



Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela Ciencias Pecuarias
Ingeniero Agrónomo Zootecnista



**EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN INDIVIDUAL DE DONANTES DE
OVOCITOS BOVINOS COLECTADOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR
TRANSVAGINAL.**

Estudiante:

César Arturo Vigil Batista

7-710-1693

Director de Tesis:

Prof. Alex Solís Corrales, DVSc.

David, Chiriquí, República de Panamá

Año lectivo:

2022

**EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN INDIVIDUAL DE DONANTES DE
OVOCITOS BOVINOS COLECTADOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR
TRANSVAGINAL.**

**TRABAJO DE TESIS SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA**

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA CIENCIAS PECUARIAS**

**PERMISO DE PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
DEBE SER OBTENIDO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

APROBADO POR

**PROF. Alex Solís Corrales, DVSc. _____
DIRECTOR**

**PROF. Reinaldo de Armas, PhD. _____
COMITÉ**

**PROF. Neftalí Aparicio, MSc. _____
COMITÉ**

DAVID, CHIRIQUÍ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

Agradecimiento

Primeramente, a Dios nuestro padre celestial por la vida y todas sus bendiciones.

A la FCA, por la formación académica y apoyo para la realización de esta investigación, así como a la Hacienda Agua Fría del Dr. Juan Parada por recibirnos en sus instalaciones y facilitarnos sus animales. Agradezco también al Laboratorio THERIOGENETIC®, por la colaboración brindada para poder realizar esta investigación.

Especialmente deseo agradecer a mi asesor, Profesor Alex Solís Corrales PhD. a quien debo mi interés por la investigación y la reproducción. Mil gracias por su apoyo, dedicación, consideración, disponibilidad y aprecio mostrado hacia a mi persona, no solo como un profesor, sino como un Padre para mí, Gracias por hacerme sentir en familia. También a todos los profesores que de una otra manera formaron parte de mi formación académica, en especial por su orientación.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros y amigos. Gracias por brindarme su ayuda, amistad y por tantos momentos maravillosos que pasamos juntos, les deseo todo el éxito del mundo.

Dedicatoria

A mi familia, muy especialmente a mis padres Teresa Batista y Arturo Vigil. No encuentro palabras para expresar la admiración, respeto y amor que siento por ustedes. Siempre me han apoyado en todos los sentidos, porque me enseñaron que el amor es trabajo, entrega, dedicación y ejemplo.

A mi hija Camila Vigil por ser el motor de mi vida, por darme las fuerzas para seguir adelante cada día, también muy especialmente a mi compañera de vida Karolain Barrios por ser ese aliento extra cuando más lo necesitaba, enseñarme que siempre tenemos en nuestras manos el poder para superar cada prueba.

A mis hermanos Fatima, Itzel y David, gracias por su cariño y apoyo, pero sobre todo por las peleas y entrenamientos infantiles, sin ello todo hubiese resultado más difícil.

Mis sobrinos el dúo perfecto gracias por enseñarme el amor y prepararme para unas de las etapas más lindas de mi vida ser Padre.

A mis tíos y primos que han sido siempre un pilar esencial en mi formación profesional ¡Simplemente los amo!

Índice General

Contenido

Agradecimiento	3
Dedicatoria.....	4
Índice General	5
Índice de Gráficas y Tablas	7
Índice de Figuras	8
RESUMEN	9
1.Introducción.....	11
1.1 Planteamiento del problema.....	13
1.2 Antecedentes.....	13
1.3 Justificación.....	14
2.Objetivos	15
2.1 General:.....	15
2.2 Específicos:	15
3 .Hipótesis de Trabajo.....	15
4. Alcances y Limitaciones del Estudio	16
4.1 Alcances del Estudio	16
4.2 Limitaciones del Estudio	16
5. Revisión de Literatura	17
5.1 Histología funcional del Ovario	17
5.2 Ovogénesis	18
5.3 Foliculogénesis.....	19
5.3.1 Desarrollo Folicular	20
5.3.2 Folículos Primordiales	20
5.3.3 Folículos Secundarios	21
5.3.4 Folículos Terciarios	21
5.3.5 Folículo de Graaf	23
5.3.6 Cuerpo Lúteo	24
5.4 Mecanismos de atresia folicular	25

5.5	Dinámica Folicular durante el Ciclo Estral en el Bovino	27
5.6	Aspiración Folicular Transvaginal Guiada Por Ecografía (OVUM PICK-UP, OPU) en Bovinos	30
5.6.1	Factores Técnicos de la OPU	31
5.6.2	Factores biológicos de la OPU	33
5.6.2.1	Raza de las donantes	33
5.6.2.2	Edad y categoría de las donantes.....	34
5.6.2.3	Condición fisiológica y corporal de las donantes.....	36
5.6.2.4	Frecuencia y momento de aspiración relativos al momento del ciclo estral.	37
5.6.2.5	Fertilidad y respuesta individual de las donantes.....	38
5.6.2.6	Estimulación Hormonal previa a OPU	39
6.	Metodología	40
6.1	Ubicación Geográfica	40
6.2	Sujetos Experimentales	41
6.3	Procedimiento de Aspiración Folicular Transvaginal	42
6.4	Clasificación de los ovocitos colectados por AFT	43
6.5	Análisis Estadístico	45
7.	Conclusiones.....	51
8.	Recomendaciones	52
9.	Referencias Bibliográficas	53

Índice de Gráficas y Tablas

Tabla 1. Clasificación de los ovocitos colectados por AFT	44
Tabla 2. Promedios de ovocitos colectados en las razas evaluadas.....	46
Gráfica 1. Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Gyr.	47
Gráfica 2. Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Fleckvieh.....	47
Gráfica 3. Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Gyr.	49
Gráfica 4. Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Fleckvieh.....	49

Índice de Figuras

Figura 1: Estructuras econtradas en el ovario Bovino.	17
Figura 2: Estructura de un folículo antral	23
Figura 3: Esquema de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino. ..	29
Figura 4: Ubicación FCA.....	40
Figura 5: Ubicación Hacienda Agua Fría.....	40
Figura 6: Animales Gyr para AFT.....	41
Figura 7: Infraestructura FCA (CIBA).....	41
Figura 8: Equipo de AFT.....	42
Figura 9: Proceso de AFT a novillas Gyr	42
Figura 10: Proceso Laboratorio.....	44
Figura 11: Ovocitos viables	44

EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN INDIVIDUAL DE DONANTES DE OVOCITOS BOVINOS COLECTADOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta individual de las donantes de ovocitos colectados por Aspiración folicular transvaginal (AFT). Para la realización de esta investigación se emplearon un total de 16 novillas, ocho (8) de la raza Fleckvieh y ocho (8) de la raza Gyr, las cuales fueron sometidas a AFT. Dentro de raza, las mismas eran homogéneas en las siguientes variables: raza (Gyr y Fleckvieh), etapa biológica (Novillas), edad (18 a 26 meses), peso (330 a 375 kg) condición corporal de (3 a 3.75), estatus reproductivo (cíclicas), alimentación (pasto *Panicum Maximun* y sal mineral ad libitum). Entre razas las mismas eran heterogéneas en las siguientes variables: manejo, alimentación y ambiente. Las hembras empleadas fueron los tratamientos (16 tratamientos). Cada hembra fue aspirada dos veces (dos replicas por tratamiento) lo que dio un total de 32 observaciones. Los datos fueron ordenados empleando un Diseño de Bloques Aleatorizado (DBA) tomando como criterio de bloque la raza de las hembras empleadas. Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05 y un nivel de confianza de 95%. Se empleó el test de Duncan para realizar las comparaciones de medias entre los tratamientos. Los datos fueron analizados empleando el software estadístico infostat versión 2020. En esta investigación no encontramos diferencia estadística significativas ($P > 0.05$) para el número de ovocitos colectados, entre las hembras Gyr y Fleckvieh como se aprecia $9.81 \text{ EE} \pm 1.04$ y $9.00 \text{ EE} \pm 1.04$ respectivamente. En cambio, para las variables ovocitos totales y viables para PIVE se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), dentro de las razas Gyr y Fleckvieh como se muestra en las gráficas uno, dos, tres y cuatro. Se concluye, que existe variación individual para el número total ovocitos colectados y el número de ovocitos viables para PIVE obtenidos por AFT entre individuos con condiciones similares de raza, edad, peso, etapa biológica, condición corporal, estatus reproductivo y ambiente.

Palabras Clave: Respuesta individual, Gyr, Fleckvieh, Simmental, OPU, folículo, donadora, ovocitos viables.

EVALUATION OF INDIVIDUAL VARIATION AMONG DONORS OF OOCYTES COLLECTED BY TRANSVAGINAL OVUM PICK-UP.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the individual response of donors of oocytes collected by transvaginal follicular aspiration (TFA). A total of 16 heifers, eight (8) of the Fleckvieh breed and eight (8) of the Gyr breed, were subjected to TFA. Within breeds, they were homogeneous in the following variables: breed (Gyr and Fleckvieh), biological stage (heifers), age (18 to 26 months), weight (330 to 375 kg), body condition (3 to 3.75), reproductive status (cyclic), feeding (Panicum Maximun grass and mineral salt ad libitum). Between breeds they were heterogeneous in the following variables: management, feeding and environment. The females used were the treatments (16 treatments). Each female was aspirated twice (two replicates per treatment) for a total of 32 observations. The data were arranged using a Randomized Block Design (RBD) taking as block criterion the breed of the females used. We worked with a significance level of α : 0.05 and a confidence level of 95%. Duncan's test was used to compare means between treatments. The data were analyzed using the statistical software infostat version 2020. In this research we found no significant statistical difference ($P>0.05$) for the number of oocytes collected between Gyr and Fleckvieh females, as shown by $9.81 \text{ EE}\pm 1.04$ and $9.00 \text{ EE}\pm 1.04$ respectively. On the other hand, for the variables total and viable oocytes for PIVE, a significant statistical difference ($P<0.05$) was found within the Gyr and Fleckvieh breeds as shown in graphs one, two, three and four. It is concluded that there is individual variation in the total number of oocytes collected and the number of viable oocytes for PIVE obtained by AFT among individuals with similar conditions of breed, age, weight, biological stage, body condition, reproductive status and environment.

Keywords: Individual response, Gyr, Fleckvieh, Simmental, OPU, follicle, donor, viable oocytes.

1. Introducción

Actualmente, son muchas las biotecnologías reproductivas que permiten multiplicar la genética de los animales superiores y acortar el intervalo generacional, entre las cuales tenemos la Producción *in vitro* de Embriones (PIVE) bovinos, a partir de ovocitos obtenidos mediante de la técnica de aspiración folicular, por sus siglas en inglés (Ovum Pick-Up, OPU).

La técnica de OPU, comenzó a utilizarse en la década de 1980 en la mujer y fue descrita por primera vez en bovinos por Pieterse *et al.*, (1988). Se considera un método poco invasivo y con gran repetitividad, para la recuperación de ovocitos a partir de donantes vivas (Pieterse *et al.*, 1991, 1992).

Antiguamente la recolección de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones provenía solo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas, proceso que presenta grandes limitaciones desde el punto de vista productivo ya que no es posible la replicación del mismo, disminuyendo así la producción de embriones y por tanto la posibilidad de obtener futuras descendencias de las hembras sacrificadas (Denis, 2008).

Ante esta situación la obtención de ovocitos de una hembra viva mediante la técnica de OPU, parece ser la variante que representa la alternativa más viable para lograr satisfacer las necesidades de ovocitos en un sistema de producción continua de embriones (Solís *et al.*, 2012).

Se estima que solo entre un 50 y 70% de los ovocitos obtenidos mediante OPU son aptos para la fertilización *in vitro* (Nava *et al.*, 2009). Alrededor del 72.2% de estos logran clivar, pero solo un aproximado de 27.8% alcanzan el estadio de blastocito (Watanabe *et al.*, 2017). Es por esto la necesidad de obtener mayor número posible de ovocitos aptos para la fertilización *in vitro* representa una ventaja para la técnica, pues permite obtener mejores resultados.

El número, así como la calidad de los ovocitos recolectados, la cual se traduce fundamentalmente en la mayor presencia de células del cumulo que rodean al mismo, se ve influenciada según Palma (2008), por diferentes aspectos, entre los cuales se mencionan los biológicos y los técnicos.

Los aspectos técnicos son controlados por el operador del equipo de OPU. Sin embargo, los aspectos biológicos están vinculados a la biología del animal, como la raza, edad, fertilidad, categoría de la donante, estado fisiológico y condición corporal de la donante.

Un aspecto biológico que ha sido considerado de gran importancia en la reproducción animal es la variación individual. La raza juega un rol importante en este sentido. Los animales de la raza Nelore, o las vacas en general cebuínas normalmente tienen un mayor número de folículos reclutados, en comparación con las vacas de razas europeas (Dayan *et al.*, 2000; Seneda *et al.*, 2002). Sin embargo, autores como Seneda *et al.*, (2002), señalan que, a pesar del potencial similar entre los individuos de la misma raza, la variabilidad entre las distintas donantes para producir una población viable de folículos puede influir en los resultados de OPU.

1.1 Planteamiento del problema

Al hacer aspiración folicular, es de suma importancia obtener el mayor número de ovocitos rodeados con el mayor número de células del cumulo intactas posible, y que al momento de la fecundación esto se traduzca en un mayor número de embriones transferibles.

La calidad y cantidad se ve afectada por factores biológicos como raza, edad, categoría animal, condición corporal, momento del ciclo estral de la hembra, lo que puede influir en la disponibilidad de ovocitos viables para la fertilización. No obstante, diversos estudios en reproducción animal, han documentado que, a expensas de la homogeneidad de factores biológicos, la respuesta individual de la donante puede influir significativamente en los resultados. Sin embargo, esta variable no ha sido estudiada ni tomada en cuenta en la gran mayoría de las investigaciones sobre PIVE, lo cual se constituye en el problema a investigar.

1.2 Antecedentes

No se ha encontrado en la literatura estudios que vinculen el efecto de variación individual en los resultados obtenidos por OPU. Sin embargo, algunos autores señalan que existe un efecto de la variación individual en la reproducción. Al respecto Watanabe *et al.*, (1998) señalan que, la variabilidad entre los distintos donantes para producir una población viable de folículos puede influir en los resultados de OPU.

No todas las vacas tienen la misma cantidad de folículos en los ovarios. En la especie bovina se sabe que la cantidad de folículos primordiales se desarrolla durante la vida fetal (Aerts y Bols, 2010) y tiene una fuerte correlación con el estado nutricional de la madre, sobre todo en el primer tercio de la gestación (Evans *et al.*, 2010). Las vacas que sufrieron alguna restricción alimentaria durante la preñez, producen hijas con una población folicular menor, comparado

con hijas de vacas que no se sometieron a restricciones en la alimentación durante esta etapa (Evans *et al.*, 2010).

1.3 Justificación

Diversos estudios en Reproducción animal han documentado que, a expensas de la homogeneidad de factores biológicos, la respuesta individual de la donante puede influir significativamente en los resultados. Esta variable no ha sido estudiada ni tomada en cuenta en la gran mayoría de las investigaciones sobre PIVE, lo cual supone un grave error experimental en los estudios realizados, que pudiera estar enmascarando los resultados obtenidos.

Por otro lado, según los datos de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), durante los últimos años en Panamá, se ha dado un notable incremento en la producción y transferencia de embriones producidos *in vitro* como herramienta para el mejoramiento genético bovino (Perry, 2016).

Esta herramienta ha mejorado notoriamente la genética bovina de los hatos nacionales. La selección de las hembras donantes de ovocitos representa un procedimiento de gran importancia al momento de incursionar en esta tecnología, que influye en gran medida en los resultados obtenidos. Es por ello que la obtención de diferencias significativas en este estudio, sugeriría considerar la variación individual como criterio de selección de hembras donantes de ovocitos en los sistemas de producción *in vitro* de embriones, que permitiría obtener mejores resultados.

2. Objetivos

2.1 General:

- Evaluar la respuesta individual entre novillas donantes de ovocitos colectados por Aspiración Folicular Transvaginal, de las razas Gyr y Fleckvieh.

2.2 Específicos:

- Comparar el número de ovocitos colectados entre y dentro de las razas evaluadas.
- Comparar la viabilidad de los ovocitos colectados entre y dentro de las razas evaluadas.

3. Hipótesis de Trabajo

Ha: La variación individual de las hembras donantes infiere sobre el número, y viabilidad de los ovocitos colectados por AFT.

Ho: La variación individual de las hembras donantes no infiere sobre el número y viabilidad de los ovocitos colectados por AFT.

4. Alcances y Limitaciones del Estudio

4.1 Alcances del Estudio

Este estudio permitirá conocer el efecto directo de la variabilidad individual animal sobre los resultados de OPU en novillas de la raza Gyr y Fleckvieh. A su vez pretende brindar una alternativa a todos aquellos investigadores, profesionales y empresarios que desean incursionar en la producción de embriones *in vitro* por el método de aspiración folicular (OPU) y no toman en cuenta la variabilidad individual animal.

4.2 Limitaciones del Estudio

La principal limitante de este estudio puede resultar de la relación costo/facilidad de recurso económico, desde que su costo en el mercado local es muy elevado y el estudiante que se pueda avocar a conducir estudios de este tipo como trabajo de grado puede verse limitado por el costo del mismo. El empleo de animales de potrero poco acostumbrados al manejo de sujeción en cepo.

5. Revisión de Literatura

5.1 Histología funcional del Ovario

Los ovarios son los órganos esenciales para la reproducción de la hembra, los que pueden situarse en la cavidad pélvica o en la región abdominal dependiendo de la edad, número de partos y la especie (Regueiro, 2010).

Según Viana (2005), los ovarios tienen 2 funciones: 1) Función endógenas: la producción de hormonas (principalmente estrógenos y progesterona) y 2) Función exógenas: la producción de óvulos, durante los distintos estadios del ciclo estral. Mientras que su tamaño varía de acuerdo al estadio del ciclo estral y la edad del animal, y generalmente es de 2.5 a 3.5 cm de largo (De Armas, 2007).

De acuerdo con Velázquez *et al.*, (2004), el ovario se encuentra dividido funcionalmente en dos compartimientos: el compartimiento intersticial, conformado por células del estroma y de la teca externa, y el compartimiento folicular, que contiene los ovocitos, las células de la granulosa y las células de la teca interna, que interaccionan entre si durante las diversas etapas de la maduración folicular.

En la superficie del ovario se pueden encontrar dos estructuras diferentes: folículos y cuerpo lúteo (Diana, 2009).

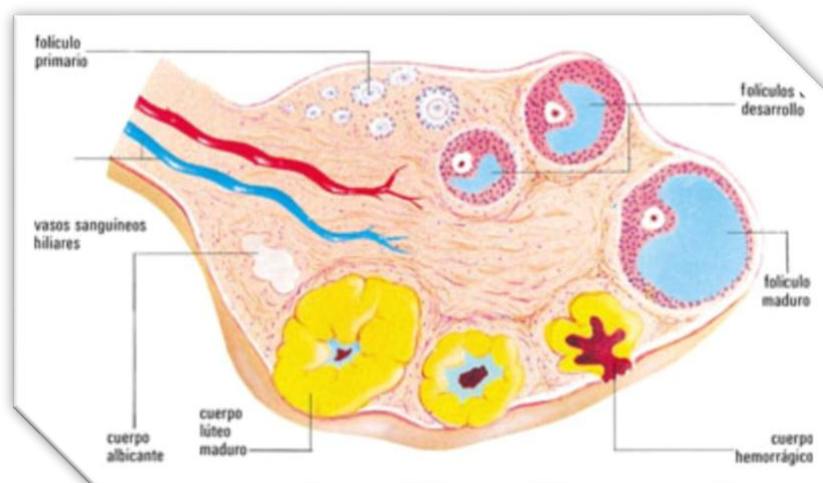


Figura 1: Estructuras encontradas en el ovario Bovino.

Fuente: Tomada de mundo pecuario.

5.2 Ovogénesis

La ovogénesis consiste en el proceso de formación y desarrollo del ovocito (Gigli *et al.*, 2006). Este proceso inicia en las fases tempranas de la vida fetal de la hembra bovina, aproximadamente entre los 120 y 140 días de gestación y continua después del nacimiento, pasa por una aceleración durante la pubertad y culmina con la ovulación, cuando el ovocito maduro es liberado del folículo (Derivaux, 1980). Comienza con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina con la formación del ovocito II (Gigli *et al.*, 2006).

En los rumiantes al igual que en la especie porcina y los primates, el crecimiento del ovocito se inicia durante el periodo prenatal (Bielanska-osuchowska, 2006). En esta etapa, las células primordiales germinales tienen su origen extra gonadal en el endodermo del saco vitelino y en la región del alantoides (Eddy *et al.*, 1981; Buccione *et al.*, 1990), a partir de células somáticas que tienen el potencial de convertirse en células germinales (Kelly, 1977), estas migran a través del mesenterio y colonizan las gónadas primitivas del mesonefro (Gigli *et al.*, 2006).

Antes de que las células germinales gonadales migren hacia el borde genital se dividen mediante mitosis, manteniendo esta actividad durante todo el proceso de migración (Bendel-Stenzel *et al.*, 1998).

Cuando se ha completado el proceso migratorio, aquellas ovogonias que se encuentran en estadios más avanzados de desarrollo, se asocian con las células somáticas en los cordones corticales, mientras que el resto entra en apoptosis (Baker, 1963; Byskov, 1986).

En el momento del nacimiento en la corteza del ovario hay miles de folículos primarios en estado de reposo rodeando a sus correspondientes ovocitos (Caravaca *et al.*, 2005). En los bovinos están alrededor de los 200000 a 350000 (Erickson, 1966 y Duran, 2007).

5.3 Foliculogénesis

El folículo ovárico es la unidad estructural y funcional del ovario, proporcionando un ambiente adecuado para el crecimiento, eventual ovulación del ovocito que contiene y formación de un embrión a partir de la fecundación (Cortvrindt & Smitz, 2001; Findlay et al., 2009).

Un folículo es la estructura primordial del ovario, está compuesto por un ovocito envuelto por una o más capas de células somáticas (Seneda, 2008). La foliculogénesis abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio (Gigli *et al.*, 2006). La población de folículos se encuentra en un estado constante de crecimiento y maduración, distinguiéndose: folículos primordiales y primarios, folículos secundarios.

La foliculogénesis es el evento caracterizado por la formación, crecimiento y maduración folicular. Este evento está controlado por factores endocrinos, parácrinos y autócrinos (Magalhães, 2009).

La foliculogénesis es un proceso altamente selectivo donde usualmente solo un folículo asume dominancia y el destino del resto de los folículos es la atresia mediada por apoptosis; el mayor tipo de células que sufren este proceso son las células de la granulosa (Hsueh et al., 1994). Para Roberts (1971) y Knopf et al., (1989), la foliculogénesis ocurre en estado fetal, animales prepúberes y durante la gestación. Un folículo primordial está compuesto por un ovocito con crecimiento detenido antes del nacimiento en la fase de diploteno de la profase I de la meiosis, rodeado por una sola capa de células de la pregranulosa (Nilsson et al, 2001).

Según Roberts (1971) y Fortune (2002), la formación de folículos primordiales ocurre durante el periodo fetal. Asimismo, Roberts (1971) refiere que el crecimiento folicular, desarrollo a un folículo de Graaf y ovulación ocurre solamente en hembras vacías después de la pubertad y durante el ciclo reproductivo. Para Ginther (2000), el desarrollo y la atresia folicular están reguladas por la síntesis de estradiol en las células de la granulosa, sin embargo, para Faes et al. (2007), el estrógeno y la progesterona están relacionadas con la calidad folicular. No obstante, para Basini et al. (1998), otros

factores intraováricos no esteroideos también sintetizados por las células de la granulosa están involucrados en la fisiología ovárica.

5.3.1 Desarrollo Folicular

En todas las hembras mamíferas, la reserva ovocitos es establecida durante la vida fetal. Al nacimiento la hembra bovina posee 150,000 folículos primordiales y al llegar a la pubertad ese número disminuye de 120,000 a 86,000 siendo gradualmente movilizados durante la vida productiva, donde pocos llegan a la ovulación y el resto sufre atresia. (Viana, 2005; Bols, 2005; Martínez y Souza, 2007).

5.3.2 Folículos Primordiales

Los mismos son formados durante la vida fetal de la hembra, están constituidos por una célula germinal rodeada de una capa simple de células (Buxade *et al.*, 1995). Al respecto señala Caravaca *et al.*, (2005), durante el desarrollo fetal y en el proceso de evolución desde gónadas hasta convertirse en ovario, las células germinales primitivas dan lugar por mitosis sucesivas a las células sexuales u ovogonias de primer orden, estos se rodean de una sola capa de células epiteliales constituyendo los folículos primarios.

Es decir, las células pre-granulosas, derivadas del epitelio ovárico, se diferencian en células granulosa, rodeando a los ovocitos y quedando así formados los folículos primordiales. Estos folículos forman la reserva gametogénica o (población de folículos de reserva) que una hembra va a utilizar en toda su historia reproductiva (Gigli *et al.*, 2006). Los folículos primordiales constituyen la reserva o almacén de folículos en reposo, los cuales se agotan progresivamente durante la vida.

Se considera que uno de los pasos más críticos de la foliculogénesis es la transformación de folículos primordiales en primarios. Es probable que la conversión de células pre-granulosas planas, en epitelio cuboidal, dependa de señales provistas por el ovocito, pero no se conoce la naturaleza de estas señales (Greenual y Roy 1994; citados por Henao y Trujillo, 2000). La fase inicial del crecimiento folicular, originada a

partir de los folículos primordiales, presumiblemente es independiente de las gonadotropinas hipofisarias (Gigli *et al.*, 2006).

En esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa (Gigli *et al.*, 2006).

5.3.3 Folículos Secundarios

Fundamentalmente formados por una célula germinal rodeada por dos o más capas de células foliculares (Buxade *et al.*, 1995). Es decir, las células de la granulosa aumentan de tamaño y número y se denominan folículo secundario al ovocito rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células de la teca se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican en pre-antrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral (Gigli *et al.*, 2006).

En los folículos secundarios de las especies porcina, bovina y humana se han identificado factores responsables del crecimiento folicular y ovocitario como GDF9 (Factor de crecimiento y diferenciación) específico del ovocito y el factor BMP15 (proteína morfogénica ósea 15) ambos están asociados con la proliferación de células de la granulosa (Dong *et al.*, 1996; Dube *et al.*, 1998 y Picton *et al.*, 2008).

Los folículos secundarios presentan un ovocito más grande, un buen desarrollado de la zona pelúcida, y por lo menos dos capas de células granulosas. Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotropinas puede ser detectado y las importantes acciones de FSH y LH se inician (Seneda *et al.*, 2008).

5.3.4 Folículos Terciarios

Los folículos terciarios o folículos antrales se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células

de la granulosa (Gigli *et al.*, 2006). La continua proliferación de las células de la granulosa, regulada en gran medida por los factores GDF9 y BMP15 (Canipari, 1994; Kezele *et al.*, 2002) lleva a que estas comiencen a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular (Gigli *et al.*, 2006).

En este estadio las características histológicas son la presencia de la teca interna constituida por tejido conectivo y la teca externa formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma. A nivel molecular se caracterizan por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa. Las células de la teca expresan receptores para LH (Gigli *et al.*, 2006).

En el folículo terciario, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones. Las células de la granulosa que revisten el folículo formando un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal y las células del cúmulo oophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994; Kezele *et al.*, 2002). Al respecto señala Gigli *et al.*, (2006), que el líquido folicular al acumularse, produce un reordenamiento de estas células de la granulosa, en células del cumulo y murales.

Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes, a diferencia de los subordinados, expresan en las células de la granulosa además de un mayor número de receptores para FSH, receptores para LH (Gigli *et al.*, 2006). La acción inductiva de la FSH permitirá, posteriormente, facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares (Hillier, 2001, citado por Velázquez y Mendieta, 2005).

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa experimentan atresia mientras otros siguen desarrollándose para convertirse en folículos maduros también llamados folículos dominantes, que han sido seleccionados para continuar su crecimiento. La selección de estos folículos dominantes con capacidad de llegar a lograr la maduración ovocitaria, está precisamente determinada por los receptores de LH y FSH localizados en las células de la granulosa (MCGee y Hsueh, 2000).

5.3.5 Folículo de Graaf

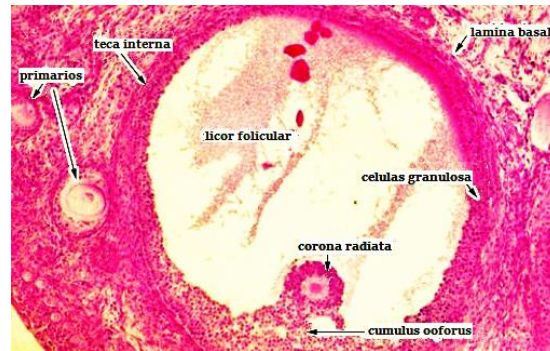


Figura 2: Estructura de un folículo antral.

Fuente: Adaptado de Reece, (2015).

Solís (2006), un folículo terciario que llegue a ser dominante puede tener dos destinos: la atresia o la ovulación. En cuyo caso sea la ovulación este se denomina folículo preovulatorio o como menciona Gigli *et al.*, (2006) folículos de Graaf, en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos 1672. La ovulación ocurre siempre y cuando este sea coincidente con el descenso de los niveles de progesterona en el ciclo estral. Un folículo preovulatorio puede tener diámetro de hasta 16mm en la especie bovina (Solís, 2006).

El pico de LH es inducido por la elevada concentración circulante de estrógenos producidos por el folículo preovulatorio (Velázquez y Mendieta, 2005). Es decir, los folículos preovulatorio tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizaran reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación (Gigli *et al.*, 2006).

Velázquez y Mendieta (2005), mencionan que el pico de LH, además de inducir la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito y cambios que provocan la ruptura de la pared folicular, que a su vez permite la ovulación, también incluye alteraciones funcionales en el complejo ovocito-células del cumulo y modificaciones en la expresión génica de las células de la granulosa que las llevaran hacia la luteinización.

El ovocito maduro secreta un factor que permite la expansión de las células del cúmulo (CEEF) que permite secretar ácido hialurónico en respuesta a la estimulación por FSH.

Al hidratarse genera espacios entre las células que provocan la expansión del cumulo que precede al proceso de ovulación propiamente dicho (Velázquez y Mendieta, 2005). Este cambio en el patrón esteroideogénico de las células de la granulosa parece inducir, junto con la aparición del pico preovulatorio de LH. La expresión de las enzimas remodeladoras de tejidos (metaloproteinasas de matriz (MMPs)) indispensables para el proceso de ovulación (Rosenfeld *et al.*, 2001, citado por Velázquez y Mendieta, 2005).

5.3.6 Cuerpo Lúteo

El pico de LH preovulatorio provoca la ruptura del folículo destinado a la ovulación (Gordon, 1996). Se da entonces la ruptura del folículo de Graaf, así como del propio epitelio del ovario y en el desprendimiento del ovocito que irá a parar en el infundíbulo. En los rumiantes y en la cerda se libera un ovocito de segundo orden y en la yegua un ovocito de primer orden por eso es más adecuado llamar este proceso ovocitación en lugar de ovulación, como se ha venido llamando tradicionalmente (Caravaca *et al.*, 2005).

Con la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovulo, se produce una pequeña hemorragia con formación de un coagulo de sangre en la cavidad antral, ahora vacío. A esta estructura, se le denomina cuerpo hemorrágico (Buxade, 1995). Según Caravaca *et al.*, (2005), se produce una organización del coagulo, aumentando de tamaño y con un citoplasma rico en lipocromos (xantofilas) que dan una coloración amarillenta, por lo que esta estructura recibe el nombre de cuerpo amarillo o cuerpo lúteo, este proceso se llama luteinización.

Por su parte Gordon (1996), señala se cree que las células lúteas se diferencian en células lúteas grandes y pequeñas. Las células grandes secretan progesterona y la oxitocina y responden a la prostaglandina E, mientras que las pequeñas células secretan progesterona y responden a la LH. Las células pequeñas, derivadas de la teca, son más numerosas que las células grandes, que son al menos en parte derivados de células de la granulosa (Hansel *et al.*, 1991). Se cree que las dos

hormonas que regulan principalmente la función del cuerpo lúteo (LH y PGF) actúan sobre los dos tipos de células a través de diferentes vías de segundo mensajero (Wiltbank *et al.*, 1991). La evidencia disponible indica que la LH tiene un papel importante en el establecimiento de un cuerpo lúteo completamente funcional en la vaca, pero no está obligado a mantener su función (Peters *et al.*, 1994).

Como se ha visto el cuerpo lúteo ovárico es un órgano endocrino que produce progesterona. La cual es considerada su principal producto de secreción. Los niveles de progesterona en sangre incrementan con el crecimiento del cuerpo lúteo. Cuando el cuerpo lúteo está completamente desarrollado, la secreción de progesterona es máxima y se estabilizan los niveles plasmáticos. (Frandsen *et al.*, 2009).

Si la fertilización del ovulo no se da y el embarazo no se ha establecido, el cuerpo lúteo entra en una regresión espontánea, con una disminución relativamente rápida de la progesterona en plasma (Frandsen *et al.*, 2009) al final del ciclo estral, uno a cuatro días antes del inicio del celo (Gordon, 1996). La concentración declina en un periodo aproximadamente de dos días, a un valor insignificante que mantiene a través del celo y hasta que se forme un nuevo cuerpo lúteo en la próxima ovulación (Gordon, 1996).

Unos días antes de la siguiente ovulación se produce una cicatrización y sustitución del cuerpo lúteo por tejido conectivo, apareciendo una costra blanca sobre la superficie del ovario que se denomina cuerpo blanco o albicans (Caravaca *et al.*, 2005 y Frandsen *et al.*, 2009). A parte de la eliminación del tejido lúteo y la recuperación de la forma y tamaño anterior, no se conoce otra función del cuerpo albicans (Ospina y Aldama, 1995).

Por otra parte, si se realiza el apareamiento y la vaca queda preñada, el mecanismo de liberación de prostaglandinas se suprime (Gordon, 1996), el reconocimiento materno de la gestación se produce, y la regresión del cuerpo lúteo se previene (Frandsen *et al.*, 2009).

5.4 Mecanismos de atresia folicular

Según Erickson (1966) y Erickson et al., (1976), prácticamente todos los folículos de los ovarios de la hembra sufren atresia, “evento que puede ocurrir en el periodo prenatal”, porque una vaca de 10 a 14 años tiene hasta 25000 ovocitos presentes, (cerca del 99,9% de los folículos no llegan a la ovulación); según Erickson et al. (1976), una vaca a los 10 años teniendo un parto al año, tan solo puede ovular de 30 a 50 ovocitos.

Además, según Dayan (2001), esto puede ser demostrado si se calcula que, un animal ciclando normalmente en un periodo de 15 años va a ovular menos de 300 ovocitos (ovulando cada 21 días o 17,4 veces al año, en 15 años igual a 260 ovulaciones y que por cada folículo que llega a término, 12 folículos sufren atresia) dentro de los 0,7 millones existentes al nacimiento.

Según Buttker & Sandstrom (1994), los mecanismos que delinear la atresia folicular no son bien conocidos, daños en el ADN, así como el inicio de la liberación de radicales libres de oxidación han sido propuestos como posibles mecanismos que permiten la activación de la cascada de apoptosis en los folículos atrésicos.

Para Hsueh et al., (1994), la atresia es principalmente inducida durante la fase de dominancia folicular y afecta folículos de todos los tamaños, según estos autores, el 85% de los folículos ováricos tomados en cualquier fase del ciclo estral son atrésicos. Según Hussein (2005), la apoptosis mecanismo de muerte celular programada, ha sido implicada en los procesos de normal funcionamiento del ovario y del crecimiento folicular, así como la atresia y regresión del cuerpo lúteo. Según este autor, este proceso ocurre en el periodo fetal y en la vida adulta.

Para Johnstone et al., (2002), la apoptosis es mediada por factores intrínsecos y extrínsecos que, para Johnson (2003), son el estrés oxidativo, irradiación, activación de los 95 genes promotores de apoptosis, daño del ADN, citoquinas, capa de proteínas virales, o el retiro de células de factores de crecimiento.

5.5 Dinámica Folicular durante el Ciclo Estral en el Bovino

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para la alta eficiencia reproductiva en los animales de granja (Forde *et al.*, 2011). Durante el desarrollo fetal se establece un número fijo de folículos primordiales, el crecimiento de un folículo ovárico toma un periodo de 3 a 4 semanas y se categoriza como estadio gonadotrofina independiente y gonadotrofina dependiente (Webb *et al.*, 2004).

Las opiniones científicas sobre la foliculogénesis en el bovino han variado a través de la historia de la investigación (Adams y Pierson, 1995). Según Gordon (1996), Quintela *et al.*, (2006) y Motta *et al.*, (2011) concuerdan que fue en el año de 1960 cuando Rajakoski propuso por primera vez la existencia de dos ondas de desarrollo folicular en el bovino. Iniciándose la primera onda en el día tres y finalizando a mediados del ciclo con el inicio de la segunda onda que culminaría con la ovulación.

Se definió a la onda folicular, como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que emergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante), mientras que los otros (folículos subordinados) se atresian (Gigli *et al.*, 2006).

La emergencia del grupo o cascada de pequeños folículos antrales se inicia justo antes del día de la ovulación y durante los próximos días, aseguró del Valle (2008), el folículo dominante secreta hormonas (Inhibina y Estrógenos), capaces de inhibir el desarrollo de una nueva onda folicular y el crecimiento de los folículos de su cohorte. Mientras que el folículo dominante continúa aumentando de tamaño, el crecimiento de los restantes folículos de la cohorte cesa o se hace lento y estos folículos subordinados finalmente sufren atresia (Fricke, 2001).

Sugieren Goodman y Hodgen (1983), el uso de los términos reclutamiento, selección y dominancia para describir el desarrollo folicular durante el ciclo estral. La fase de reclutamiento está dada por el desarrollo de un grupo de folículos que comienzan a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotrofinas, que le permiten avanzar hacia la ovulación.

La fase de selección, es el proceso por el cual un folículo evade la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación y la fase de dominancia, es el proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos (Savio *et al.*, 1988; Sunderland *et al.*, 1994). Una fase de atresia folicular presente solo en los folículos no ovulatorios fue propuesta por Sunderland *et al.*, (1994), fase que también representa la desaparición del folículo dominante que no ovula.

Durante el reclutamiento, un rango de 8 a 41 folículos (en promedio 24), de dos, tres (De Armas, 2007 y Adams *et al.*, 2008) y hasta cuatro milímetros (Lucy *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2008), inician su crecimiento. Durante los siguientes dos, tres (Bo, 2002) y cuatro días (Lucy *et al.*, 1992), crecen hasta alcanzar un diámetro de seis a ocho milímetros (Quintela *et al.*, 2006) o hasta nueve milímetros (Lucy *et al.*, 1992), iniciándose la fase de selección (Quintela *et al.*, 2006).

El folículo dominante alcanza un diámetro mayor a 10 mm (Lucy *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1993) aproximadamente de 10 a 15 mm y permanece dominante por un período de cinco a siete días (del Valle, 1999), hasta que se hace atrésico o se vuelve preovulatorio. El folículo preovulatorio o de Graaf puede medir alrededor de 15 a 17 mm aseguraron Bo y Caccia (2000), en tanto que DesCôteaux *et al.*, (2014) manifestó que su diámetro se encuentra entre los 11 a 16 mm.

La duración del ciclo estral está relacionada con la cantidad de ondas (Bo, 2002). El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral es determinado por la longitud de la fase lútea. Si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento pos-desviación o en su fase estática temprana (tres a cuatro días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulara; sino sufrirá atresia y se originara una nueva onda (Lucy *et al.*, 1992).

Así, el principal factor que condiciona la duración del ciclo y por lo tanto la existencia de 2, 3 o 4 ondas por ciclo, parece ser la vida del cuerpo lúteo (Fernández, 2003). Consecuentemente, la duración del ciclo de dos ondas es de 18 a 21 días, de 21 a 23 días en los ciclos de 3 ondas (Bo, 2002) y 24 o 25 días en los ciclos de cuatro ondas (Zeitoun *et al.*, 1996; Bo, 2002).

Los primeros reportes usando ultrasonido indicaron que el número de ondas foliculares que ocurren en vaquillas cíclicas, varía entre animales. Algunas vaquillas exhibían dos mientras que otras exhibían tres ondas sucesivas de crecimiento folicular durante cada ciclo estral (Savio *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1988; Ginther *et al.*, 1989; Taylor y Rajamahendran, 1991).

La primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (día 0). La segunda onda comenzará el día 9 o 10 para los ciclos de dos ondas y los días ocho o nueve en los ciclos de tres ondas. En los ciclos de las tres ondas, la tercera onda emerge los días 15 o 16 (Bo, 2002). No obstante, hay una gran variación individual principalmente en la segunda onda, por lo que puede comenzar más temprano (día 6) o más tarde (día 12) (Bo y Mapletoft, 1999). En los casos de ciclos con cuatro ondas, la cuarta onda comienza el día 20 o 21 (Bo, 2002).

Un animal que presente un ciclo de dos ondas puede exhibir tres ondas durante el subsecuente ciclo y viceversa, pero la frecuencia con la cual este cambio en el número de ondas por ciclo se presente dentro de un animal no ha sido bien establecida. Varios factores que influyen el número de ondas por ciclo estral, incluyen la ingestión dietética (Murphy *et al.*, 1991), edad, paridad y estado de lactancia (Lucy *et al.*, 1992).



Figura 3: Esquema de la dinámica folicular durante el ciclo estral bovino.
 Autor: Adaptado de Rippe, (2009).

5.6 Aspiración Folicular Transvaginal Guiada Por Ecografía (OVUM PICK-UP, OPU) en Bovinos

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía conocida como OPU por sus siglas en inglés (Ovum Pick-up), consiste en la recolección de ovocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vagina), mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (Pieterse *et al.*, 1988, Denis *et al.*, 2000, Bage *et al.*, 2003).

La misma comenzó a usarse en la mujer en la década de los años 80 y se describe por primera vez en bovinos por Pieterse *et al.*, (1988), a finales de los años 1990. La técnica se había extendido vertiginosamente a numerosos países, ya que sin dudas abre nuevos horizontes en el campo de las biotecnologías de la reproducción. Actualmente se utiliza por la mayoría de los centros dedicados a la reproducción de embriones in vitro (Hasler *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2000; Petyim *et al.*, 2003).

Antiguamente la recolección de ovocitos para la producción in vitro de embriones provenía solo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas. Esta metodología presenta grandes limitaciones puesto que no permite ser reproducida, disminuyendo la producción de embriones y por tanto se encuentra limitada la posibilidad de descendencia de las hembras sacrificadas. En cambio, la técnica de OPU permite la obtención de ovocitos de calidad y de forma estable, a partir de animales previamente seleccionados y controlados. Este procedimiento no invasivo y repetible no afecta el estado productivo y/o reproductivo ni compromete la fertilidad futura de las donantes (Donnay *et al.*, 1997; Maillard *et al.*, 2003; Denis, 2008).

Esta técnica se adoptó para recolectar ovocitos de forma repetida en hembras de alto merito genético o novillas seleccionadas (krulp *et al.*, 1994), para producir gran cantidad de terneros con cualidades productivas conocidas y acortar el intervalo generacional en los programas de producción de ganado.

Se puede realizar en hembras que no responden a la estimulación hormonal, también pueden encontrarse en diferentes estados fisiológicos como cíclicas o no cíclicas (Chaubal *et al.*, 2006), con una preñez temprana (Melntjes *et al.*, 1995), con trastornos

reproductivos (Looney *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1999) e inclusive en etapa prepuber (Majerus *et al.*, 1999; Taneja, 2000).

La técnica requiere fundamentalmente de un equipo ultrasonográfico con transductor convexo acoplado a un sistema de guía de agujas o guía de aspiración y una bomba de presión negativa. Bols *et al.*, (1995), describieron un procedimiento que consiste en introducir el transductor acoplado al sistema de guía de agujas por vía vaginal, para luego manipular los ovarios a través del recto, de forma tal que sean colocados contra el transductor y se logre visualizar los folículos en la pantalla del ecógrafo.

Posteriormente se introduce la aguja que atraviesa la pared vaginal y se puncionan los folículos entre 3 y 9 mm de diámetro. En este momento se aplica presión de vacío y se recoge el contenido folicular en filtros o tubos cónicos que contienen medio de aspiración (PBS + heparina). El contenido del filtro o tubo cónico (medios de aspiración y líquido folicular aspirado junto con los ovocitos), es llevado hasta el laboratorio para realizar la búsqueda y evaluación de la calidad morfológica de los Complejos CúmulusOvocitos (CCOs) obtenidos (Solís *et al.*, 2012).

El resultado de la técnica se basa fundamentalmente en la cantidad de CCOs colectados y su viabilidad para fertilización *in vitro* y está influenciado por muchos factores que para su mejor comprensión Palma (2008), los ubicó en dos grupos: factores técnicos y factores biológicos, los cuales se describen a continuación.

5.6.1 Factores Técnicos de la OPU

Son factores vinculados al equipo de aspiración empleado, los cuales ejercen gran influencia sobre la cantidad y viabilidad de los ovocitos colectados. Algunos de los factores técnicos de mayor relevancia son el tipo de aguja y la presión de aspiración (Solís *et al.*, 2015).

La calidad de las agujas y su filo (Sasamoto *et al.*, 2006) resultan esenciales para el éxito de OPU (Scott *et al.*, 1994). Hace algunas décadas se recomendó el empleo de agujas largas (50-60 centímetros) con diámetro exterior entre 1,0 y 1,5 milímetros,

pues se consideraron relativamente fáciles de construir y manejar, además tenían una vida útil prolongada (Pieterse *et al.*, 1988; Galli *et al.*, 2001; Merton *et al.*, 2003). No obstante, presentaron algunas desventajas como fueron los altos precios y la pérdida con facilidad del filo, por lo que necesitaban ser reafiladas regularmente pero no recuperaban su filo inicial (Simon *et al.*, 1993).

Rath (1993), desarrolló un método alternativo al utilizar agujas desechables (utilizadas en la vía epidural, número 18G) las cuales tenían la ventaja de ser muy baratas, estériles y adaptables. Sin embargo, se requería de un complejo sistema de guía para poder ser utilizadas, por lo que Bols *et al.*, (1995) diseñaron un sistema de guía que se está utilizando actualmente con buenos resultados. Se utilizó estas agujas desechables fijándolas a un dispositivo metálico, el dispositivo y un transductor sectorial se acoplan a su sistema de guía, lo cual facilita la operación. Se obtuvo una tasa de recolección de 42% (número de ovocitos recolectados por cada 100 folículos puncionados).

La presión de aspiración que se alcanza en la punta de la aguja depende de la presión negativa ejercida por la bomba de aspiración, del largo y ancho del sistema de tubos de colecta y del diámetro de la aguja utilizada. Por lo tanto, resulta más acertado expresar la presión de vacío como la cantidad de fluido colectado por minuto (ml de agua/min), que en milímetro de mercurio (mmHg), ya que un simple cambio en el diámetro de la aguja puede triplicar la cantidad de fluido recolectado (Bols *et al.*, 1996).

Este aspecto tiene gran importancia, pues existe una relación inversamente proporcional entre la presión de aspiración y el número de células del cúmulo del ovocito colectado, siendo que, a mayor número de células del cúmulus, mayor será la capacidad de maduración y desarrollo embrionario del ovocito (de Loos *et al.*, 1989).

Bols *et al.*, (1996) compararon tres diámetros de aguja y cinco presiones de aspiración y obtuvieron las mayores tasas de recolección con las agujas de mayor diámetro (18G), independientemente de la presión de aspiración utilizada, mientras que, para todos los tipos de agujas, las mayores tasas de recolección fueron logradas al aplicar las mayores presiones de aspiración. Sin embargo, las mayores cantidades de ovocitos con cúmulos intactos se obtuvieron al aplicar bajas presiones de aspiración y

al aumentar presión de aspiración, aumentó el número de ovocitos desnudos. Similares resultados fueron encontrados más tarde por Ward *et al.*, (2000).

En cuanto al diámetro de la aguja, Bols *et al.*, (1996) encontraron mayor cantidad de ovocitos con cúmulos intactos y menor ovocitos desnudos al utilizar agujas número 21 (21G) a bajas presiones. Galli *et al.*, (2001) y Petyim *et al.*, (2001) alcanzaron buenos resultados utilizando presiones entre 20-25 ml de agua por minuto y 12-15 mililitros de agua por minuto, empleando agujas con diámetro de 20G y 19G respectivamente, mientras Argov *et al.*, (2008) recomendaron una presión de aspiración de 25 mililitros de agua por minuto al utilizar agujas con un diámetro de 18G.

Denis (2006), después de probar tres presiones de aspiración demostró que una presión de aspiración de 26 mL de agua/min, resulta óptima tanto para la tasa de recolección como para la cantidad y calidad de los ovocitos recolectados, presiones inferiores y superiores a ésta (18 y 36 mm de agua/min), producen variaciones desfavorables en estos indicadores.

5.6.2 Factores biológicos de la OPU

Palma (2008), señaló algunos factores biológicos, entre ellos se encuentran la raza, edad, condición corporal, estado fisiológico, frecuencia y momento de aspiración relativos al momento del ciclo estral, fertilidad, respuesta individual ovárica y la estimulación hormonal de las donantes previa a OPU.

5.6.2.1 Raza de las donantes

Domínguez (1995) reportó una mayor cantidad de folículos en hembras de razas europeas comparadas con el Cebú y animales mestizos, aunque no se reportan

diferencias en la calidad de los ovocitos colectados. De Armas *et al.*, (1994) colectaron una mayor cantidad de CCOs por ovario en la raza Holstein respecto a los cruzamientos, sin embargo, la cantidad de blastocistos obtenidos después de la FIV fue superior en los animales mestizos.

Un tanto discrepante, Dayan *et al.*, (2000), Seneda *et al.*, (2002), Blaschi *et al.*, (2008), Carvalho *et al.*, (2008), Sartori y Barros (2011) y Gimenes *et al.*, (2015), han encontrado que las vacas Cebuínas, suelen tener mayor número de folículos reclutados por onda, por tanto, disponibles para OPU, en comparación con las vacas de razas europeas. Cruz *et al.*, (2009) encontraron un promedio de 16.3 CCOs procedente de vacas Bos indicus versus 4.6 ovocitos procedentes de vacas Bos taurus.

En un estudio realizado por Silva-Santos *et al.*, (2011), no se encontraron diferencias significativas en el número de folículos pre-antrales (primordiales, primarios o secundarios) en ovarios de fetos de novillas Bos taurus o Bos indicus. Esto sugiere que el número superior de folículos y mayor rendimiento en los programas OPU de animales cebuínos, puede estar asociado a una tasa de atresia folicular inferior en los Bos indicus que en los Bos taurus. Se continúan los estudios para confirmar esta hipótesis, no obstante, el número de folículos reclutados por onda en una vaca cebuína es el doble del observado en una Bos taurus según Baruselli *et al.*, (2012).

5.6.2.2 Edad y categoría de las donantes

La técnica de OPU puede ser empleada con el objetivo de acortar el intervalo generacional e incrementar el progreso genético (Aardema *et al.*, 2015; Mullaart *et al.*, 2015) en animales tan jóvenes como de 6, 9 o 10 meses de edad (Bols *et al.*, 1999). También puede ser aplicada con buenos resultados en vacas de hasta 15 años de edad (Matthiesen, 2011).

No obstante, la utilización de la OPU en animales muy jóvenes está limitada por el reducido tamaño de la pelvis, pero en dependencia del desarrollo del tracto genital y del tipo de transductor utilizado se han reportado algunos trabajos (Bols *et al.*, 1999).

Mullaart *et al.*, (2015) indicaron que la tasa de embriones producidos a partir de hembras con nueve meses de edad es mayor cuando éstas han presentado celo antes de la primera aspiración.

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 novillas de 12 meses de edad (Ireland *et al.*, 2011).

Además, las 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 de que vacas con un bajo conteo de folículos antrales, presentan varias características fenotípicas generalmente asociadas a la infertilidad.

Sin embargo, los resultados son un tanto contradictorio en algunas investigaciones. Nibart y Marquant-Le *et al.*, (1995) mostraron resultados de varios autores relacionados con la cantidad y calidad de ovocitos colectados, la tasa de colección y el promedio de embriones viables obtenidos al utilizar vacas o novillas como donantes, donde los mejores resultados en todos los indicadores evaluados están a favor de las vacas.

Denis (2006), demostraron que la categoría de la donante influye significativamente en los resultados de la técnica de OPU, cuando obtuvieron mejores resultados en las vacas con respecto a las novillas, independientemente de su estado reproductivo (gestantes o vacías).

En tanto que Su *et al.*, (2012) encontraron un mejor desarrollo embrionario en novillas de 12 meses de edad comparadas con vacas de 1 a 3 partos y de 8 partos a más, con hasta 15 años de edad. Ellos concluyeron que la edad de la donante de ovocitos puede afectar la competencia de desarrollo de ovocitos recuperados por OPU a través de la acción del balance hormonal de esteroides en el desarrollo folicular.

5.6.2.3 Condición fisiológica y corporal de las donantes

Es posible realizar la recolección de ovocitos en animales vivos hasta los 90 (Betancur *et al.*, 2011) o 100 días de gestación (Aller *et al.*, 2012). Se puede realizar además en hembras gestantes (Betancur *et al.*, 2011), después de haber sido estimuladas con eCG (Aller *et al.*, 2012) o con FSH (Meintjes *et al.*, 1995), aunque no siempre se logra obtener mayor número de ovocitos (Bungartz *et al.*, 1995).

Domínguez (1995) encontró un incremento en el número de folículos medianos y grandes en hembras gestantes comparado con hembras cíclicas. Argov *et al.*, (2008) observaron un incremento de ovocitos recolectados al aumentar el número de sesiones de aspiración en vacas al inicio de la lactancia.

Por otra parte, Domínguez (1995) reportó un incremento proporcional en la calidad de los ovocitos en la medida en que se incrementaba la condición corporal. López *et al.*, (1996) encontraron que la subnutrición que se manifiesta físicamente con una condición corporal desfavorable, no tuvo un efecto negativo en la morfología de los ovocitos, no obstante, se evidenció una disminución significativa en el número de blastocitos producidos *in vitro*.

Contradictoriamente Chrenek *et al.*, (2015) indicaron que la condición corporal afecta a la calidad inicial de los ovocitos, pero no afecta a la tasa de clivaje ni la tasa de blastocitos. Solís *et al.*, (2016) demostraron que hembras con baja condición corporal pre-estimuladas con FSH o eCG, pueden presentar igual calidad de ovocitos que las hembras con condición corporal normal.

En vacas lecheras superovuladas y clasificadas corporalmente en escala de 1 a 5, se logró colectar un número significativamente mayor de embriones cuando éstas se encontraban en una condición corporal entre 2,50 y 3,25 que cuando presentaban condiciones corporales mayores o menores (Kubovičová *et al.*, 2013). Leroy (2008) demostró que los cambios metabólicos detectados en el suero sanguíneo de vacas altas productoras de leche después del parto, están presentes también en el líquido folicular de los folículos dominantes, por lo que las posibilidades de desarrollo de los ovocitos presentes en estos, pueden verse limitadas.

Por otra parte, no todas las vacas tienen la misma cantidad de folículos en los ovarios. En la especie bovina se sabe que la cantidad de folículos primordiales se desarrolla durante la vida fetal (Aerts y Bols, 2010) y tiene una fuerte correlación con el estado nutricional de la madre, sobretodo en el primer tercio de la gestación (Evans *et al.*, 2010). Por lo tanto, las 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 en dicha etapa (Evans *et al.*, 2010).

5.6.2.4 Frecuencia y momento de aspiración relativos al momento del ciclo estral.

Una de las ventajas que ofrece esta técnica es que puede ser altamente repetible en un mismo animal, Pieterse *et al.*, (1991) obtuvieron buenos resultados al realizar la OPU en diferentes momentos del ciclo estral (días 3 o 4, 9 o 10 y 15 o 16 del ciclo estral), durante dos periodos (tres y seis meses).

Vos *et al.*, (1994) obtuvieron un número significativamente superior de ovocitos cuando realizaron la OPU 22 horas posterior al pico de LH, con respecto a cuándo realizaron ésta antes de que se produjera el pico de esta hormona. Acar *et al.*, (2013) con hembras del búfalo de agua, no encontraron diferencias en la cantidad y calidad de los CCOs colectados durante la fase folicular o luteal del ciclo estral

Por su parte Hendriksen (2004) obtuvo mayor calidad de CCOs cuando realizó OPU el día cinco del ciclo estral respecto a cuándo la realizó el día ocho, momento en que estuvo presente un folículo dominante, lo que sugiere que la presencia de este folículo inhibe el desarrollo del resto de los folículos subordinados. Gimenes *et al.*, (2015) aspiraron vacas Holstein, Nelore y Búfalo Mediterráneo a los días uno, tres y cinco después de la emergencia de la onda y no reportaron diferencias en cuanto al porcentaje de CCOs colectados y blastocitos producidos entre los tres momentos de aspiración.

Los resultados de Yamanouchi *et al.*, (2015) sugirieron que la presencia de un cuerpo lúteo no afectó la tasa de clivaje ni de producción de blastocitos, pero puede mejorar la eficiencia de la producción de embriones mediante el aumento de la calidad de los CCOs y los blastocitos. Del mismo modo Penitente- Filho *et al.*, (2015) encontraron que los ovarios con cuerpo lúteo mostraron un mayor número de ovocitos de buena calidad que los ovarios sin dicha estructura.

Merton *et al.*, (2003), Viana *et al.*, (2004) y Lopes *et al.*, (2006) reportaron mayor cantidad de CCOs viables para PIVE cuando se emplearon frecuencias de dos aspiraciones semanales en lugar de una, no obstante, estos resultados discrepan con los reportados por Chaubal *et al.*, (2006) y Solís *et al.*, (2012) quienes no encontraron diferencias en la calidad cuando los ovocitos fueron colectados una o dos veces por semana.

5.6.2.5 Fertilidad y respuesta individual de las donantes

Otra de las ventajas de la OPU es que puede ser empleada en aquellos animales que no tengan buena respuesta a los tratamientos superovulatorios (Boni, 2012). En Bélgica, el primer ternero nacido por esta técnica se logró a partir de un ovocito recolectado de una vaca de baja fertilidad, seguido de la transferencia de otros 56 embriones producidos *in vitro*, donde de las 12 gestaciones logradas siete correspondían a donantes de alto valor genético (Bols *et al.*, 1996). Otros trabajos también corroboraron la posibilidad de obtener ovocitos y embriones a partir de hembras que no responden a los tratamientos superovulatorios (Bols *et al.*, 1996).

La individualidad de la donante es otro factor que influye significativamente en los resultados de la OPU, causando gran variación en el número de ovocitos colectados y blastocistos producidos (Palma, 2008). De modo que se han reportado diferencias entre hembras de la misma raza que van desde 0 a 26 ovocitos recolectados por donante (Hasler *et al.*, 1995).

También, se ha determinado que el número de folículos antrales está positivamente correlacionado con el tamaño del ovario en animales adultos jóvenes, en tanto que

vacas con un bajo número de folículos antrales generalmente responden mal a la Superovulación (Evans *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2011).

5.6.2.6 Estimulación Hormonal previa a OPU

Existen numerosos reportes relacionados con la recolección exitosa de ovocitos, sin necesidad de utilizar algún tipo de estimulación hormonal, tanto en hembras Bos-Indicus (Pontes *et al.*, 2011; Morotti *et al.*, 2014), como en hembras Bos-Taurus (Morotti *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha encontrado animales con baja actividad ovárica (Bousquet *et al.*, 2000), donde se hace necesario utilizar una combinación de FSH-LH o de gonadotropina coriónica equina (eCG), las cuales son hormonas que tienen un efecto positivo en los tratamientos superovulatorios, aunque administran distintas dosis y se modifica el tiempo del tratamiento.

De Roover *et al.*, (2005) reportaron que cambios mínimos en las dosis de FSH influyen en el tamaño, pero no en el número de folículos, el cual sí se vio influenciado por la donante y el número de sesiones de OPU. No obstante, Murakami *et al.*, (2006), demostraron que la utilización conjunta de FSH con BTS provocó un número mayor de folículos que deben puncionarse y de ovocitos recolectados de óptima calidad.

Chong *et al.*, (2008) reportaron un incremento significativo en el número de folículos puncionados y ovocitos recolectados al estimular las donantes con eCG. Restrepo *et al.* (2011) encontraron un mayor número de CCOs cuando las hembras fueron preestimuladas con FSH en comparación con las hembras no estimuladas. Además, concluyeron que la inclusión de eCG en un esquema para la pre-estimulación ovárica con FSH, ejerce un efecto favorable sobre la calidad de los CCOs recuperados.

Vieira *et al.*, (2015) reportaron un mayor porcentaje de folículos de mediano tamaño (6 a 10 mm), pero una menor tasa de recuperación de CCOs a partir de vacas preestimuladas con FSH, con respecto a vacas no estimuladas. Sin embargo, también reportaron mayor tasa de producción de blastocitos a partir de las vacas preestimuladas.

Todas estas investigaciones indican que la pre-estimulación hormonal puede ser una herramienta importante a la hora de buscar mejores resultados. Sin embargo, tomando en cuenta la necesidad social de reducir el uso de hormonas en los animales de producción, lo recomendable es emplearla de forma circunstancial en casos de hembras con problemas de fertilidad, con pobre actividad ovárica o en las que no es posible realizar la colecta a intervalos cortos por factores de tiempo y/o distancia (Solís *et al.*, 2016).

6. Metodología

6.1 Ubicación Geográfica



Figura 4: Ubicación FCA

Fuente: Obtenida de Google Earth

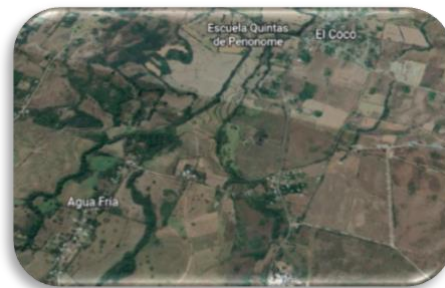


Figura 5: Ubicación Hacienda Agua Fría

Fuente: Obtenida de Google Earth

Esta investigación comprendió dos fases de trabajo: una de campo concerniente a los procedimientos de AFT y otra de laboratorio que involucró los procedimientos de clasificación de los ovocitos colectados.

Se realizó AFT de novillas Fleckvieh en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agropecuarias (CIBA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, República de Panamá; ubicado en el corregimiento de Chiriquí, Provincia de Chiriquí; localizado a los 8°23'15,12" de latitud norte y 82°19'47.48" de longitud oeste, con una elevación de 26 msnm. Del mismo modo, se realizó AFT en la Hacienda Agua Fría en el Distrito de Penonomé provincia de Coclé; localizado a los 8° 24` 58`` de latitud norte y 80° 20` 51`` de longitud oeste, con una elevación de 29 msnm. La fase de laboratorio, se realizó en el Laboratorio THERIOGENETIC®, ubicado a unos 5 km del CIBA en el corregimiento de Los Algarrobos, Provincia de Chiriquí, República de Panamá.

6.2 Sujetos Experimentales

En esta investigación se emplearon un total de 16 novillas, ocho (8) de la raza Fleckvieh y ocho (8) de la raza Gyr, las cuales fueron sometidas a AFT. Dentro de raza, las mismas eran homogéneas las siguientes variables:

- Raza: Fleckvieh y Gyr
- Etapa biológica: Novillas
- Edad: 18 a 26 meses
- Peso: 330 a 375 kg.
- Condición corporal: 3 a 3.75 en escala de 1 a 5
- Estatus reproductivo: Cíclicas sin patologías del aparato genital
- Alimentación: Sal mineral *ad libitum*

Entre razas las mismas eran heterogéneas en las siguientes variables:

- Manejo
- Alimentación
- Condiciones climáticas



Figura 6: Animales Gyr para AFT



Figura 7: Infraestructura FCA (CIBA)

6.3 Procedimiento de Aspiración Folicular Transvaginal



Figura 8: Equipo de AFT



Figura 9: Proceso de AFT a novillas Gyr

Previo al inicio de la recolecta de ovocitos con AFT, la onda folicular de las novillas fue sincronizada empleando el método de ablación de folículos mayores a 10 mm con AFT. Esto permitió el desarrollo armónico de los folículos en todas las novillas empleada. Cuatro días después de efectuada la ablación de los folículos se realizó la primera sesión de aspiración a todos los animales y una segunda sesión cuatro días después de la primera.

Para el desarrollo del procedimiento de AFT, las hembras fueron anestesiadas de forma regional con Lidocaína al 2% (3 a 5 mL/vaca, vía epidural), lo cual evitó las contracciones rectales y facilitó la manipulación de los ovarios.

Se empleó un ultrasonido marca SIUI®, el cual consta de un transductor convexo de 6.5 MHz, acoplado a un sistema de guía de agujas marca WTA®. El sistema de guía de agujas fue equipado con agujas de 20G x 2" unidas a líneas para aspiración folicular (mangueras de silicona), y estas a su vez a un tubo cónico de 50 mL (tubo de colecta), mediante un tapón metálico para aspiración folicular marca WTA®. El tapón metálico se une a una bomba de vacío (Pioneer® pro pump) mediante una manguera de silicona de 8 mm de diámetro.

A cada tubo cónico empleado en el procedimiento le fue adicionado aproximadamente 5 mL de solución salina más heparina a razón de 10000 UI de heparina por cada 100 mL de solución salina. El transductor acoplado al sistema de guía de agujas se introdujo por vía transvaginal en dirección dorso-craneal hasta localizar el cuello del útero.

Los ovarios fueron manipulados con la mano libre del operador por vía transrectal, de forma tal que se colocaron contra el transductor, permitiendo así visualizar los folículos en la pantalla del ultrasonido. Con la aguja se atravesó la pared vaginal hasta llegar a los ovarios, aspirando de esta forma todos los folículos visibles ($\varnothing \geq 5\text{mm}$).

Se aplicó una presión de vacío aproximada de 80 mmHg (previamente calibrada a 26 mL de agua/min), de manera que el licor folicular junto con el medio y los ovocitos llegaron hasta el tubo cónico, que fue llevado hasta el laboratorio para realizar la búsqueda y selección de los ovocitos.

6.4 Clasificación de los ovocitos colectados por AFT

El contenido del tubo cónico de colecta fue depositado en filtros para embriones EmCon™ con maya de 75 μm . Seguidamente se adicionó solución salina dejando pasar líquido a través del filtro, hasta aclarar el contenido y facilitar la búsqueda de los ovocitos, la cual fue realizada bajo visión estereoscópica en placas petri de búsqueda ($\varnothing = 100 \times 100 \text{ mm}$).

Los ovocitos colectados en cada sesión de aspiración fueron contabilizados, evaluados morfológicamente y clasificados, tomando como referencia los criterios propuestos por de Loos *et al.* (1989), donde los ovocitos de grado 1: se consideraron como excelentes, grado 2: buenos, grado 3: regulares y grado 4: malos.

Los ovocitos de grado 1, 2 y 3 son considerados viables para PIVE, en tanto que los ovocitos grado 4 son considerados no viables. Dicha escala de clasificación se describe a continuación en la tabla uno.

Tabla 1. Clasificación de los ovocitos colectados por AFT

Grado 1
<ul style="list-style-type: none">• Cúmulos con capas múltiples (entre 3 y 5)• Cúmulus compacto• La totalidad del cúmulus es clara y transparente• Citoplasma homogéneo
Grado 2
<ul style="list-style-type: none">• Cúmulus como en el grado uno o algo más oscuro y menos transparente.• Citoplasma con granulación más gruesa y más oscura en la periferia que en grado uno.
Grado 3
<ul style="list-style-type: none">• Cúmulus menos compacto (menos de 3 capas de células), más oscuro que en uno o dos.
Grado 4
<ul style="list-style-type: none">• Sin cúmulus o con cúmulus expandido.

Adaptada de De Loos, *et al.*, (1989).

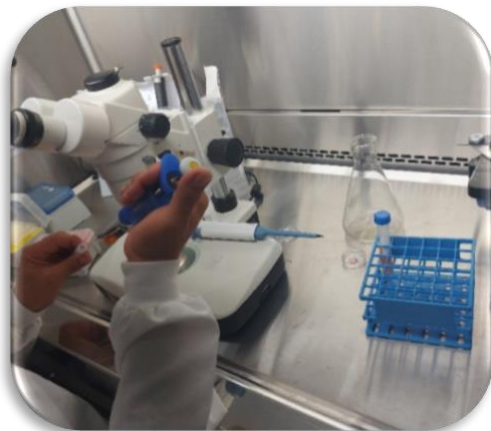


Figura 10: Proceso en Laboratorio

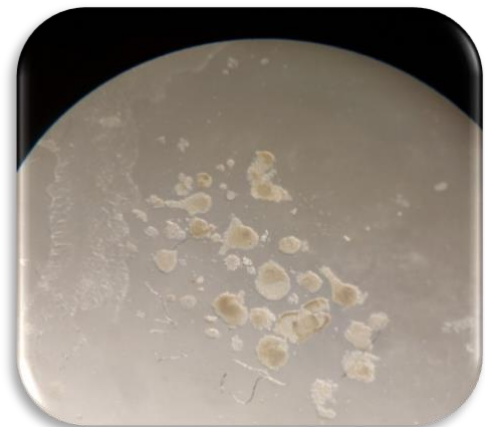


Figura 11: Ovocitos viables

6.5 Análisis Estadístico

Las hembras empleadas fueron los tratamientos (16 tratamientos). Cada hembra fue aspirada dos veces (dos replicas por tratamiento) lo que dio un total de 32 observaciones.

Los datos fueron evaluados empleando un Diseño de Bloques Aleatorizado (DBA) tomando como criterio de bloque la raza de las hembras empleadas. Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05 y un nivel de confianza de 95%. Se empleó el test de Duncan para realizar las comparaciones de medias entre los tratamientos. Los datos fueron analizados empleando el software estadístico infostat versión 2020.

6.5.1 Modelo lineal aditivo

$$Y_{ij} = u + t_i + b_j + r_k + (tbr)_{ijk} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Variable dependiente

u : Media general del experimento

t_i : Efecto del tratamiento

b_j : Efecto de bloque

r_k : Efecto de replica

$(tbr)_{ijk}$: Efecto de la interacción tratamiento por bloque por réplica

e_{ij} : Error aleatorio

1. Resultados y Discusión

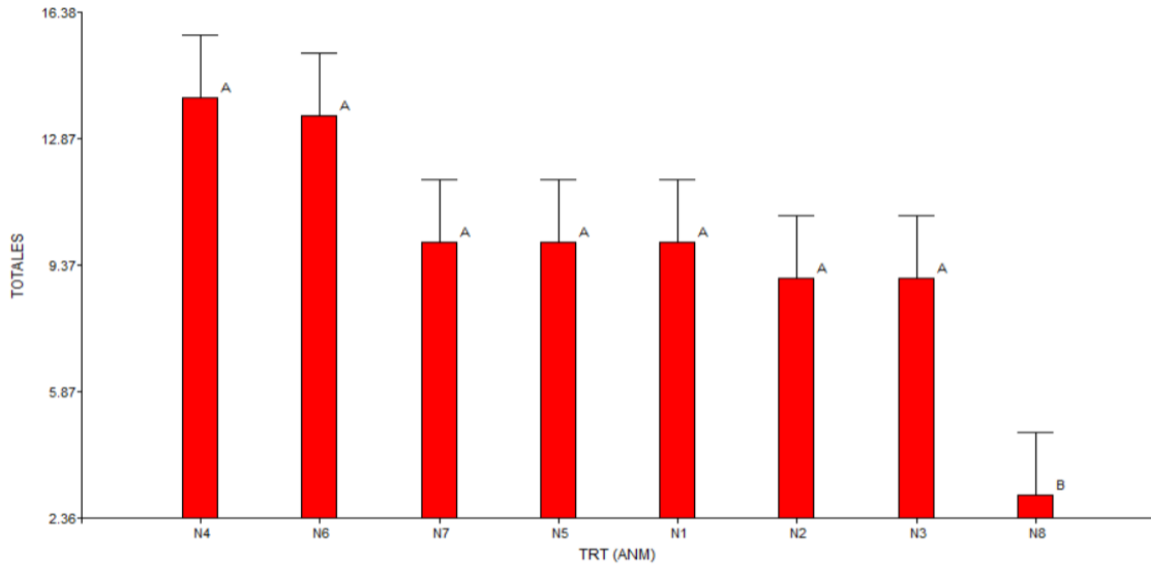
En contraposición con múltiples investigaciones que sustentan que las razas cebuinas suelen tener mayor número de folículos reclutados por onda, por tanto, disponibles para AFT en comparación con las razas europeas (Dayan *et al.*, 2000, Seneda *et al.*, 2002, Blaschi *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2008, Sartori y Barros 2011 y Gimenes *et al.*, 2015), en esta investigación no encontramos diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) para el número de ovocitos colectados, entre las hembras Fleckvieh y Gyr como se aprecia en la tabla dos.

Tabla 2. Promedios de ovocitos colectados en las razas evaluadas

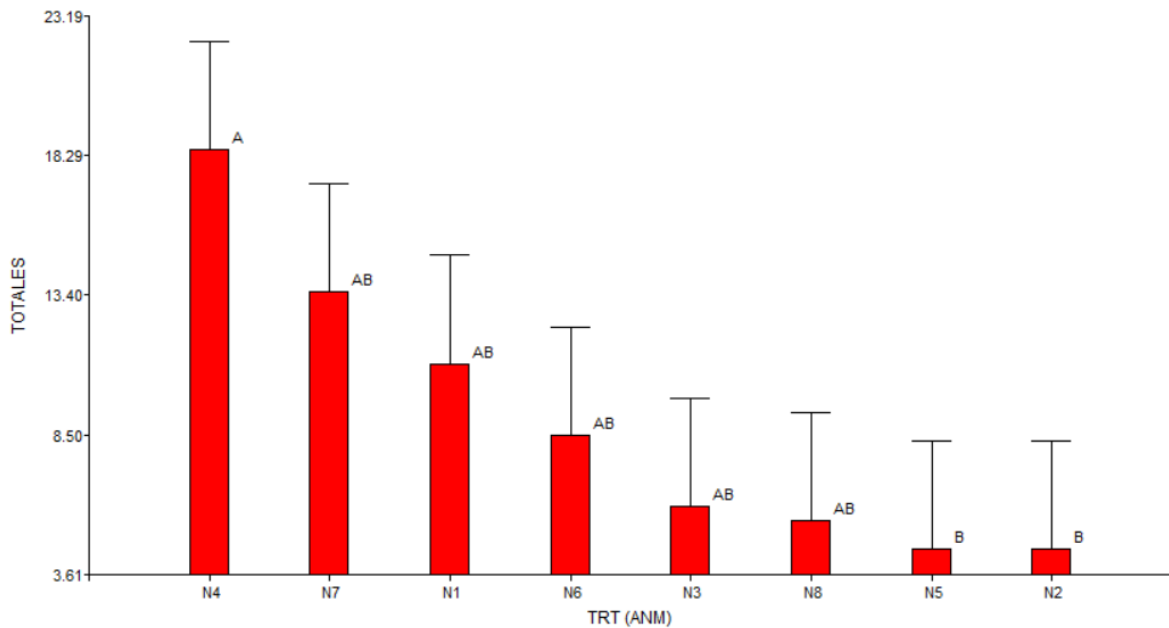
RAZA	N	PROMEDIO DE OVOCITOS VIABLES	PROMEDIO TOTAL DE OVOCITOS
GYR	16	5.94 ^a EE0.76	9.81 ^a EE1.04
FLECKVIEH	16	6.63 ^a EE0.76	9.00 ^a EE1.04

Columnas con letras distintas difieren significativamente

Cuando se analizó la variable número de ovocitos totales colectados por AFT en hembras de la raza Gyr, se encontró que un animal manifestó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) con respecto al resto, como se aprecia en la gráfica uno. De igual forma al estudiar los resultados ostentados por las novillas Fleckvieh se encontró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las hembras evaluadas, para el número total de ovocitos colectados (gráfica dos).



Gráfica 1. Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Gyr.



Gráfica 2. Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Fleckvieh.

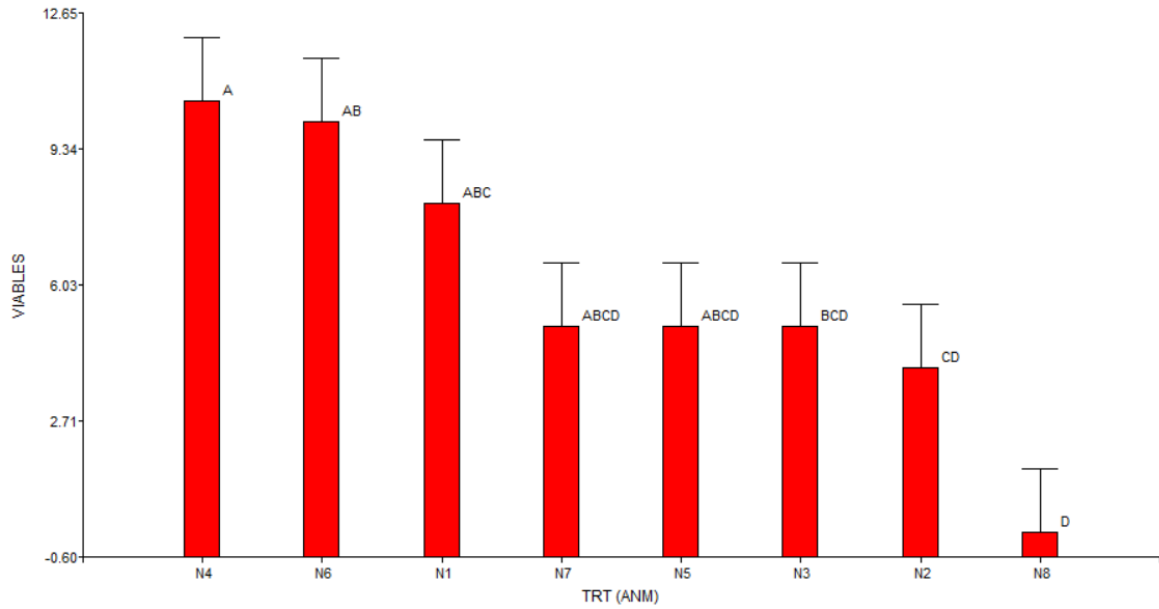
En un estudio realizado por Hidaka *et al.*, (2018), señalan que las variaciones entre donantes individuales de ovocitos representan un problema grave en el ganado para

producción, al implementar la recogida de óvulos (OPU) y la maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos. Sin embargo, se desconoce la causa precisa de este problema. Yang *et. al.*, (2008), encontraron variabilidad individual en las donantes de ovocitos para producción de embriones clonados *in vitro*, la producción media individual de ovocitos varió significativamente en cantidad. Después de clasificar las novillas por producción de ovocitos, se observó que la novilla H1 (4.4 ± 0.5) tenía la producción media más baja de ovocitos por sesión, mientras que la H5 (10.7 ± 2.0) tenía más alto.

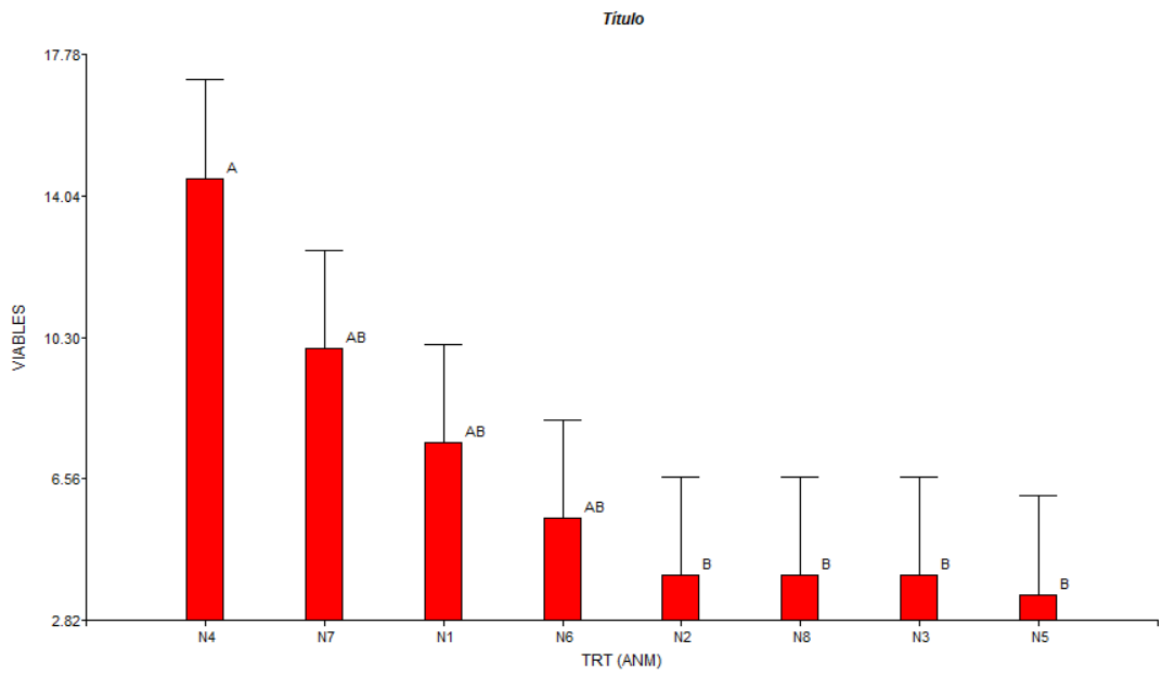
Aunque la mayoría de los autores desconocen la causa precisa de la variabilidad individual, muchos la atribuyen a la expresión de algunos genes que tienen efecto directo sobre las producciones de ovocitos, embriones, incluso hasta la implantación en la hembra receptora. Calderón (2015), observó que los valores promedio de número de folículos, de cuerpos lúteos y de embriones recolectados fueron mejores en aquellas donadoras que presentaban niveles altos de la hormona Antimulleriana (AMH).

Kumar *et. al.*, (2021), quienes estudiaron la presencia de algunos genes importantes presentes en casi todos los procesos que implican la PIVE, como los son: Proteína de choque térmico (HSP 70.1), Factor de diferenciación del crecimiento (GDF9), Proteína morfogenética ósea (BMP15), Conexina (CX43), entre otros. Concluyeron que estos genes tienen una relación directa con el fenómeno de la variabilidad individual.

Al estudiar los resultados ostentados por las novillas Fleckvieh y Gyr se encontró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las hembras evaluadas, para el número de ovocitos viables para PIVE, como se aprecia en las gráficas tres y cuatro.



Gráfica 3. Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Gyr.



Gráfica 4. Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Fleckvieh.

Nuestros resultados son coincidentes con las apreciaciones de Seneda *et al.*, (2002), quienes indicaron que, a pesar del potencial similar entre los individuos de la misma

raza, la variabilidad entre las distintas donantes para producir una población viable de folículos puede influir en los resultados de la AFT. Sin embargo, no se encontró en la literatura investigaciones que comparen estadísticamente el número de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT entre animales de la misma raza, incluso entre razas diferentes.

Como se señaló, este fenómeno puede estar estrechamente relacionado con un factor genético, como lo reportaron Santos-Biase *et. al.*, (2012), quienes estudiaron los polimorfismos de los genes antes mencionados y cómo influyen en la calidad y cantidad de ovocitos, encontraron que una modificación de un solo nucleótido del gen GDF9 observó una diferencia significativa en el número de ovocitos viables.

Como hemos visto, la calidad de los ovocitos colectados por AFT presenta mayor variabilidad entre donantes de ovocitos, si se compara con el número total de ovocitos colectado. Esto sugiere que el número de folículos que emergen en una onda de desarrollo folicular, lo cual influye sobre las tasas de recolección de ovocitos por AFT, es menos variable entre animales homogéneos, sin embargo, los procesos de desarrollo ovocitario intra folicular que influyen sobre la calidad del ovocito representan una mayor fuente de variación entre individuos homogéneos.

7. Conclusiones

Se concluye que no existen diferencias para el número y calidad de ovocitos colectados por aspiración AFT entre novillas de las razas Gyr y Fleckvieh.

Existe variación individual para número total de ovocitos colectados por AFT entre individuos de la misma raza, etapa biológica, edad, peso, condición corporal, estatus reproductivo y alimentación.

Existe variación individual en el número de ovocitos viables para PIVE obtenidos por AFT entre individuos de la misma raza, etapa biológica, edad, peso, condición corporal, estatus reproductivo y alimentación.

8. Recomendaciones

Considerar la variación individual como criterio de selección de hembras donantes de ovocitos en los sistemas de producción in vitro de embriones.

Considerar la variación individual como un factor de variación en los diseños experimentales propuestos en experimentos de aspiración folicular.

9. Referencias Bibliográficas

- Aardema, A; Dotinga, F; Flapper, H; Brink, A.V.D; Pietersma, N; Schouten, H.K.J; y Mullaart, E. 2015. Fertility effects of performing ovum pick up at young age. *Animal Reproduction*, 12(3): 726-726.
- Acar, D.B; Birdane, M.K; Dogan, N; Gurler, H. 2013. Effect of the stage of estrous cycle on follicular population, oocyte yield and quality, and biochemical composition of serum and follicular fluid in Anatolian water buffalo. *Animal Reproduction Science*, 137(1): 8-14.
- Adams, G.P; Kot, K; Smith, C.A; Ginther, O.J. 1993. Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(2): 267-275.
- Adams, G.P, Pierson R. 1995. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*, 43, 113-120.
- Adams, G.P; Jaiswal, R; Singh, J; Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1): 72-80.
- Aerts, J.M.J; Bols, P.E.J. 2010b. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animal*, 45: 180-187.
- Aller, J.F; Mucci, N.C; Kaiser, G.G; Callejas, S.S; Alberio, R.H. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Animal Reproduction Science*, 133(1): 10-15.
- Argov, N; Arav, A; Sklan, D. 2008. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology*, 61: 947-962.
- Bage; Renée; Petyim; Sudsaijai; Larsson; Birgitta; Hallap; Triin, Bergqvist; Ann-Sofi; Gustafsson; Hans; Rodriguez M; Heriberto. 2003: Oocyte competence in repeat-breeder heifers: effects on optimized Ovum pick-up Schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. *Reproduction fertility and Development* (15):115-123.
- Baker T. 1963. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of Royal Society of London*. 158: 417-433.
- Basini, G.; Baratta, M.; Ponderato, N. 1998. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod Fertil Dev*, v,10, n.6, p.471-478.
- Baruselli, P.S; Sa Filho, M.F; Ferreira, R.M; Sales, J.N.S; Gimenes, L.U; Vieira, L.M; Mendanha, M.F; Bo, G.A. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal

oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4): 134–141.

Bendel-stenzel M; Anderson R; Heasman J; Wilie C. 1988. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in cel and developmental biology*. 9: 393-400.

Betancur, G.R; Oquendo, J.G; Araque, N.V. 2011. Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Revista Politécnica*, 7(13): 16-21.

Bielanska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology*. 6: 161-193.

Blaschi, W; Andrade, E.R; Nonato Junior, I; Pontes, J. H. F; Ereno Junior, J.C; Uvo, S; Seneda, M.M. 2008. Utilização prévia do Pluset na aspiração folicular: impacto na produção in vitro de embriões em vacas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 186.

Bo, G.A. y Mapletoft, R.J. 1999. Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de Superovulación de donantes de embriones. *Taurus*, 1(4): 14-27.

Bo, G.A. y Caccia, M. 2000. Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino. *Taurus*, 5: 23-39.

Bo, G.A. 2002. Dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. En: XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal (Del 22 al 26 de octubre de 2002, Valera, Venezuela). Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) Córdoba, Argentina. p-p 1-17.

Bols, P.E.J; Vandenheede, J.M.M; Van Soom, A; de Kruif, A. 1995. Transvaginal Ovum Pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guide guidance system. *Theriogenology*, 45: 1001-1014

Bols, P.E.J; Van Soom, A; Ysebaert, M.T; Vandenheede, J.M.M; Kruif, A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 1001-10014.

Bols, P.E.J; Van Soom, A; Vanroose, G; de Kruif, A. 1996. Transvaginal OPU in infertile Belgian Blue donor cows preliminary results. *Theriogenology*, 45:359.

Bols, P.E.J; Ysebaert, M.T; Lein, A; de Kruif, A. 1999. Pregnancies from prepubertal heifers following repeated oocyte collection and IVF between 6 to 12 months of age. *Theriogenology*, 51: 298.

Boni, R. 2012. Ovum Pick-up in cattle—a 25-yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 9(3): 362-369.

- Bousquet, D; Twagiramungu, H; Durocher, J; Barnes, F.L; Sirard, M.A. 2000. Effect of LH injection before ovum pick-up on in vitro embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. *Theriogenology*, 53: 347.
- Buccione R; Schroeder A.C; Eppig J.J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43:543- 547.
- Bungartz, L; Lucas-Hahn, A; Rath, D; Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotrophin pre-treatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43: 667-675.
- Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, v.15, p.7-10.
- Buxadé C. 1995. *Zootecnia; Bases de la Producción Animal*. Tomo I. Madrid, Esp. Mundi-Prensa libros S.A. 306p.
- Byskov A.G. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*. 66: 71-117.
- Calderón C. 2015. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona antimulleriana en vacas donadoras. Universidad Autónoma de Baja California. Nuevo León, Mexicali, Baja California.
- Canipari R. 1994. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote*. 2: 243-245.
- Caravaca R.F; Castel G.J; Guzmán G.J; Delgado P.M; Mena G; Alcalde A.M; Gonzales R.P. 2005. *Bases de la Producción Animal*. Sevilla, España. 491p.
- Carvalho, J.B.P.D; Carvalho, N.A.T.D; Reis, E.L; Nichi, M; Souza, A.H. D. y Baruselli, P. S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69(2): 167-175.
- Cortvrindt, R; Smits, J. 2001 In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.3-9.
- Chaubal, S.A; Molina, J.A; Ohlrichs, C.L; Ferre, L.B; Faber, D.C; Bols, P.E.J; Riesen, J.W; Tian, X; Yang, X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65(8): 1631-48.
- Chong, M.G; Denis, R.G; Lliteras, E; Gallego, C; Fuentes, D.S; Pérez, A; del Valle, C. 2008. Efecto de la estimulación intraovarica con ECG sobre la población folicular y la recolección de ovocitos por punción in vivo. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 2: 39-41.
- Chrenek, P; Kubovičová, E; Olexíková, L; Makarevich, A.V; Toporcerová, S; Ostró, A. 2015. Effect of body condition and season on yield and quality of in vitro produced bovine embryos. *Zygote*, 23(06), 893-899.

- Cruz, F.B; Martins, L.T; Marinho, L.S; Forell, F; Vieira, A; Mezzalira, A. 2009. Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. *Ciencias Agroveterinárias*. 8 (2): 184-187.
- Dayan, A; Watanabe, M.R; Watanabe, Y.F. 2000. FIV. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, (28)1: 181-185.
- Dayan, André. 2001. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. São Paulo: UNESP-Botucatu, 56p. *Disertación (Maestría)*.
- De Armas, R. 2007. Transferencia de embriones en el ganado bovino. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Chiriqui, Panamá. 45-48p.
- De Armas, R; Solano, R; Pupo, C.A; Aguilar, A; Aguirre, A; Riego, E; Castro F.O. 1994. Effect of the donor oocyte breed on *in vitro* fertilization results in cattle. *Theriogenology*, 41: 186
- De Loos, F; Van Vliet, C; Van Maurik, P; Kruip, ThAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*. 24: 197-204.
- Del Valle, D.T. 1999. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. *Rev. Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*, 40(1): 3-18.
- Denis R.G; prado J.A; Puertas N; Fuentes D; Bernal A.S; Nuñez I; Torres A; Ruiz M; Cardenas M. 2000. Introducción de la ultrasonografía en la reproducción animal. Manual. CIMA, La Habana, Cuba. pp 2-40.
- Denis, R. 2006. Manipulación de las ondas foliculares y obtención sostenible de ovocitos de calidad en hembras del genotipo Siboney de Cuba. *Disertación Doctoral*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinaria. Instituto De Ganadería Tropical. La Habana, Cuba.
- Denis, R. 2008. Aspiración folicular *in vivo* (OPU): una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 2(2): 57-70.
- De Roover, R; Genicot, G; Leonard, S; Bols, P.E.J; 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.
- DesCôteaux, L; Colloton, J; Gnemmi, G. 2014. *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 246 p.
- Domínguez, M.M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43: 1405-1418.
- Dong j; Albertini D.F; Nishimori K; Kumar T.R; Lu N; Matzuk M.M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383: 531-535.
- Donnay I; De roover R, Van Langendonck A; Massip A; Dessy, F. 1997. Overall efficiency of an experimental ovum pick-up program in cattle. *Theriogenology*. 47. 155.

- Dube J.L; Wank P; Elvin J; Lyons K.M; celeste A.J; Matzuk M.M. 1988: The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular endocrinology*. 12: 1809-1817.
- Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, 25(3); 800-805.
- Erickson, B.H.; Reynolds, R.A.; Murphree, R.L. 1976. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biol. Reprod.*, v.15, p.555-560.
- Evans, A.C.O; Mossa T.F; Lonergan, P; Smith G.W; Jimenez-Krassel, F; Folger, J.K; Ireland, J.L.H; Ireland, J.J. 2010. Variation in the number of ovarian follicles in cattle: possible causes and consequences. *Acta Scientiae Veterinarie*, 38: 537-543.
- Faes, R.F.; Caldas-Bussiere, M.C.; Mosa-E-Silva, A.A.M. 2007. Relationship among nitric oxide, progesterone and estradiol-17 β concentrations in follicular fluid during follicular development in cattle. *Anim reprod*, v.4, n.1/2, p.31-37.
- Fernandez A.T. 2003. Dinámica folicular: Funcionamiento y regulación. Montevideo, Uruguay. Disponible en línea:http://www.produccion-animal.com.ar/inforacion_tecnica/inseminacion_artificail723-ondas_foliculares.htm.
- Findlay, J.K.; Kerr, J.B.; Britt, K. 2009. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Anim Reprod*, v.6, n.1, p.16-19.
- Fortune, J.E. 2002. Activation of primordial follicles. In: Eppig J., Hegele-Hartung C.H., Lessl M. (eds.) *The future of the oocyte basic and clinical aspects*. Nueva York: Springer. p.11-21.
- Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Oestrus cycles in Bos Taurus cattle. *Animal Reproduction Science*. 79: 135-163.
- Fricke P.M. 2001. Manipulación de la función ovárica. Wisconsin, USA. Disponible en línea: http://vaca.agro.uncor.edu/-pleche/material/material%20II/A%20archivos%20internet/Reproducci%F3n/du_605.es.pdf.
- Galli, C; Crotti, G; Notari, C; Turín, P; Duchi, R; Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55: 1341-1357.
- Gimenes, L.U; Ferraz, M.L; Fantinato-Neto, P; Chiaratti, M.R; Mesquita, L.G; Sá Filho, M.F; Baruselli, P.S. 2015. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in Bos indicus, Bos taurus, and Bubalus bubalis. *Theriogenology*, 83(3): 385-393.
- Ginther, O.J; Kastelic, J.P; Knopf, L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 20(3):187-200.

- Goodman A. y Hodgen G.D. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research* 39: 1-73.
- Gordon I. 1996. *Controlled Reproduction in cattle and Buffaloes*. Dublin, Ireland. Cab international. 523 p.
- Ginther, O.J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.61-79.
- Gpetyim, S; Bage, R; Larsson, B; Hallap, T; Bergqvist, A.S; Gustafsson, H; Rodríguez, M.H. 2001. Effect of repeated follicular puncture on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *Journal of Veterinary Medicine*, 48(8): 449-463.
- Hansel W; Alila H.W; Dowd J.P; milvae R.A. 1991. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 43: 77-89.
- Hasler, J.F; Henderson, W.B; Hurtgen, P.J; Jin, Z.Q; McCauley, A.D; Mower, S.A; Neely, B; Shuey, L.S; Stokes, J.E. Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 3: 141-152.
- Hendriksen, P.J.M. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocyte. *Theriogenology*, 61: 909920.
- Hidaka, T., Fukumoto, Y., Yamamoto, S., Ogata, Y., & Horiuchi, T. 2018. Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 113, 176–182.
- Hussein, MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum ReprodUpdate*, 11:162-178.
- Hsueh, A.J.W.; Billing, H.; Tsafiriri, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*, 15(6):707-725.
- Ireland, J.J; Smith, G.W; Scheetz, D; Jimenez-Krassel, F; Folger J.K; Ireland, J.L.H; Mossa, F; Lonergan, P; Evans, A.C.O. 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, A.L. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, 78:185-201.
- Knopf, L.; Kastelic, J.P.; Schallenberger, E. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypotesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.6, p.111-120.

- Kubovičová, E; Makarevic, A; Stádnik, L; Holásek, R; Hegedusová, Z. 2013. Effect of body condition and season on the yield and quality of cattle embryos. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (Special issue 1): 1426-1435.
- Leroy, J.L.M.R. 2008. Metabolic Changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, 62: 1311-1314.
- Looney, C.R; Lindsey, B.R; Gonseth, C.L; Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- López, L.R; Alvarez, N; Nuñez, I; Montes, I; Solano, R; Fuentes, D; Pedroso, R; Palma, G.A; Brem, G. 1996. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology*, 1(45):292.
- Lopes, A.S; Martinussen, T; Greve, T; Callesen, H. 2006. Effect of Days Post-Partum, Breed and Ovum Pick-Up Scheme on Bovine Oocyte Recovery and Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(3), 196-203.
- Lucy, M.C; Savio, J.D; Badinga, L; De la Sota, R.L; Thatcher, W.W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, 70: 3615-3626.
- Majerus, V; De Roover, R; Etienne, D; Kaidi, S; Massip, A; Dessy, F; Donnay, I. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52(7): 1169–1179.
- Matthiesen, M.M. 2011. Effect of donor age on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes obtained by repeated OPU from nonstimulated and FSH-superstimulated German Simmental heifers and cows at different life cycle stages. *Disertación doctoral. Tesis en opción al grado de Doctor en Veterinaria. Universidad Ludwig-Maximilian. Múnich, Alemania.*
- Meintjes, M; Bellow, M.S; Paul, J.B; Broussard, J.R; Li, L.Y; Paccamonti, D; Eilts, B.E; Godke, R.A. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol. Reprod. Mono*, 1: 281-292.
- Merton, J.S; De Roos, A.P.W; Mullaart, E; De Ruigh, L; Kaal, L. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674.
- Morotti, F; Sanches, B.V; Pontes, J.H.F; Basso, A.C; Siqueira, E.R; Lisboa, L.A; Seneda, M.M. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, 81(5): 696-701.
- Murakami, M; Pérez O; Ferguson, E; Behboodi, E; Denniston, R.S; Godke, R.A. 2006. Use of in vivo-recovered oocytes and adult somatic cells from the same donor for nuclear transfer in cattle. *The Veterinary Record*, 153: 713-714.

- Mullaart, E, Dotinga, F, Flapper, H, van de Brink, A, Pietersma, N. y Schouten, J. 2015. Ovum-pick Up in Holstein-Friesian cows at 9 to 10 months of age. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(1): 209-210.
- Murphy, M.G; Enright, W.J; Crowe, M.A; McConnell, K; Spicer, L.J; Boland, M.P; Roche, J.F. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92(2): 333-338.
- Nibart, M. y Marquant-Le, G.B. 1995. Production d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elevage et Insémination*, 266: 1-23.
- Nilsson, E.; Parrot, J.A.; Skinner, M.K. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 175:123-30.
- Palma, G.A. 2008. *Biología de la Reproducción*. Mar del Plata, 2a Ed. Córdoba, Argentina. 669 p.
- Penitente-Filho, J.M; Jimenez, C.R; Zolini, A.M; Carrascal, E; Azevedo, J.L; Silveira, C.O; Torres, C.A.A. 2015. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Journal of Animal Science*, 86(2): 148-152.
- Perry, G. 2012. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals (en línea). IETS Data Retrieval Committee. Disponible en: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2013.pdf. Consultado 19 de julio de 2014.
- Pieterse, M.C; Kappen, K.A; Kruip, Th.A.M; Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Pieterse, M.C; Vos, P.L.A.M; Kruip, Th.A.M; Wurth, Y.A.; van Beneden, Th.H; Willemsse, A.H; Taverne, M.A.M. 1991. Transvaginal Ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35: 19-24.
- Pontes, J.H.F; Sterza, F.M; Basso, A.C; Ferreira, C.R; Sanches, B.V; Rubin, K.C.P; Seneda, M.M. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75(9): 1640-1646.
- Quintela, L.A; Días, C; Garcia, P; Peña, A; Becerra, J.J. 2006. *Ecografía y reproducción en la vaca*. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. 92 p.
- Rath, D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer News*, 11: 10-15.
- Restrepo, B.G; Gómez, O.J; Vasquez, A.N. 2011. Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Revista Politécnica*, 7(13): 16-21.

- Roberts, S.J. 1971. Veterinary obstetrics and genital diseases. Second edition. Ithaca-NY: Ed. Edwars brothers inc. p.343-375.
- Sartori, R, y Barros, C.M. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3): 244-250.
- Sasamoto, Y; Sakaguchi, M; Katagiri, S; Yamada, Y; Takashashi, Y. 2006. The effects of Twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum Pick-up in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(10): 1083-1086.
- Savio, J.D; Keenan, L; Boland, M.P; Roche, J.F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 663-671
- Scott, C.A; Robertson, L; de Moura, R.T.D; Paterson, C; Boyd, J.S. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *The Veterinary Record*. 134(17): 440-443.
- Seneda, M.M; Esper, C.R; Andrade, E.R; Garcia, J.M; Oliveira, J.A. 2002. Shorter interval between FSH administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery. *Theriogenology*, 57: 684.
- Silva-Santos, K.C; Santos, G.M.G; Siloto, L.S; Hertel, M.F; Andrade, E.R; Rubin, M.I.B; Sturion, L; Melo-Sterza, F.A; Seneda, M.M. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76: 1051–1057.
- Simon, L; Bungartz, L; Rath, D; Niemann, H; 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, 39(1): 312.
- Sirois, J; Fortune, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, 39(2): 308-317
- Solís, C.A; Guerra, R; Sandoya, G; y De Armas, R. 2012. Efecto de la sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *REDVET, Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10): 1-16.
- Solís, C.A; Grajales, J; De Armas, R. 2015. Efecto del diámetro de la aguja, presión de aspiración y tamaño de los folículos sobre la tasa de recuperación y calidad de ovocitos obtenidos por aspiración folicular en bovinos. Chiriquí, Panamá.
- Solís, C.A; Guerra, R; Denis R; De Armas, R. 2016. Efecto de la estimulación hormonal sobre los resultados de la aspiración folicular (OPU) en novillas Brahman anéstricas con baja condición corporal. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 9(2): 137-145.
- Su, L; Yang, S; He, X; Li, X; Ma, J; Wang, Y; Ji, W. 2012. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2): 184-189.

- Taneja, M. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of Reproduction*, 62(1): 206-213.
- Taylor, C; Rajamahendran, R. 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 71(1): 61-68.
- Velázquez, D.J. y Mendieta, M.E. 2005. Factores que regulan el desarrollo folicular II: (en línea). UAM-Iztapalapa. DF, México. Consultado 23 septiembre 2019. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros98/folicular.htm>.
- Viana, J.H.M; Camargo, L.S.A; Ferreira, A.M; Sa, S.G; Fernández, C.C; Marquez, A.P. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, 84(1-2): 1-12.
- Vieira, L.M; Bó, G.A; Mapletoft, R.J. 2015. Superstimulation strategies for ovum pickup in Holstein donors. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2): 256-256.
- Vos, P.L.A.M; de Loss, F.A.M; Pieterse, M.C; Bevers, M.M; Taverne, M.A.M; Dieleman, S.J. 1994. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. *Theriogenology*, 41: 29840.
- Ward, F.A; Lonergan, P; Enright, B.P; Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technologic. *Theriogenology*, 54: 33-46.
- Yamanouchi, T, Matsuda, H, Ohtake, M, Aikawa, Y, Goto, Y, Kobayashi y Hashiyada, Y. 2015. Effect of corpus luteum presence for the duration of follicular growth on bovine oocyte developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2): 228-228.
- Yang, X.-Y., Zhao, J.-G., Li, H., Liu, H.-F., Huang, Y., Huang, S.-Z., ... Zeng, Y.-T. (2008). Effect of individual heifer oocyte donors on cloned embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, 104(1), 28–37.