
- Rosell, R., Lorente, R., Ramírez, A., & Verdecia, M. (2008). Ultrasonografía y su uso en la producción animal. Universidad de Granma.

Sánchez, R. A. (2015, Marzo). *t-Student. Usos y abusos*. scielo.org.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982015000100009#:~:text=La%20t%20de%20Student%2C%20inicialmente,grande%20y%20fo%20peque%C3%B1a).

Santi, L. C. (2018, diciembre 28). ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA MEDIANTE LA ULTRASONOGRAFÍA CON EL TRANSDUCTOR ENDOVAGINAL HUMANO, PARA LA COLECCIÓN DE OVOCITOS EN VACAS BROWN SWISS EN ALTURA. repositorio.unap.edu.pe.

http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11287/Santi_Quispe_Ludio_Carol.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Seneda, M. M., Esper, 2001. *Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery*. . animal-reproduction.org. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6087f7783717068b47f8/pdf/animreprod-2-3-178.pdf>

Spicer, L. J.; Alpizar, E.; Echternkamp, S. E. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 71, p. 1232-1241.

Stroud, B. (2011). The Year 2009 ear 2009 ear 2009 Worldwide Statistics of Embryonics of Embryo Transfer in Domestic Farm Animals Summary of the International Embryonics of Embryo Transfer (IETS) Data Retrieval Committee Report. redalyc.org.

<https://www.redalyc.org/pdf/2890/289060016022.pdf>

- Sunderland, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 547-555.
- Taneja, M. (2000). Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. (1st ed., Vol. 62). *Biol Reprod*.
- Thatcher, W.W.; Guzeloglu, A.; Mattos, R.C.; Binelli, M.; HANSEN, T.R.; Pru, J.K. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 1435-1450.
- TOUATI, K., Beckers, J., & Ectors, F. (1991, Enero). *Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: Better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment*. *Theriogenology*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9190261B>
- Viana, J. (2021). 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. www.iets.org.
https://Portals/0/Documents/Public/News/December_2020.pdf