

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

**EFFECTO 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.**

JOSEPH GRAJALES

CIP: 4 – 759 - 682

DAVID, CHIRIQUÍ

2014

**“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”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDA PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

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

APROBADO:

PROF. REINALDO DE ARMAS Ph D.

DIRECTOR

PROF. PEDRO GUERRA M. M. Sc.

ASESOR

PROF. NEFTALÍ APARICIO. M. Sc.

ASESOR

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

AGRADECIMIENTO

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo dondequiera que vayas” (Josué 1:9).

Le agradezco a Dios infinitamente por permitirme culminar con éxito una de mis metas impuestas en la vida.

A mi madre Emilce E. Cedeño, a mis abuelos Saúl Cedeño y Nivia Muñoz y a la pastora Adelaida Espinosa por ser mi mayor motivo de inspiración y ser quienes más me apoyaron en el desarrollo de mi carrera universitaria.

A todos los profesores que de una u otra forma participaron en mí formación profesional en especial a mi Director de tesis, Dr. Reynaldo De Armas por todo su apoyo, ayuda y colaboración; a mis asesores Ing. Pedro Guerra M. y al Ing. Neftalí Aparicio. También los Ing. Alex Solís, Reggie Guerra; encargados del laboratorio de Fecundación *In Vitro* del CIBA.

Al personal del matadero de Boquerón Concesionarios Jorge Blanco S.A. en especial al señor Luis Meléndez por facilitarme los ovarios para realizar la parte

experimental de este trabajo. A todas las amistades conocidas a lo largo de mi carrera profesional especialmente a Dr. Efraín Quintero Ch., Dr. Domingo Miranda por brindarme siempre su ayuda y apoyo.

Joseph Kaled Grajales Cedeño

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación se lo dedico con mucho cariño a mi madre **Emilce Cedeño**, a mi hermano **Yair Nuñez**, a mis amigos, **Ana Julia, Darielys, Edgar, Franklin, Mario, Hector, Ernesto, Ronald, Yulisa, Blanca, Yulisbeth** y a todos los demás que me ayudaron y colaboraron a lograr obtener esta meta, el título de Ingeniero Agrónomo Zootecnista.

Joseph Kaled Grajales Cedeño

“EFECTO DEL DIAMETRO 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”

Grajales C., Joseph. 2014. 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. Tesis Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Chiriquí, Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

RESUMEN

El presente estudio fue desarrollado con el objetivo de evaluar el efecto del diámetro de la aguja, la presión de aspiración, el tamaño de los folículos aspirados y la interacción de estos factores, sobre la tasa de recuperación y calidad ovocitos obtenidos por aspiración folicular en bovinos. Se utilizaron ovarios de matadero, los cuales fueron llevados hasta el laboratorio en donde se procedió a aspirar los folículos, empleando un equipo para aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía. Los datos se evaluaron empleando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2x3, con desigual número de submuestras y análisis categórico. Empleando dos diámetros de aguja (18 y 20G), dos frecuencias de aspiración (50 y 80 mmHg) y tres tamaños de folículos (≤ 5 mm, 6-10mm y >10 mm \emptyset), fueron conformadas 12 combinaciones, una para cada tratamiento, como se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1: Arreglo factorial de los tratamientos

FACTORES TÉCNICOS		TAMAÑO DE LOS FOLÍCULOS		
AGUJA	PRESIÓN	2-5 mm	6-10 mm	11-15 mm
18G x 2cm	50 mmHg	T1	T2	T3
	80 mmHg	T4	T5	T6
20G x 2cm	50 mmHg	T7	T8	T9
	80 mmHg	T10	T11	T12

Los ovocitos obtenidos fueron evaluados y se clasificaron morfológicamente de acuerdo a de Loos *et al.* (1989), en la escala de 1 a 4, (1, 2, 3 aptos y 4 no aptos para FIV). Las agujas 18G permitieron las mejores tasas de recuperación cuando se aspiran folículos de pequeño y mediano tamaño, mientras las de 20G cuando se aspiran folículos grandes, al mismo tiempo que parecen tener poca influencia sobre la calidad de los ovocitos recuperados. Las tasas de recuperación de ovocitos son mejores cuando la presión de aspiración empleada es alta. La presión de aspiración parece no tener mayor influencia sobre la

calidad sin embargo, pareciera ser que puede afectar positivamente en la recuperación de ovocitos grado 2, cuando se emplea una baja presión. Las tasas de recuperación son mejores cuando se aspiraron folículos de pequeño y mediano tamaño a la vez que aportan un mayor porcentaje de ovocitos aptos para FIV. Los folículos grandes presentan la menor proporción de ovocitos desnudos y la mayor proporción de ovocitos degenerados. Se concluye que es posible realizar distintas combinaciones de diámetro de aguja y presión de aspiración en función del tamaño de los folículos, a fin de lograr una interacción que permita la obtención de mejores resultados, tanto en la tasa de recuperación como en la calidad de los ovocitos colectados.

PALABRAS CLAVES: Aspiración folicular, ovocitos, folículos, diámetro de aguja, presión de aspiración, tasa de recuperación.

EFFECT OF THE NEEDLE DIAMETER, ASPIRATION PRESSURE AND FOLLICLE SIZE ON THE RECUPERATION RATE AND OOCYTE QUALITY OBTAINED BY FOLLICULAR ASPIRATION.

Grajales C., Joseph. 2014. Effect of the needle diameter, aspiration pressure and follicle size on the recuperation rate and oocyte quality obtained by follicular aspiration.. Thesis for Agronomist Zootechnician. Chiriquí, Panamá. Agronomous. Science Faculty.

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the effect of needle diameter, suction pressure, size of follicles aspirated and interaction of these factors on the recovery rate and quality of oocytes obtained by follicular aspiration. Slaughterhouse ovaries, were brought to the laboratory where they were aspirated follicles using a device for transvaginal follicular aspiration guided by ultrasound. Data were evaluated using a completely randomized design 2x2x3 factorial with unequal number of sub - samples and categorical analysis. Using two needle diameters (18, 20G) , two frequencies of suction (50 and 80 mmHg) and three sizes of follicles (≤ 5 mm , 6 -10mm and > 10 mm diameter) were formed 12 combinations, one for each treatment , as shown in the following table 1.

Table 1. Factorial arrangement of treatments

TECHNICAL FACTORS		SIZE OF FOLLICLES		
NEEDLE	PRESSURE	2-5 mm	6-10 mm	11-15 mm
18G x 2cm	50 mmHg	T1	T2	T3
	80 mmHg	T4	T5	T6
20G x 2cm	50 mmHg	T7	T8	T9
	80 mmHg	T10	T11	T12

The oocytes obtained were evaluated and classified morphologically according to Loos et al. (1989), in ranges from 1 to 4, (1, 2, 3 suitable and 4 unsuitable for IVF) . The 18G needle, allowed the best recovery rates when follicles of small and medium sizes were aspirated, and 20G when large follicles were aspirated, while they seem to have little influence on the quality of them. The oocyte recovery rates were better when the suction pressure used was high. The suction pressure seems to have greater influence on the quality however, it seems that it can be positively affect oocyte retrieval in grade 2, when a low pressure was employed. Recovery rates were better when small to medium size follicles were aspirated, while these of follicles contribute a greater percentage of oocytes suitable for IVF. The large follicles had the lowest proportion of naked oocytes and the highest proportion of degenerated oocytes. It concludes that it is possible to make different combinations of needle diameter and suction pressure

depending on the size of the follicles, in order to achieve an interaction that allows to obtain better results in the recovery rate and quality of oocytes collected.

KEYWORDS: follicular aspiration, oocytes, follicles, needle diameter, suction pressure, recovery rate.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE ANEXOS.....	ix
1.0. INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	¡Error! Marcador no definido.
1.2 ANTECEDENTES	¡Error! Marcador no definido.
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.1 General.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.2 Específicos	¡Error! Marcador no definido.
1.5 HIPOTESIS	¡Error! Marcador no definido.
2.0. REVISIÓN DE LITERATURA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1. Histología del ovario	¡Error! Marcador no definido.
2.2. Folículos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1. Foliculogénesis	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2. Folículos Primordiales y Primarios	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3. Folículos Secundarios	¡Error! Marcador no definido.

2.2.4. Folículos Terciarios	¡Error! Marcador no definido.
2.2.5. Folículo de Graaf	¡Error! Marcador no definido.
2.2.6. Crecimiento folicular	¡Error! Marcador no definido.
2.5. Dinámica folicular durante el ciclo estral en el bovino	¡Error! Marcador no definido.
2.6. Ultrasonografía y su empleo en reproducción bovina..	¡Error! Marcador no definido.
2.6.1. Principios.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6.2. Aplicación	¡Error! Marcador no definido.
2.7. Ultrasonografía de los folículos ováricos. .	¡Error! Marcador no definido.
2.8. Estudio de la Dinámica Folicular	¡Error! Marcador no definido.
2.10. ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFÍA EN EL BOVINO (OVUM PICK-UP, OPU)....	¡Error! Marcador no definido.
2.10.1. Metodologías empleadas en punción folicular (OPU)	¡Error! Marcador no definido.
2.10.2. Descripción de la Técnica	¡Error! Marcador no definido.
2.11. Selección de Ovocitos	¡Error! Marcador no definido.
2.11.1. Clasificación de Ovocitos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.11.2. Morfología del complejo ovocito/cúmulus (COCs)	¡Error! Marcador no definido.
2.11.3. Efectos positivos del cúmulus sobre la fecundación (Tanghe y col., 2002).....	¡Error! Marcador no definido.
2.12. Factores que Inciden en los Resultados de la Técnica.....	¡Error! Marcador no definido.
2.13. Factores Técnicos que Influyen en los Resultados	¡Error! Marcador no definido.

2.13.1. Tipo y Calidad de las Agujas Utilizadas	¡Error! Marcador no definido.
2.13.2. Presión de Aspiración	¡Error! Marcador no definido.
2.14. Factores Biológicos que Influyen en los Resultados .	¡Error! Marcador no definido.
2.14.1. Frecuencia de la Punción Folicular y el Momento Relativo al Ciclo de la Donante.....	¡Error! Marcador no definido.
2.14.2. Condición Fisiológica y Corporal de las Donantes.....	¡Error! Marcador no definido.
2.14.3. Raza, Edad, Fertilidad y Categoría de la Donante .	¡Error! Marcador no definido.
2. 14.4. Estimulación Hormonal previa a OPU	¡Error! Marcador no definido.
2.15. Salud de las Donantes de Ovocitos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.16. Eficiencia del OPU.....	¡Error! Marcador no definido.
2.17. Perspectivas de la punción folicular	¡Error! Marcador no definido.
2.18. Ventajas de la Aspiración Folicular	¡Error! Marcador no definido.
2.19. Desventajas de la Aspiración Folicular ...	¡Error! Marcador no definido.
3. MATERIALES Y METODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	¡Error! Marcador no definido.
3.2. PARÁMETROS A EVALUAR	¡Error! Marcador no definido.
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
5. CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
6. RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE CUADROS

CUADRO I. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COCS INMADUROS .. ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO II. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CUMULUS
..... ¡Error! Marcador no definido.

OVOCITOS (COCS) ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO III. ARREGLO DE TRATAMIENTOS..... ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO IV. TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR TRATAMIENTO. ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO V. PORCENTAJES DE CALIDAD DE LOS OVOCITOS (COCS) ASPIRADOS POR TRATAMIENTO..... ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO VI. DATOS PORCENTUALES PARA LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS (COCS) ASPIRADOS POR TRATAMIENTO LOGARÍTMICAMENTE TRANSFORMADOS..... ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO VII. PROMEDIOS DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS COLECTADOS POR TRATAMIENTO..... ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO VIII. PORCENTAJE DE GRADOS DE CALIDAD DE COCs POR TRATAMIENTO ¡Error! Marcador no definido.

CUADRO IX. DATOS LOGARÍTMICAMENTE TRANSFORMADOS PARA LOS GRADOS DE CALIDAD DE COCs POR TRATAMIENTO ¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DIAGRAMA DE LAS ETAPAS DEL DESARROLLO OVÁRICO DE LOS FOLÍCULOS, DE LA OVULACIÓN Y DE LA FUNCIÓN LUTEÍNICA¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 2. FOLÍCULO PRIMORDIAL. ESTE SE ENCUENTRA RODEADO POR UNA CAPA PLANA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA. ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 3. ESQUEMA DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO; A: FOLÍCULO PRIMARIO, B: FOLÍCULO SECUNDARIO, C: FOLÍCULO DE GRAAF, D: OVULACIÓN, E: CUERPO LÚTEO..... ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 4. CRECIMIENTO FOLICULAR DE LA HEMBRA BOVINA..... ¡Error!
Marcador no definido.

FIGURA 5: DESARROLLO DE LA MEIOSIS, DESDE LA OVOGÉNESIS QUE SE DESARROLLA EN EL OVARIO FETAL, HASTA LA FECUNDACIÓN ¡Error!
Marcador no definido.

FIGURA 7. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS. ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 8. INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES..... ¡Error!
Marcador no definido.

FIGURA 9. OBTENCIÓN DE OVARIOS DE MATADERO. ... ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 10. EQUIPO Y MATERIALES PARA REALIZAR LA ASPIRACIÓN FOLICULAR..... ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 11. OBTENCIÓN DE OVOCITOS A PARTIR DE OVARIOS DE MATADERO..... ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 12. CLASIFICACIÓN Y LAVADO DE COCs..... ¡Error! Marcador no definido.

FIGURA 13. PORCENTAJE DE CALIDAD DE OVOCITOS POR TRATAMIENTO ¡Error! Marcador no definido.

1.0. INTRODUCCIÓN

En la actualidad son utilizadas múltiples biotecnologías de la reproducción que permiten multiplicar la genética de los animales superiores y acortar el intervalo generacional, entre las cuales tenemos la producción de embriones mediante fecundación *in vitro* (FIV) a partir de ovocitos obtenidos por medio de la técnica de aspiración folicular, por su siglas en inglés (Ovum Pick-Up, OPU).

La OPU fue aplicada por primera vez en bovinos en 1988 al adaptar para tal fin los procedimientos de búsqueda ultrasonográfica transvaginal utilizados en humanos y aparece como una solución luego de intensas pruebas de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como la laparotomía y la laparoscopia (Nava *et al.* 2009).

Antiguamente la recolección de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones provenía sólo de hembras sacrificadas u ovariectomizadas, presentando grandes limitaciones puesto que no permite ser reproducido, disminuyendo la producción de embriones y por tanto está limitada la posibilidad de descendencia de las hembras sacrificadas (Denis. 2008). Ante esta situación la obtención de ovocitos de una hembra viva mediante la aspiración folicular transvaginal, guiada por ecografía 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). Asegurando Dayan (2010), que el OPU no presenta efectos colaterales significativos a los

animales, aun después de cinco años de punciones y permite recolectar ovocitos a hembras con problemas reproductivos, prepúberes, gestantes y que no responden a los métodos de superovulación.

Por otro lado, se estima que solo entre un 50 y 70% de los ovocitos obtenidos son aptos para la fertilización in vitro, alrededor del 90% de estos son fertilizados y entre el 20 y 40% alcanzan el estadio de blastocito (Nava *et al.* 2009). Por lo que la necesidad de obtener el mayor número posible de ovocitos aptos para la fertilización representa una ventaja para la técnica, pues permite obtener mejores resultados.

La calidad de los ovocitos recolectados, la cual se traduce fundamentalmente en la mayor presencia de células del cúmulo que rodean al mismo, se ve influenciada según Palma (2001), por diferentes aspectos, entre los cuales se mencionan los biológicos y los técnicos. Dentro de los biológicos podemos mencionar la Raza, edad, fertilidad, categoría de la donante, estado fisiológico y condición corporal de la donante (Denis. 2008), y los aspectos técnicos, como el procedimiento de aspiración, tipo y diámetro de la aguja, presión de aspiración y la posible influencia del bisel menciona Palma (2001).

El diámetro de la aguja y la presión de aspiración empleados han sido estudiados y correlacionados entre sí, no obstante los estudios realizados por los investigadores no muestran ninguna correlación con el tamaño del folículo aspirado, lo cual a nuestro criterio puede tener un efecto significativo en los resultados, pues estudios han demostrado que el diámetro del folículo también

es un factor determinante de la calidad del ovocito y posiblemente sobre el porcentaje de recuperación de los mismos como menciona Seneda *et al.* (2005).

Resulta entonces de nuestro interés estudiar algunos de los aspectos técnicos más relevantes que afectan la cantidad y calidad de los ovocitos colectados por la técnica de OPU como los son el diámetro de la aguja y la presión de aspiración empleados y correlacionarlo con el tamaño de folículo aspirado.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando hacemos aspiración folicular, es de suma importancia obtener la mayor cantidad posible de ovocitos rodeados con el mayor número posible de células del cúmulo intacta, y que una vez estos sean empleados en fecundación *in vitro* logren una maduración y desarrollo embrionario exitoso, lo que se traduce en un mayor número de embriones transferibles.

Sin embargo, la cantidad y calidad de los ovocitos se ve afectada por factores técnicos como el diámetro de la aguja y la presión de aspiración, y biológicos dentro de los cuales el diámetro de los folículos empleados es determinante, lo que puede reducir en un momento determinado, la disponibilidad de ovocitos viables para la fertilización, afectando la eficiencia de la técnica de OPU-FIV. Por tal motivo consideramos realizar un estudio empleando distintos tamaños de folículos, presiones de aspiración y diámetros de agujas, que nos permita conocer los parámetros de mayor efectividad para número de ovocitos

colectados y calidad de los mismos, que ostentan estos factores de variación y permitirán maximizar los resultados de la técnica de OPU-FIV.

1.2 ANTECEDENTES

La necesidad de hacer cada día más eficiente la técnica de aspiración folicular ha llevado a que los científicos dirijan sus investigaciones a lograr coleccionar ovocitos de calidad.

Tal es el caso de Salamone et al. (1997), en donde encontró que la tasa de recolección, utilizando agujas 17G y diferentes presiones 50, 100, 150 y 300 mm Hg (equivalentes a un flujo de 10, 22, 34 y 66 ml/min), no aumenta por incrementar la presión por encima de 22 ml/min; sin embargo, sí se aprecian cambios morfológicos significativos en los ovocitos coleccionados.

Además Nial *et al.* (1997), en una investigación donde utilizaron agujas 17G y 20G y diferentes niveles de presiones (25, 50, 70 y 100 mmHg) determinaron que la mayor cantidad de ovocitos viables se obtienen a una presión de 50 mm Hg para las agujas 17 G y 70 mm Hg para las agujas 20 G.

Por otro lado Palma (2001), encontró en sus investigaciones que empleando una baja presión de aspiración, la mayoría de los ovocitos recuperados están rodeados de un cúmulo compacto. Para todos los diámetros de agujas y que este porcentaje decrece progresivamente a medida que aumenta la presión.

También asegura Palma (2001), que en experimentos realizados con distintos diámetros de agujas se ha demostrado que con el empleo de agujas más finas (con un diámetro interno de 0,6 mm) se recolectaba más fácilmente el fluido folicular, mientras que con las agujas más gruesas (con un diámetro interno de 1,2 mm) permitía la obtención de una mejor cantidad de ovocitos.

Sin embargo en un estudio realizado por Solís *et al.* (2012), donde evaluaron dos métodos de sincronización de la emergencia de la onda folicular (punción folicular y hormonal) y dos frecuencias de recolección ovocitos (una y dos veces por semana). Donde no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) en el número de ovocitos obtenidos y calidad de ovocitos recuperados cuando la sincronización de la onda fue realizada por punción folicular o por un método hormonal. Pero se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$), cuando la calidad y cantidad de ovocitos fue analizada en función de las frecuencia de recolección.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En un sistema de producción continua de embriones a partir de animales de alta genética, los que luego son transferidos en vacas receptoras para llevar a término una preñez exitosa y el consiguiente nacimiento de un animal de alto valor genético, cualquier merma en la obtención de los ovocitos, vendría a reducir dicho número de nacimientos que es lo finalmente buscamos, lo que se traduce también en una pérdida de tiempo y dinero.

Dado que el diámetro de aguja, la presión de aspiración y el tamaño de los folículos aspirados son factores que en conjunto, influyen en la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por la técnica de OPU, se justifica la necesidad de evaluar de forma conjunta, el empleo de agujas con diferentes diámetros, diferentes presiones de aspiración y la aspiración de folículos con diferentes tamaños, para determinar en qué forma se ve afectada la tasa de recuperación, la cantidad y la calidad de los ovocitos colectados.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 General

Evaluar los factores técnicos, biológicos, y la interacción de estos factores, sobre la tasa de recuperación, cantidad y calidad ovocitos obtenidos por aspiración folicular a partir de ovarios de vacas sacrificadas.

1.4.2 Específicos

Relacionar el diámetro de la aguja con la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos obtenidos

Asociar la presión de aspiración con la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos obtenidos.

Evaluar la influencia del tamaño del folículo sobre la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos obtenidos.

1.5 HIPOTESIS

Ha: El diámetro de aguja empleado en la aspiración afecta el número y calidad de ovocitos colectados.

Ho: EL diámetro de aguja empleado en la aspiración no afecta el número y calidad de ovocitos colectados.

Ha: La presión de aspiración afecta la cantidad y calidad de ovocitos colectados.

Ho: La presión de aspiración no afecta la cantidad y calidad de ovocitos colectados.

Ha: El tamaño del folículo afecta la recuperación de ovocitos de buena calidad.

Ho: El tamaño del folículo no afecta la recuperación de ovocitos de buena calidad.

2.0. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Histología 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 abdominal dependiendo de la edad, el número de partos y la especie (Regueiro, 2010); los cuales tienen dos funciones: (exógenas), la producción de Óvulos y (endógenas), la producción de hormonas; principalmente Estrógenos y Progesterona durante los distintos estadios del ciclo estral (Diana, 2009) y su tamaño varía dependiendo del estadio del ciclo estral y la edad del animal, pero generalmente es de 2.5 a 3.5 cm de largo (de Armas, 2007).

El ovario se encuentra dividido funcionalmente en dos compartimentos: el intersticial, conformado por células del estroma y de la teca externa, y el folicular, que contiene el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca interna, que interactúan entre sí durante las diversas etapas de la maduración folicular (Velázquez *et al.* 2004).

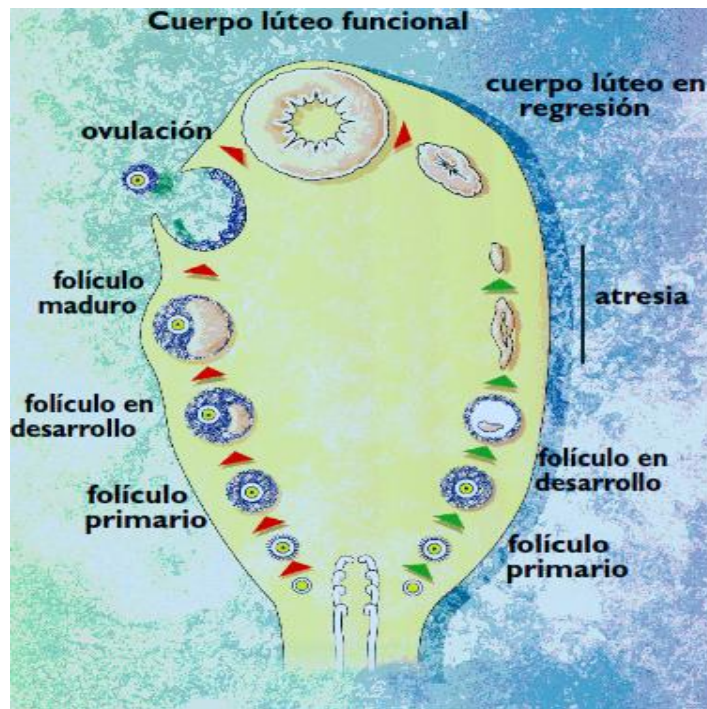
En la superficie del Ovario se pueden encontrar dos estructuras diferentes: Folículos y Cuerpo Lúteo (Diana, 2009).

El cuerpo lúteo es una glándula temporal que se desarrolla a partir del folículo ovulatorio, proceso conocido como luteinización. Este proceso consiste en todos los cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos que ocurren en el folículo preovulatorio hasta que este se transforma en un cuerpo lúteo funcional (Hernández *et al* 1998).

El cuerpo lúteo está constituido por las células de la teca interna (pequeñas y activas en la primera etapa de su desarrollo) y células de la granulosa (grandes y activas en la segunda mitad de su desarrollo) (Campos *et al.* 2003).

Los folículos ováricos contienen las células sexuales femeninas inmaduras u ovocitos en distintos estudios de maduración. Cuando el folículo ha madurado, recibe el nombre de folículo de Graf. Una vez que el ovocito es expulsado del ovario recibe el nombre de óvulo (Ecured. 2008).

FIGURA 1. DIAGRAMA DE LAS ETAPAS DEL DESARROLLO OVÁRICO DE LOS FOLÍCULOS, DE LA OVULACIÓN Y DE LA FUNCIÓN LUTEÍNICA



Fuente: AR. PETERS y PJH. BALL – 1987

2.2. Folículos

En el momento del nacimiento en la corteza del ovario hay miles de folículos como lo señala Caravaca et al. (2005), que en los bovinos andan alrededor de unos 200,000 en estado de reposo, es decir folículos jóvenes que todavía no se han desarrollado (Duran, 2007).

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios (Gigli et al. 2006).

Aseguran Buxadê et al. (1995), que cada folículo ovárico, constituye en sí mismo, una unidad funcional, teniendo asociada una célula germinal femenina.

El ovario realiza la producción de ovocitos mediante dos procesos estrechamente ligados entre sí denominados foliculogénesis y oogénesis (Caravaca et al. 2005).

2.2.1. Foliculogénesis

La foliculogénesis es el evento caracterizado por la formación, crecimiento y por la maduración folicular, está controlada por factores endócrinos, parácrinos y autócrinos (Magalhães, 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:

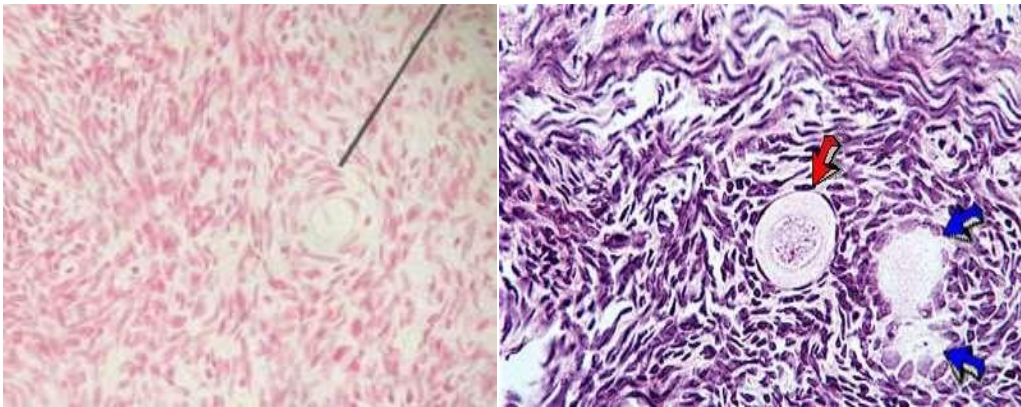
2.2.2. Folículos Primordiales y Primarios

Los mismos son formados durante la vida fetal de la hembra, están constituidos por una célula germinal rodeada de una capa simple de células (Buxadê 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, que por aumento de su masa citoplasmática se convierten en ovocitos 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 granulosas, rodeando a los ovocitos I 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 (Webb et al. 1999, citados por Henao y Trujillo, 2000).

FIGURA 2. FOLÍCULO PRIMORDIAL. ESTE SE ENCUENTRA RODEADO POR UNA CAPA PLANA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA.



Fuente: (Telmeds, 2014)

Las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito I.

Cuando esto sucede los folículos se clasifican en folículos primarios (Gigli et al. 2006; Findlay, 1993 citado por Henao y Trujillo, 2000 y Seneda et al. 2008).

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).

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 pregranulosas 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 (Fortune, 2003; Webb et al. 1999, citados por Henao y Trujillo, 2000)

En el momento de la transformación de folículos primordiales en primarios, la expresión de tres genes (Nobox, Sohlh 1 y Lhx8) específicos de los ovocitos de mamíferos, son esenciales para la transformación del folículo primordial en primario (Suzumori et al. 2002; Pangas et al. 2006), así como diferentes factores secretados por el ovocito y las células foliculares (Picton et al. 2008; Rodríguez et al. 2008).

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).

2.2.3. Folículos Secundarios

Fundamentalmente formados por una célula germinal rodeada por dos o más capas de células foliculares (Buxadê et al.1995). Es decir, las células de la granulosa aumentan de tamaño y número y se denomina folículo secundario al ovocito I 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 preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral (Gigli et al. 2006).

Entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa adyacentes, se originan espacios en los que se deposita un tipo de material fibrilar que representa el inicio de la formación de la zona pelúcida (Totzauer et al. 1998; Sinowatz et al. 2001). También se presenta un aumento del tamaño del ovocito, sin división celular del mismo y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa dando lugar al folículo secundario. En los folículos secundarios de las especies porcina, murina, 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 desarrollo de la zona pelúcida, y por lo menos dos capas de células granulosas. Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotrofinas puede ser detectado y las importantes acciones de FSH y LH se inician (Seneda et al. 2008).

2.2.4. 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).

Este líquido aseguran Buxadê et al. (1995) es rico en estrógenos, producido por las células de la granulosa. El folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de las células de la granulosa (CG) y establecer, en éstas, una producción creciente de estrógenos (Hillier, 2001, citado por Velázquez y Mendieta, 2005). La FSH ha sido considerada como un factor esencial, debido a sus funciones endocrinas

y paracrinas. Por ejemplo, la FSH hace una asociación con la modulación de la familia FGF, como el FGF-8 (Buratini et al. 2005).

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).

Las células del cúmulus desarrollan procesos citoplasmáticos atravesando la zona pelúcida y forman zonas de contacto con la membrana plasmática del ovocito mediante uniones tipo gap (Eppig y O'Brien, 1996; Tanghe, et al. 2002; Van Soom et al. 2002). Estas uniones facilitan el abastecimiento de nutrientes y el aporte de pequeñas moléculas reguladoras para el ovocito procedentes de las células de la granulosa en un proceso de cooperación metabólica (Canipari, 1994).

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 cúmulus 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 cúmulo 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).

2.2.5. Folículo de Graaf

Según 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 De Graaf, en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos en 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 un diámetro de hasta 16 mm en la especie bovina (Solís, 2006).

Los folículos de Graaff están formados por dos capas de células foliculares o tecas (teca interna y teca externa), separadas por una membrana basal de la cubierta celular interior de granulosa que rodea el antro celular y el oocito. El riego sanguíneo lo reciben por una abundante red capilar (Buxadê et al.1995).

El pico de LH es inducido por la elevada concentración circulante de estrógenos producidos por el folículo preovulatorio (Velázquez y Mendieta, 2005). Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular modifican el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y de la teca, y preparan al ovocito para la maduración nuclear y citoplasmática McGee y Hsueh (2000). Es decir, los folículos preovulatorios tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación (Gigli et al. 2006).

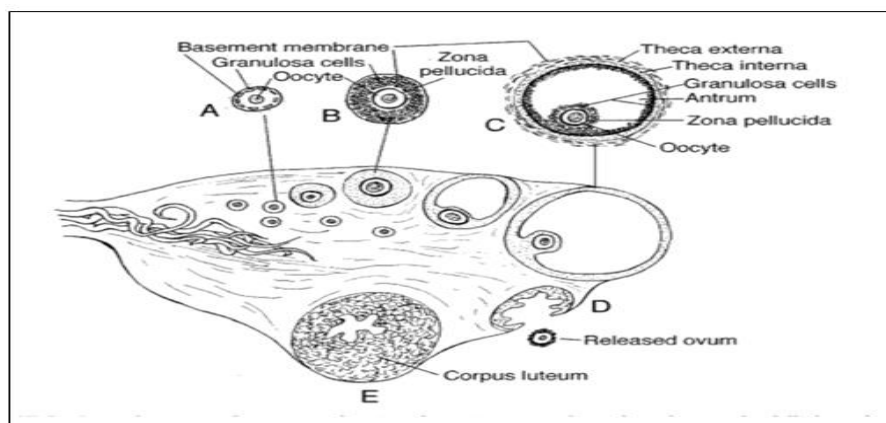
Velázquez y Mendieta (2005), mencionan que el pico de LH, además de inducir la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito y cambios que provocan la ruptura de la pared folicular, que a su vez permite la ovulación, también incluye alteraciones funcionales en el complejo ovocito-células del

cúmulo y modificaciones en la expresión génica de las células de la granulosa que las llevarán hacia la luteinización.

El ovocito maduro secreta un factor que permite la expansión de las células del cúmulo (CEE) que permite secretar ácido hialurónico en respuesta a la estimulación por FSH. Al hidratarse genera espacios entre las células que provocan la expansión del cúmulo que precede al proceso de ovulación propiamente dicho (Velázquez y Mendieta, 2005).

Los productos proinflamatorios sintetizados por las células de la granulosa y detectados en elevadas concentraciones en los folículos preovulatorios (p. ej., interleucinas (IL) -1β y -6 , factor de necrosis tumoral (TNF) $-\alpha$ y prostaglandinas) contribuyen a la disminución de su producción de estrógenos hacia el final de la transición a folículo de Graaf. 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 y et al. 2001, citados por Velázquez y Mendieta, 2005).

FIGURA 3. ESQUEMA DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO; A: FOLÍCULO PRIMARIO, B: FOLÍCULO SECUNDARIO, C: FOLÍCULO DE GRAAF, D: OVULACIÓN, E: CUERPO LÚTEO.

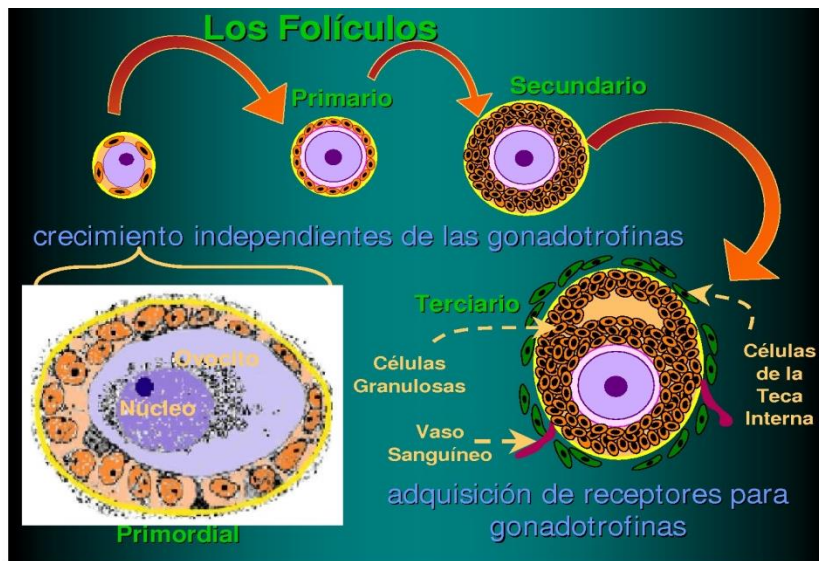


Fuente: Frandson et al. (2009) .

2.2.6. Crecimiento folicular

En todas las hembras mamíferas, la reserva de 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; Bols, 2005; Martinez; Souza, 2007).

FIGURA 4. CRECIMIENTO FOLICULAR DE LA HEMBRA BOVINA



2.3. 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). Una vez establecidas las células primordiales germinales en el ovario, se diferencian en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas. Este proceso migratorio se encuentra dirigido por factores quimiotáxicos, como el factor transformante del crecimiento β . Otras señales, como el c-Kit y el EGF, desempeñan un papel importante en la supervivencia y división de las células germinales durante este proceso migratorio (Dolci et al. 1991; Masui, 1991), así como en su posterior desarrollo y crecimiento (Manova et al. 1993).

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, sobreviviendo, en el momento del nacimiento, únicamente el 20 por ciento de las células originales (Baker, 1963; Byskov, 1986).

Las ovogonias situadas en la periferia del ovario son más grandes que las células primordiales germinales, presentan un núcleo vesicular central con 1-3

nucleolos reticulados y un citoplasma escaso de aspecto claro y pocas organelas (Bielanska-Osuchowska, 2006; Sathananthan et al. 2006). Durante el desarrollo fetal, las ovogonias sufren un proceso de diferenciación y sucesiva división mitótica hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis (Bukovsky et al. 2004), las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios cuando comienzan la meiosis. En el bovino se observan figuras meióticas a partir del día 82 de gestación.

Las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios mediante la primera división meiótica en la que tiene lugar la reducción del número de cromosomas a estado haploide. Este proceso tiene lugar en el folículo primordial en el que se lleva a cabo el primer paso de la meiosis I que incluye la replicación del ADN y el arresto en el estadio de diploteno de la profase I (estado de dictiatio) en lo que se conoce como primera detención de la meiosis (Jamnongjit y Hammes, 2005).

La detención meiótica del ovocito primario está regulada por señales inhibitorias. Una de las moléculas intercelulares más importantes, responsables de mantener el arresto meiótico es el AMPcíclico que dentro del ovocito parece actuar como un inhibidor de la maduración, aparentemente a través de la acción de proteína kinasa (Conti et al. 2002). Al respecto Byskov (1975), Rajah et al. (1972) y Wassarman et al. (1976), señalan que factores, como el factor citostático, y segundos mensajeros, como el AMPc, mantienen fosforilado el MPF, inhibiendo la meiosis hasta el momento de la pubertad.

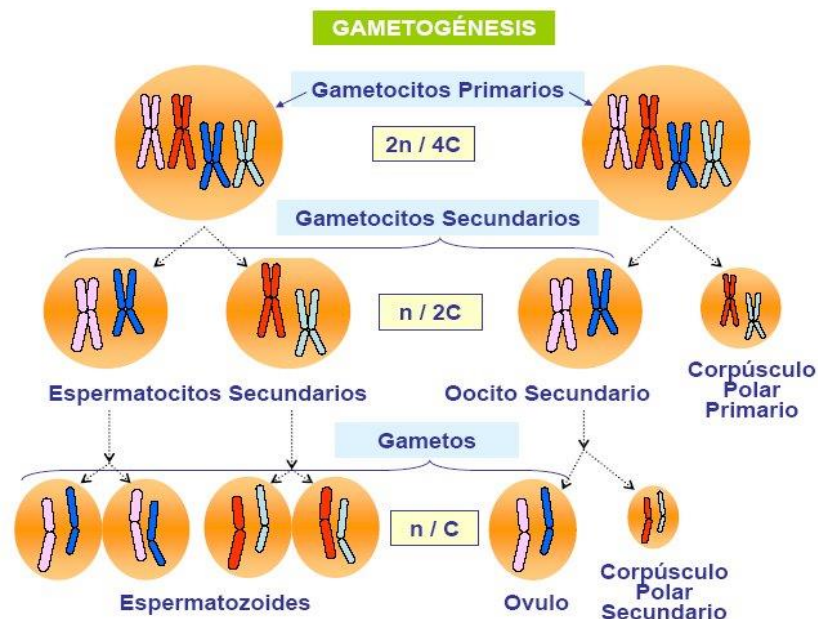
El ovocito primario se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente e irregular que recibe el nombre de vesícula germinal, así como por la agregación de organelas celulares compuestas predominantemente por mitocondrias aparato de golgi, lisosomas y microtúbulos. La meiosis iniciada por el ovocito primario y detenido en la profase I, no se reanuda hasta que el folículo se desarrolle totalmente y se produzca la ovulación durante la pubertad, por lo que dependiendo de la especie el ovocito puede permanecer en detención meiótica durante semanas o años (Canipari, 1994).

El retorno de la meiosis ocurre inmediatamente después de un estímulo hormonal in vivo o simplemente por la retirada del ovocito de dentro del folículo in vitro. En el animal la meiosis inicia nuevamente en los folículos preovulatorios bajo el estímulo de la LH (Gigli et al. 2006), durante el pico de LH en el momento de la ovulación (Sorensen et al.1985; Buccione et al. 1990).

En este momento, los ovocitos sufren progresión nuclear de estadio de diploteno de la profase I de la primera división meiótica a metafase II. La progresión del estadio de diploteno a metafase II es conocida como maduración meiótica. Esa maduración se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinativa, condensación de la cromatina, separación de los cromosomas homólogos y la expulsión del primer corpúsculo polar. Los cromosomas se organizan en el mismo plano formando la placa ecuatorial, estadio que corresponde a metafase II. En este periodo, ocurre la segunda intervención de la meiosis que solamente será retomada si el ovocito es fertilizado por el espermatozoide. La activación

del ovocito por el espermatozoide durante la fecundación estimula la finalización de la meiosis (segunda división reduccional) ocurriendo la separación de la cromatina y la expulsión del segundo corpúsculo polar, llegando a la fase final de la ovogénesis (Wassarman, 1994; Banks, 1991).

FIGURA 5: DESARROLLO DE LA MEIOSIS, DESDE LA OVOGÉNESIS QUE SE DESARROLLA EN EL OVARIO FETAL, HASTA LA FECUNDACIÓN



2.4. Cuerpo Lúteo

Una vez que el folículo de Graaf ha finalizado su maduración y que el ovocito se ha preparado durante el proceso de la ovogénesis ocurre la ovocitación (Caravaca et al. 2005). 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 óvulo, se produce una pequeña hemorragia con formación de un coagulo de sangre en la cavidad antral, ahora vacía. A esta estructura, se le denomina cuerpo hemorrágico (Buxadé, 1995). A continuación aseguran 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.

Las células de la granulosa que recubren la cavidad folicular vacía, comienzan a multiplicarse bajo la influencia de la LH y a formar el cuerpo lúteo. La mayoría de las células de cuerpo lúteo se derivan de células de la granulosa, pero algunas células en el cuerpo lúteo se derivan de la teca interna (Frandsen et al. 2009).

Por su parte Gordon (1996), señala se cree que las células lúteas se diferencian en células lúteas grandes y pequeñas. Las grandes células 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 derivadas 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).

Una cantidad detectable de progesterona se puede encontrar, menciona Gordon (1996), de tres a cuatro días después de la formación del cuerpo lúteo, el cual puede verse por ecografía después de tres a cuatro días (Descoteaux et al. 2010), o de dos a tres días asegura Tamayo (2000), posteriores a la ovulación y puede llegar a constituir muchas veces, más de 2/3 partes del tamaño total del ovario, cuando se encuentra en su máximo desarrollo que alcanza de los nueve a 12 días del ciclo (Holy, 1987). La producción diaria de progesterona aumenta

marcadamente durante varios días hasta que una meseta de secreción se alcanza alrededor de ocho días del ciclo (Gordon, 1996).

Si la fertilización del ovulo no se da y el embarazo no se ha establecido, el cuerpo lúteo entra en 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).

El intervalo de tiempo entre la progesterona alcanza su concentración mínima y el inicio del celo puede variar en función de varios factores, incluyendo la presencia de un folículo dominante, condición corporal, el estrés, la temporada y, probablemente, la lactancia y la nutrición (Gordon, 1996).

Asegura Gordon (1996), que la rápida regresión del cuerpo lúteo de la vaca es un evento clave en el ciclo estral bovino que implica asegura Frandsen et al. (2009), la muerte por apoptosis de las células lúteas y su eliminación. El útero es el órgano que determina la regresión del cuerpo lúteo a través de la secreción de la hormona luteolítica prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) (Gigli et al. 2006).

Ahora está bien establecido que la prostaglandina liberada en el endometrio durante la fase lútea tardía, es responsable de la luteólisis y la consecuente caída dramática en las concentraciones de progesterona que prepara el

escenario para una nueva ovulación. La prostaglandina liberada durante el ciclo estral bovino es estimulada por la oxitocina lútea después de unirse a un receptor específico en la célula endometrial (Gordon, 1996).

La $PGF2\alpha$, actuaría sobre el cuerpo lúteo por dos mecanismos. Por un lado, estimula a las células luteales grandes a secretar oxitocina, produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva al estimular la liberación de más $PGF2\alpha$ por parte del endometrio. El segundo mecanismo consiste en regular directamente su propia síntesis estimulando a las células tecales a producir $PGF2\alpha$ (Silvia, 1999). Este último mecanismo se encuentra activo en el CL del bovino a partir del día cinco. Esto explicaría por qué con una sola inyección de $PGF2\alpha$ antes del día cuatro no se produce luteólisis, pero dosis repetidas o una sola inyección a partir del día cinco sí induce la regresión del cuerpo lúteo (Tsai y Wiltbank, 1998).

Además de la $PGF2\alpha$, otras hormonas participan de la lisis del cuerpo lúteo. Los estrógenos tienen un efecto positivo sobre el útero en su habilidad de liberar $PGF2\alpha$. Pero es necesario que la progesterona haya actuado previamente sobre las células endometriales. Los estrógenos tienen un feedback positivo sobre ellos mismos al aumentar sus propios receptores en endometrio; además producen el aumento de los receptores para oxitocina. Se reconoce entonces que, el cuerpo lúteo posee receptores para oxitocina y para estradiol (Kimball y Hansel, 1974), sugiriendo que los estrógenos tendrían una acción directa sobre la lisis del cuerpo lúteo.

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 Frandson 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 albican (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 (Frandson et al. 2009).

La función básica de la progesterona durante este momento es preparar al organismo para un embarazo. La progesterona aumenta la secreción de las glándulas del útero e inhibe la motilidad uterina para promover la implantación y mantenimiento de la preñez. La progesterona también promueve el desarrollo de la glándula mamaria. Los altos niveles de progesterona actúan sobre el eje hipotálamo adenohipofisario para inhibir la secreción de LH (Frandson et al. 2009).

2.5. 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 período de 3-4 meses 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). A Rajakoski (1960) se le ha acreditado la proposición inicial de la teoría de las ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. Basado en la evaluación anatómica e histológica de ovarios obtenidos de vacas sacrificadas en días conocidos del ciclo estral, concluyó que ocurrían dos ondas de crecimiento de folículos antrales (5mm de diámetro). No obstante resultados de trabajos histológicos posteriores realizados por otros autores refutaron el fenómeno de las ondas y apoyaron la noción de que el crecimiento folicular era continuo e independiente de las fases del ciclo. Si bien algunos autores apoyaban la teoría de que los folículos se desarrollaban en periodos u ondas, la mayoría de los investigadores estaban de acuerdo con la noción de que el crecimiento folicular era continuo e independiente de las fases del ciclo. La confusión y controversia continuó hasta la segunda mitad de la década del 80, en que trabajos utilizando ultrasonografía de tiempo real documentaron convincentemente que el crecimiento folicular en el bovino ocurre simulando ondas (Sirois y Fortune, 1988; Ginther et al., 1989a y Savio et al., 1990). Desde ese momento se ha realizado un importante número de trabajos que demuestran que el patrón de ondas se repite en casi todos los estadios de la vida de la vaca, incluyendo la

preñez (Ginther et al., 1996) y el periodo postparto (Savio et al., 1990). En estudios de vaquillonas prepúberes (Evans et al., 1994), la composición de las ondas foliculares no ovulatorias fueron muy similares a la de animales maduros y se concluyó que el fenómeno de emergencia de ondas se establece temprano, en el periodo prepuberal (alrededor de las dos semanas de vida).

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 inicia justo antes del día de la ovulación y durante los próximos días, el folículo que se hace dominante, suprime el crecimiento de una nueva onda folicular. Mientras que el folículo dominante continúa aumentando de tamaño, el crecimiento de los restantes folículos del cohorte cesa o se hace lento y estos folículos subordinados finalmente sufren atresia (Fricke, 2001).

Autores como Goodman y Hodgen (1983), sugirieron 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 cohorte de folículos que comienzan a madurar bajo un aporte 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. 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 y 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 con promedio de 24 de entre dos, tres (Fernández, 2003), hasta cuatro milímetros (Lucy et al. 1992), 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 (Quintela et al. 2006) o hasta nueve milímetros (Lucy et al. 1992), que es cuando inicia 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 (Díaz, 1999), hasta que se hace atrésico o se vuelve pre-ovulatorio. El folículo preovulatorio o de Graaf puede medir alrededor de 15 a 17 milímetros (Bo y Caccia, 2000), 11 a 16 milímetros (DesCôteaux, 2010) de diámetro.

La primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (d 0). La segunda onda comenzará el día nueve o 10 para los ciclos de dos ondas y los días ocho o nueve en los ciclos de tres ondas. En los ciclos del 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 y esta puede comenzar

más temprano (d 6) o más tarde (d 12) (Bo y Mapletoft, 1999). En cuyos casos se han encontrado animales con cuatro ondas, la cuarta onda comienza el día 20 o 21 y este ciclo tendrá una duración mayor a 21 días (Bo et al. 2002).

Los primeros reportes utilizando 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). En general las vacas lecheras en lactancia, primíparas y multíparas tienden con mayor frecuencia a exhibir ciclos de dos ondas, mientras que las vaquillas lecheras nulíparas tienden con mayor frecuencia a exhibir ciclos de tres ondas. Sin embargo, 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).

La duración del ciclo estral va a estar 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 luteal; 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 ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Lucy et al. 1992). Así, el principal factor que condiciona la duración del ciclo y por lo tanto la existencia de dos, tres o cuatro ondas por ciclo, parece ser la vida del cuerpo lúteo (Fernández, 2003). Consecuentemente, la duración del ciclo de dos ondas es de 18 a 20 días, de 21 a 23 días en los ciclos de tres ondas (Bo, 2002) y 24 o 25 días en los ciclos de cuatro ondas (Zeitoun et al. 1996; Bo, 2002).

2.6. Ultrasonografía y su empleo en reproducción bovina

La ultrasonografía se basa en las diferencias de impedancia acústica entre los tejidos, obteniendo imágenes y colores diferentes según la ecogenicidad de los mismos. Emplea ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos, lo cual es posible visualizar a través de la pantalla del ecógrafo. La aplicación de la ultrasonografía en las especies bovina data aproximadamente de los años 80, sin embargo su desarrollo y perfeccionamiento para el estudio de los eventos reproductivos se ha acelerado en la presente década.

El uso de la técnica de ultrasonografía en reproducción bovina se incrementa cada día a través del especialista en biotecnología de la reproducción, ya que su utilización es demandada cada vez más por los ganaderos y los centros científicos, debido a su precisión, y a que su aplicación confirma o desestima la

valoración realizada por palpación transrectal, constituyendo un medio diagnóstico de certeza y confirmativo. Además, la ultrasonografía fue utilizada como técnica para estudiar la dinámica folicular en el ovario durante el ciclo estral, para evaluar el efectos hormonales sobre la población de folículos de los ovarios y más recientemente para realizar aspiración guiada de folículos (Ovum pick-up). En el macho ha sido empleada para el diagnóstico de patologías de testículo, epidídimo y glándulas anexas (de la Sota et al. 2003).

Otra gran ventaja que nos ofrece la ultrasonografía es la posibilidad de determinar el sexo los fetos a partir del día 57 basándose en la migración del tubérculo genital (próximo al ombligo en macho y detrás de la cola e hembra). A su vez también permite identificar aquellas vacas vacías con 58 patologías en el tracto reproductivo y monitorear la actividad ovárica con alta precisión (Kumar, 2009).

2.6.1. Principios

La ultrasonografía utiliza ondas de sonido de alta frecuencia medidas en Megahertz (1 MHz = 1, 000,000 de ondas de sonido por segundo) para producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos (Bo y Caccia, 2000).

Los sonidos son el resultado del recorrido de la energía mecánica a través de la materia en forma de una onda que produce alternativamente los fenómenos de compresión y rarefacción. Se definen por tres características: frecuencia de vibración, longitud de onda y velocidad de propagación:

- Frecuencia: es el número de ciclos completos por unidad de tiempo y se mide en Hertzios (Hz), de manera que un Hz = 1 ciclo por segundo.
- Longitud de onda: es la distancia entre el comienzo o pico de la compresión de un ciclo y el siguiente.
- Velocidad: es la rapidez con la cual las ondas de sonido viajan a través de un medio específico (velocidad = frecuencia x longitud de onda).

Los ultrasonidos se definen como sonidos con una frecuencia mayor de 20,000 ciclos por segundo (20,000 Hz), es decir, que se encuentran por encima de los límites audibles. Las frecuencias que usualmente se utilizan en animales están entre 1×10^6 y 10×10^6 (1 a 10 MHz) (Quintela et al. 2006).

Las máquinas de ultrasonido están compuestas de forma general por el transductor y la consola. El transductor está integrado por una gran cantidad de pequeños cristales que vibran al ser estimulados por la corriente eléctrica proveniente de la consola, resultando en la emisión de ondas de sonido que viajan a través de los tejidos en diferentes ángulos, de acuerdo a la orientación dada al transductor (Bo y Caccia, 2000). El transductor puede ser lineal dando una imagen rectangular en la pantalla (barrido de matriz lineal) o sectorial donde la imagen será en triángulo (registro sectorial) (Quintela et al. 2006). Luego, los tejidos tendrán la capacidad de reflejar o propagar las ondas de sonido y el eco resultante será recibido por los cristales que transformarán las vibraciones en

corriente eléctrica, que irá a la consola para ser luego transformada en imágenes (Bo y Caccia, 2000).

Esta imagen se observa en la pantalla de acuerdo a la densidad o dureza del tejido examinado, en una variedad de tonos que van desde el negro (color como se observan los líquidos) al blanco (los huesos y tejidos muy densos), incluyendo una amplísima gradación de tonos grises (cuerpo lúteo, estroma ovárico, etc.) (Perea, 2005).

Con el descubrimiento de ciertos materiales (cuarzo, turmalina, etc.) que al aplicarles energía mecánica producían cargas eléctricas se facilitó la emisión y recepción de ondas de ultrasonido. Este efecto se denominó piezoeléctrico y también funciona en sentido inverso, de forma que al aplicar un campo eléctrico a estos materiales se producían tracciones y compresiones (sonido). Con este descubrimiento de una forma simple y en un reducido espacio se podría construir emisores de ultrasonido (Quintela et al. 2006).

Ya que los ultrasonidos no se propagan en el vacío, precisan de un medio para propagarse. No todos los medios tienen la misma capacidad de propagarlos y para valorar esta capacidad surge el término de impedancia acústica. Esta es la capacidad de diferentes medios de resistir o impedir la transmisión del sonido. Varía ligeramente entre la mayoría de los tejidos, dependiendo de la densidad y elasticidad de los mismos, pero permite distinguir un tejido de otro siempre que se transmita parte del sonido, de modo que las estructuras llenas de aire y óseas son barreras para las ondas de ultrasonido (Quintela et al. 2006), en tanto que

las estructuras llenas de líquido o tejidos blandos, permiten la propagación de las ondas de ultrasonido.

Las ondas que atraviesan los tejidos son muy delgadas (2 mm), por lo tanto la imagen producida es equivalente a un corte histológico. Los límites entre dos tejidos adyacentes de distintas densidad se denominan interfaces. Diferencias muy pequeñas de densidad pueden resultar en una interface (Bo y Caccia, 2000). Las interfaces entre los tejidos blandos y el aire o entre los tejidos blandos y el hueso hacen que la impedancia acústica sea muy diferente (Quintela et al. 2006). Por lo tanto las interfaces nos permiten delimitar los órganos en estudio y las distintas densidades posibilitan hacer una evaluación de los cambios normales o anormales de dichos órganos (Bo y Caccia, 2000).

Para describir la textura de los tejidos en una imagen ecográfica existe una terminología específica. Ecogénico o ecoico significa que la mayor parte del sonido se refleja hacia el transductor y estas áreas aparecen de color blanco en la pantalla (huesos, aire). Anecogénico se emplea para describir el tejido que transmite todo el sonido hacia tejidos más profundos, no reflejando ningún sonido hacia el transductor. Estas áreas se ven de color negro en la pantalla y suelen corresponder con estructuras llenas de líquido. Los tejidos blandos no solo se representan en blanco y negro, sino que como se mencionó, también pueden aparecer distintas escalas de grises así hiperecoico define a los tejido que reflejan más sonido que el tejido circundante e hipoecoico describe la idea

contraria. Isoecoico se utiliza para definir los tejidos que muestran la misma ecogenicidad que los tejidos circundantes (Quintela et al. 2006).

A medida que los ultrasonidos avanzan por los tejidos van perdiendo intensidad (atenuación). El sonido que viaja a través de los tejidos está sujeto a la atenuación. Esto limita la profundidad de la imagen. Este grado de atenuación depende de la frecuencia del transductor, así el sonido emitido por un transductor de alta frecuencia se atenúa más rápidamente que uno de frecuencia más baja y por tanto, este último puede llegar a tejidos más profundos, sin embargo a mayor frecuencia menor penetración pero mejor imagen y viceversa (Quintela et al. 2006).

Las frecuencias más comúnmente usadas en la evaluación de los órganos reproductivos de grandes animales como la vaca son: 3.5, 5.0 y 7.5 MHz. Las estructuras relativamente pequeñas, como los folículos ováricos localizados más próximos del transductor se pueden estudiar con una frecuencia entre 5.0 y 7.5 MHz. Por el contrario, grandes estructuras localizadas cerca del transductor tales como fetos y úteros de mediana y avanzada gestación, se observan mejor con frecuencias de 3.5 MHz (Perea, 2005).

2.6.2. Aplicación

Actualmente la ultrasonografía es empleada eficazmente como una herramienta de diagnóstico en las diferentes especies de animales, siendo el diagnóstico

reproductivo uno de los principales campos. En la hembra bovina existen una gran cantidad de aplicaciones prácticas, de modo que se mencionan a continuación algunas de las más relevantes.

2.7. Ultrasonografía de los folículos ováricos.

En el examen ultrasonográfico de los ovarios, los folículos se muestran a través de imágenes no ecogénicas de color negro en forma redondeada o en estructuras irregulares debido a la compresión de los folículos adyacentes, al cuerpo lúteo y a la compresión de los folículos por el estroma ovárico. Las medidas obtenidas de los folículos corresponden a las dimensiones del antro folicular y no incluye el diámetro de la pared (Pieterse, 1991).

Los folículos preovulatorios se muestran como estructuras redondeadas anecogénicas de 1,5 a 2,5 cm o 15 - 17 mm (Calderón, 2010).

La determinación de la dinámica de las ondas foliculares mediante ecografía es uno de los resultados de mayor impacto en la biotecnología de la reproducción bovina. El inicio de una onda folicular se caracteriza por la formación de un gran número de folículos simultáneamente, selección del folículo dominante y atresia de los folículos más pequeños, recesivos o subordinados. En ausencia de luteólisis el folículo dominante detiene su crecimiento, comienza su regresión y da paso a una nueva onda folicular. El día cero del ciclo es el primer día que

desaparece el folículo pre ovulatorio y coincide con el surgimiento de la primera onda folicular.

2.8. Estudio de la Dinámica Folicular

Como se vio en más detalle en la parte B de la revisión de literatura, otra de las aplicaciones de la ultrasonografía es el estudio de la dinámica folicular. Gracias al empleo de la ecografía en vacuno se han conseguido establecer los patrones de crecimiento folicular en hembras prepúberes con 2 semanas de edad (Evans et al. 1994), en novillas (Savio et al. 1988; Ginther et al. 1989b; Sunderland et al. 1994; Solís, 2006); en vacas postparto (Savio et al. 1990), en gestantes (Pierson y Ginther, 1986; Ginther et al. 1989c; Thatcher et al. 1991; Ginther et al. 1996b), en vacas anovulatorias (McDougall et al. 1995), o en vacas que habían recibido tratamientos de sincronización de celos (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993).

El uso de la ultrasonografía ha permitido revelar que el crecimiento folicular ocurre en forma de ondas, de modo que fundamentado en este acontecimiento se ha podido mejorar la eficiencia en programas de reproducción asistida como la sincronización de la ovulación (Bo, 2002), la superovulación (Bo y Mapletoft, 1999; Solís, 2006), y la aspiración folicular transvaginal (Adams et al. 1993; Seneda et al. 2001).

2.9. Aspiración Folicular para Obtención de Ovocitos

Durante los años 90 la ecografía guiada comenzó a utilizarse como método de recolección de ovocitos en bovinos, los que luego son empleados para la producción in vitro de embriones. Se realiza tanto en vacas adultas como en animales jóvenes.

Para la realización de esta técnica el transductor o sonda es colocado en un soporte rígido de 50 centímetros que contiene la guía de la aguja de punción. Las agujas se introducen por una guía adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor, una bomba de vacío permite realizar la presión de aspiración necesaria para recolectar el contenido de los folículos puncionados (Denis, 2008). Este procedimiento aporta considerables ventajas al ser poco traumático, mínimamente invasivo y ser repetible en sucesivas ocasiones (Quintela et al. 2006).

La imagen de la pantalla del ecógrafo se utiliza para guiar la aguja de punción dentro del ovario hasta el folículo, por lo que la calidad de la imagen del equipo es de suma importancia (Bo y Caccia, 2000).

En la actualidad se trata de una técnica plenamente consolidada ya que la combinación de la aspiración folicular transvaginal ecoguiada y de la fecundación in vitro ha permitido la obtención de un gran número de terneros.

Además la combinación de ambas técnicas permite producir mayor número de embriones por unidad de tiempo que los programas MOET (Quintela et al. 2006).

2.10. ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ECOGRAFÍA EN EL BOVINO (OVUM PICK-UP, OPU)

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 vaginal), 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 utilizarse 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 producción 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 sólo 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).

La producción *in vitro* de embriones (PIV) a partir de ovocitos recolectados por OPU, puede ser una alternativa para la transferencia de embriones (TE) tanto en un marco comercial como en los programas del mejoramiento genético (Roschlau et al. 2003). Con la utilización de esta técnica se pueden producir dos ó tres veces más embriones por vaca que por el método convencional (Palma 2001).

2.10.1. Metodologías empleadas en punción folicular (OPU)

En los programas de producción *in vitro* de embriones (PIVE), las donantes pueden clasificarse como adecuadas; cuando la ecografía de los ovarios muestra de manera satisfactoria la población de folículos con diámetro superior a 3 mm (Cosac et al., 2003). La frecuencia del transductor es una variable importante a considerar en el proceso de recuperación de ovocitos. Hay citas de

3,5 MHz de frecuencia (Callesen et al., 1987), de 7,5 MHz (Hendriksen et al., 2004), 5,0 MHz (Bols et al., 2004) y 6,5 MHz (Roover et al., 2005).

El transductor vaginal endo-humano o micro-convexo es muy apropiado a las condiciones anatómicas de vacas y novillas pequeñas (Sauvé, 1998), además de presentar imagen de alta resolución y tener un gran ángulo de apertura (Aerts et al., 2004). El transductor sectorial, a su vez, ha demostrado ser más eficiente para ver los folículos más pequeños en comparación con transductor lineal (Bols et al., 2004). Sin embargo, el transductor lineal es sin duda el más utilizado en reproducción en animales grandes y fue (Seneda et al., 2003) quien hizo posible su utilización para la aspiración folicular transvaginal en bovinos. La principal desventaja de aspiración que se presenta con el transductor lineal se refiere al limitado espacio entre el transductor y la aguja, lo que impide que todas las regiones del ovario puedan ser puncionadas, incluso se hace difícil para cambiar el posicionamiento de los ovarios.

Inicialmente, la mayoría de los investigadores realizaban las aspiraciones sólo con agujas de gran longitud.

2.10.2. Descripción de la Técnica

Para la realización de esta técnica el transductor o sonda es colocado en un soporte rígido de 50 centímetros que contiene la guía de la aguja de punción. Las agujas se introducen por una guía adaptada a la parte plástica o metálica que sujeta el transductor, una bomba de vacío permite realizar la presión de

aspiración necesaria para recolectar el contenido de los folículos puncionados, presiones entre 50 (Fry et al. 1994) y 85 milímetros de mercurio (Gibbons et al. 1994), han sido reportadas con buenos resultados.

Existen tres tipos de agujas, las largas de uso único, las cortas de inyección (desechables) y un sistema semidesechable en el cual se cambia la punta de las agujas largas por agujas cortas desechables, las largas (35 a 60 centímetro) tienen el inconveniente que pierden el filo con facilidad, por lo que es necesario cambiarlas entre vaca y vaca, son muy caras y el ovocito debe transitar una gran distancia por una superficie metálica, las cortas son también de uso único y mucho más baratas, constituyendo un sistema más práctico (Denis, 2008).

Las agujas de bisel corto suelen ser más eficaces, ya que, la tasa de recolección es mayor y el daño a las células del cúmulo menor (Bols et al. 1997). En el caso del sistema semidesechable, se han reportado daños en la calidad de los ovocitos recolectados, debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y longitud metálica por donde debe transitar el ovocito (Bols, 2005).

Para la realización de OPU (Bols et al. 2004) resulta indispensable disponer de tres componentes: un equipo de ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor, una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector.

En la actualidad existe una gran variedad de marcas de ecógrafos (Aloka, Pie Medical, Starvet, Essaote-Aquila etc.), muchos de los cuales se han

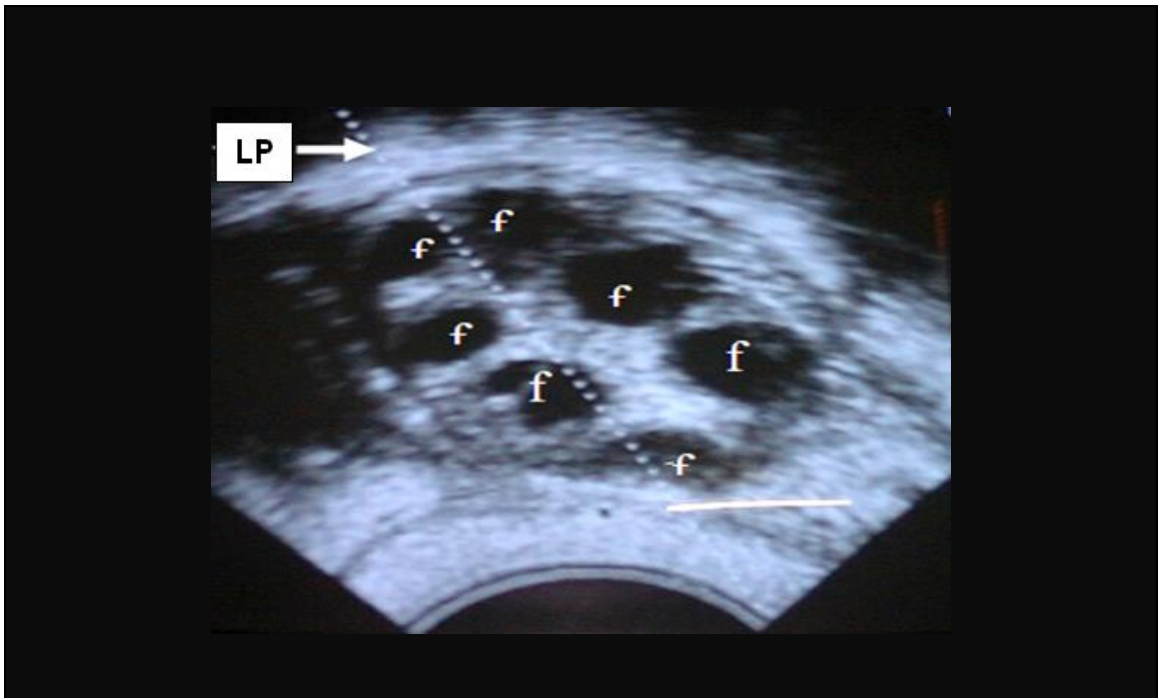
especializado en el diseño de transductores (sectoriales, convexos o lineales) apropiados para realizar OPU, capaces de trabajar incluso con dos frecuencias (Denis et al. 2004). Justo antes de iniciar el acto de la punción algunos equipos de trabajo prefieren sedar las hembras con hidrocloreto de detomidina (Domocedan) vía endovenosa, a razón de un miligramo por 100 kilogramos de peso vivo y/o (Buscopan) hyoscine-N-butylbromide utilizado como relajante intestinal antes de aplicar la anestesia epidural (Bols 1997) Sin embargo, en Francia y otros países OPU se realiza de modo habitual sólo con la aplicación de anestesia epidural (5 mililitros de lidocaina al dos por ciento), de modo que, se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto, lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios (Heyman et al. 2002).

Posteriormente se extraen las heces fecales del recto y se procede a la limpieza, desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua, desinfectante y papel higiénico. Una vez colocada la aguja en la guía del transductor se introduce este a través de la vagina, la mano libre del operador se introduce por el recto para proceder a la localización y acercamiento del ovario al transductor, que se coloca a la derecha o izquierda del cervix según el ovario seleccionado, para iniciar la punción (Bols 1997). En nuestro caso estos últimos procedimientos se obviaron debido a que se utilizaron ovarios post-mortem.

Los folículos se observan como imágenes anecogénicas (color negro) en el ovario, es necesario hacer coincidir estos con la línea discontinua que aparece

en la pantalla del ecógrafo (previa activación del menú punción) y que marca el recorrido de la aguja (Figura No 4).

FIGURA 6. IMAGEN ECOGRÁFICA DE UN OVARIO CON LOS FOLÍCULOS (F) Y LÍNEA DE PUNCIÓN (LP), QUE MARCA EL RECORRIDO DE LA AGUJA.



Esto se logra a través de la manipulación sobre el ovario, posteriormente se inicia la presión negativa y se hace avanzar la aguja, es posible visualizar la aspiración al desaparecer de la pantalla la imagen del folículo (Bols 1997). La

manipulación de la aguja puede realizarse por el propio operador, aunque por lo engorroso que resulta, generalmente es realizado por un ayudante. Antes de iniciar la operación, se hace pasar por la aguja una solución fosfatada buferada (PBS) a la cual se le adiciona 0,4 por ciento de suero de albúmina bovino (SAB) o uno por ciento de suero fetal bovino (SFB) y 10 unidades internacionales por mililitro de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre, que es abundante en el tubo de recolección (Hasler 1992), también es posible pasar solamente la solución de PBS con heparina (Heyman et al. 2002).

El contenido de la punción cae directamente a un filtro o a un tubo de recolección, el cual se mantiene a 37 grados centígrados hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los ovocitos colectados. El diámetro del filtro utilizado no debe ser mayor de 100 micras (Filtro EMCON), posteriormente el contenido se lava con PBS o puede adicionársele a esta 0,4 por ciento de SAB y 10 unidades internacionales por mililitro de heparina sódica (a 37 grados centígrados), para eliminar la sangre (Nibart y Marquant-Le 1995), y realizar más fácilmente la búsqueda y clasificación morfológica de los ovocitos, la cual se realiza en un estereoscopio óptico binocular (Marquant-Le. et al. 1989).

2.11. Selección de Ovocitos

Los ovocitos inmaduros, recolectados para FIV varían en su apariencia (aspecto del citoplasma y del cúmulus) y su morfología. Por ello se han tratado de

establecer relaciones entre estos y las tasas de desarrollo, con la intención de identificar uno o varios marcadores de calidad morfológica del complejo cúmulus ovocito (COCs), con valor predictivo sobre las tasas de desarrollo de blastocitos. De forma similar que con el tamaño del ovocito ($>15\mu\text{m}$, Nagano y col., 2006), la morfología de los COCs se estableció como criterio para seleccionar los más adecuados para ser cultivados (Madisson y col., 1992; Blondin y Sirard, 1995; Hazeleger y col., 1995; Hosoe y Shioya, 1997). La evaluación morfológica se debe llevar a cabo en una lupa entre 40 y 60 aumentos, tomando en consideración el aspecto del cúmulus y del citoplasma del ovocito. (Cuadro 1).

CUADRO I. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COCS INMADUROS

Cúmulus	Citoplasma ovocito
Número de capas que lo forman	Color (densidad)
Compactación	Tamaño de la granulación
Transparencia	

2.11.1. Clasificación de Ovocitos

Una etapa crítica en el procedimiento de fertilización in vitro (FIV) es la selección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar un óptimo desarrollo, los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: Estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus (Chen y col., 2001), así

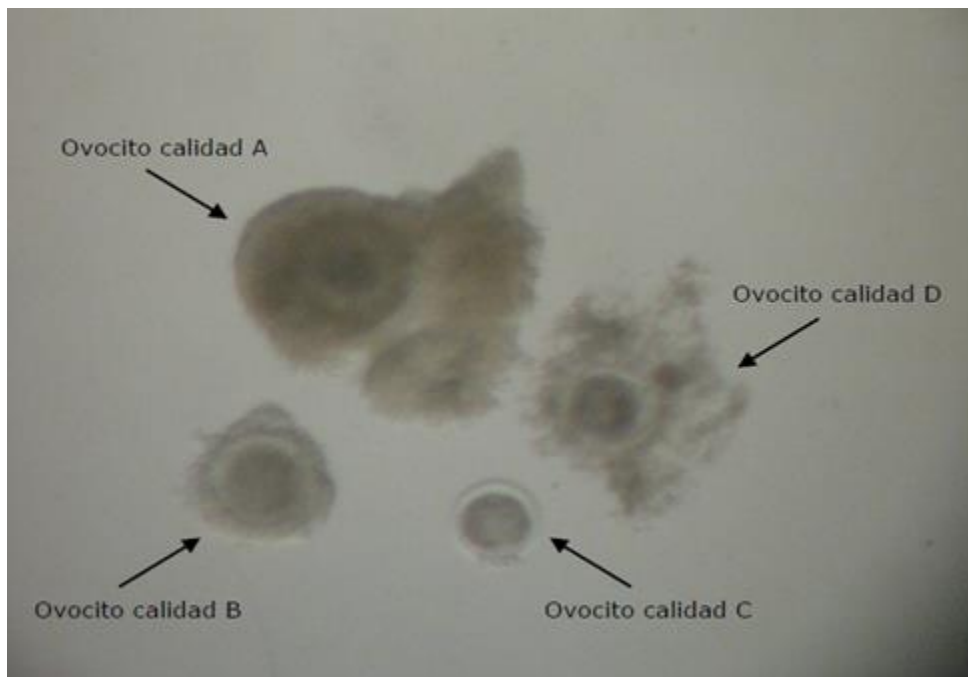
como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar (Sato y col., 1990) de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentra todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar.

La morfología del citoplasma y las células del cumulus son los primeros criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario, la calidad de las células que rodean el ovocito y la apariencia homogénea de citoplasma son los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar in vitro (Leibfried y col., 1986), las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa que aportan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto y col., 1996).

Por lo tanto los ovocitos se pueden clasificar según estos criterios, según las capas de células del cumulus, la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos, existen clasificación de 2 (Younis y col., 1998), 3 (Hawk., y col 1994) y 4 categorías, las que he valorado como más relevante, el tipo A corresponde a un ovocito corresponde a un ovocito con células del cumulus con

número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cumulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por tener un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene el cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras (Lonergan y col., 1991), Aunque por otra parte un ooplasma negro indica que el ovocito está envejecido y tiene bajo el potencial para soportar el desarrollo (Nagano y col., 2006).

FIGURA 7. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS



Fuente: Adaptada: Zárate, 2006

2.11.2. Morfología del complejo ovocito/cúmulus (COCs)

El método más obvio para diferenciar los ovocitos competentes de los que no lo son es la determinación de la constitución y morfología del cúmulus. Las células del cúmulus conforman una subpoblación de las células de la granulosa de la pared del folículo. *In vivo*, el cúmulus desaparece en el oviducto 3-6 horas (Lorton y First, 1979) a 10 horas después de la ovulación (Hyttel y col., 1988) en la mayoría de las especies. *In vitro*, el cúmulus del ovocito inmaduro está compuesto por las células de la corona radiata, que son las capas de células más próximas a la zona pelúcida del ovocito y comunicadas con éste a través de los puentes celulares.

El espesor del cúmulus varía con el tamaño del folículo, a mayor número de capas. Durante la atresia folicular las capas más externas del cúmulus son menos compactas por la menor cantidad de células presentes. Los COCs considerados de buena calidad son aquellos que están rodeados por cúmulus compacto de color gris o marrón uniformemente oscuro. Ello es importante porque su función es la de regular la maduración citoplasmática del ovocito en las últimas fases de desarrollo (Tanghe y col., 2002), coincidiendo con la maduración *in vitro*. El mantenimiento de una comunicación óptima entre el ovocito y las células del cúmulus es muy necesaria para promover el desarrollo y capacitación del ovocito durante el momento del cultivo *in vitro* (Motlik y col., 2000).

Además la presencia del cúmulus mejora la fecundación en la mayoría de las especies mamíferas (Van Soom y col., 2002) con excepción de la humana, a través de diferentes vías (Tanghe y col., 2002).

2.11.3. Efectos positivos del cúmulus sobre la fecundación (Tanghe y col., 2002)

- a. Incrementa el número de espermatozoides fecundados alrededor del ovocito, a través de su actividad quimiotáctica como trampa, quedando los espermatozoides atrapados en la matriz de glicosanoglicanos (ácido hialurónico en bovinos), entre las células del cúmulus, evitando el progreso de los espermatozoides que no alcanzaron la reacción acrosómica u también ofreciendo mejores condiciones a los ovocitos hiperactivados en dirección al ovocito.
- b. Establece un microambiente que facilita la capacitación espermática y la penetración, a través de la secreción de los factores y modulación de la tensión del oxígeno o el pH.
- c. Protege al ovocito de cambios desfavorables, como el endurecimiento prematuro de la zona pelúcida que conduce a menor penetración espermática.

Por lo tanto los ovocitos se pueden clasificar según estos criterios, según las capas de células del cúmulus y la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos, existen clasificación de 2 (Younis y col., 1998), 3 (Hawk y col., 1994) y 4 categorías, las que he valorado como más relevante, el tipo A corresponde a un ovocito con células del cúmulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por tener un cúmulus desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene el cúmulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras (Lonergan y col., 1991).

Aunque por otra parte un ooplasma negro indica que el ovocito está envejecido y tiene bajo el potencial para soportar el desarrollo (Nagano y col., 2006).

Existe una relación directa entre el desarrollo del ovocito y el número de células que lo rodean (Hirao y col., 1994). Ovocitos desnudos aislados de folículos éntrales y cultivados solos o sobre monocapa de células de la granulosa tienen un desarrollo deficiente (Eppig JJ.1979) o degeneran después de la fertilización (Osaki y col., 1997), otros estudios demostraron que los ovocitos desnudos aún pueden conservar la capacidad de desarrollo normal (Dominiko., First), en general se considera el número de 5 capas, de cúmulus que rodean al ovocito, como el número relevante. (Hawk y col, 1994) Observaron que ovocitos con 3

capas desarrollaron significativamente menos al estadio de blastocito (23%) que los que poseían mayor número de capas (40%), estos resultados son todos obtenidos en laboratorio tras punción de ovarios post- mortem.

Para fines prácticos se deberán cultivar solo ovocitos que tenga un cúmulus denso, con un mínimo de 5 capas que cubran toda la superficie del ovocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y sin manchas.

La selección de los ovocitos previa a la maduración en bovinos fue reportada inicialmente por Leibfried y First (1979), que demostraron que la capacidad de maduración nuclear in vitro no dependía del tamaño del folículo ni del momento del ciclo estral de la hembra, pero sí las características morfológicas de los ovocitos para su maduración en cultivo.

2.12. Factores que inciden en los resultados de la técnica

Esta técnica se utiliza en donantes que se encuentren en diferentes estados productivos (secas o en ordeño) y/o reproductivos (novillas o vacas gestantes). En este caso se recomienda realizar la punción entre el segundo y tercer mes de gestación, ya que en el primer mes resulta riesgoso lisar el cuerpo lúteo joven y comprometer la anidación del embrión. Pasados los tres meses de gestación los ovarios son inaccesibles por esta vía. OPU ha sido aplicada además con buenos resultados en animales tanto fértiles como infértiles. Existe un grupo de factores técnicos y biológicos que influyen en los resultados de la punción folicular in vivo (Douar, 1998), dentro de estos se encuentran:

2.13. Factores Técnicos que Influyen en los Resultados

Estos son factores vinculados al equipo de aspiración empleado, los cuales se considera pueden ejercer gran influencia sobre la cantidad y calidad de los ovocitos colectados. Tal es el caso de las agujas para la aspiración y la presión de vacío empleadas.

2.13.1. Tipo y Calidad de las Agujas Utilizadas

Dentro de los aspectos relacionados con la calidad de las agujas y el filo que estas posean (Sasamoto et al. 2003), resultan esenciales para el éxito de OPU (Scott et al. 1994).

Inicialmente un gran número de investigadores recomendaban el empleo de agujas largas (50-60 cm) con diámetro exterior entre 1 y 1.5 mm, estas son relativamente fáciles de construir y manejar y tienen una vida útil prolongada (Pieterse et al. 1988, Galli et al. 2001, Merton 2003), entre sus desventajas figuran sus altos precios y la pérdida con facilidad del filo, por lo que necesitan ser reafiladas regularmente, sin embargo no vuelven a recuperar su filo inicial (Simon et al. 1993). El uso de la misma aguja para varios animales causaba pérdida del borde del bisel, resultando en daños al estroma ovárico. Teniendo en cuenta estos aspectos críticos de la aguja de 55 cm, se ha demostrado la viabilidad de la utilización de agujas hipodérmicas desechables de 18 y 19

Gauge (G) y 50 mm de longitud (Bols et al., 1997; 2004). Las agujas con diámetros mayores de 18 G son relacionadas con las mayores tasas de recuperación, pero con un porcentaje mayor de ovocitos desnudos, así como con importantes daños al estroma y con mayor cantidad de sangre en el líquido aspirado. Actualmente las agujas de diámetro inferior a 19 G han reducido las tasas de recuperación de ovocitos, posiblemente por la lentitud de la aspiración del líquido folicular en el momento de la punción. Las agujas hipodérmicas de 50 mm han limitado la distribución en el mercado, pero son perfectamente sustituibles por las agujas de 40 mm. Por lo tanto, por agujas hipodérmicas desechables, la mayoría de las opciones viables en el mercado interno serían la de 40 mm x 9 y 40 mm x 10. Teniendo en cuenta que su precio es menor, se puede utilizar perfectamente una aguja por vaca, o incluso una por ovario, para los animales que presenten mayor cantidad de folículos pro aspiración. Así, el procedimiento se puede lograr causando el mínimo daño al estroma ovárico (Seneda & Blaschi, 2004).

2.13.2. Presión de Aspiración

La misma se encuentra estrechamente relacionada con la aguja utilizada (Bols et al., 1996). Existe una gran variación entre trabajos, ocasionando que las bajas presiones sean poco eficaces para la aspiración, mientras que presiones altas degeneran las células del cúmulus. Debido a la influencia ejercida por todo el sistema en la presión final de vacío, se sugiere cuantificarla en volumen de líquido por minuto. El intervalo entre 10 a 20 ml de líquido por minuto ha sido el

más utilizado hoy en día, y la medida debe ser pertinentemente readecuada a cada procedimiento. Las bombas de vacío inicialmente descritas - Cook – son estables y fueron especialmente designadas para obtener ovocitos de vacas (Pieterse et al., 1988), pero tienen un costo mayor. En la actualidad existe la alternativa de utilización de bombas de succión dental, de líquido endotraqueal y de infusión controlada. Todos estos equipos proporcionan la generación de vacío, aunque las variaciones en la capacidad de generar presión negativa podrían poner en peligro la cantidad y la calidad de los ovocitos colectados.

2.14. Factores Biológicos que Influyen en los Resultados

En este grupo se encuentran aquellos factores relacionados directamente con la fisiología del animal. Tal es el caso de la frecuencia de aspiración y la estimulación hormonal previa, que tienen un efecto sobre la dinámica folicular y por ende sobre cantidad de estructuras foliculares disponibles para la aspiración. La condición corporal, estado de salud, raza, edad, fertilidad y categoría de la donante también pueden influenciar los resultados.

2.14.1. Frecuencia de la Punción Folicular y el Momento Relativo al Ciclo de la Donante

Una de las ventajas que ofrece esta técnica es precisamente que puede ser altamente repetible en un mismo animal, al respecto Pieterse et al. (1991) realizó OPU en diferentes momentos del ciclo estral durante un período superior a tres meses. Vos et al. (1994), obtuvieron un número significativamente superior de ovocitos cuando realizaron la OPU 22 horas

posterior al pico de LH, respecto a cuándo realizaron esta antes de que se produjera el pico de esta hormona.

Por su parte Hendriksen, (2004) obtuvo un número de complejos cúmulo-ovocitos (COCs) de mayor calidad cuando realizó OPU el día cinco del ciclo estral respecto a cuándo realizó esta el día ocho, momento en que estuvo presente un folículo dominante, lo que sugiere que la presencia de este folículo afecta o inhibe el desarrollo del resto de los folículos subordinados. Van der Schans et al. (1991), puncionaron un mayor número de folículos (46.0 contra 25.3) y obtuvieron un mayor número de COCs (18.8 contra 10.8) en vacas estimuladas hormonalmente cuando los ovarios fueron puncionados dos veces por semana comparada con una punción.

Varios autores coinciden en afirmar que la frecuencia de aspiración de dos veces por semanal ofrece los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de COCs recolectados (Simón et al. 1993) y número de blastocitos obtenidos después de la fertilización in vitro (Gibbons et al. 1994). Por lo que se puede asumir que con esta frecuencia de OPU el folículo dominante es aspirado durante cada sesión y de este modo se estimula el crecimiento de una nueva onda folicular formada solamente por pequeños folículos en crecimiento (Bergfelt et al. 1994). Sin embargo, existen reportes que refieren haber obtenido óptimos resultados con la aplicación de esta técnica tras un intervalo de siete días entre sesión de OPU (Imai et al. 2000).

2.14.2. Condición Fisiológica y Corporal de las Donantes

La recolección de ovocitos en animales vivos no excluye a las hembras en estado de gestación, de modo que es posible realizar la recolección durante el primer trimestre de la gestación (Reinders et al. 1996). Esta puede realizarse además en hembras después de haber sido estimuladas con FSH (Meintjes et al. 1995), aunque no siempre se logra obtener mayor número de ovocitos (Bungartz et al. 1995). Domínguez (1995), encontró incremento en el número de folículos medianos y grandes en hembras gestantes comparado con hembras cíclicas. Argov et al. (2004), observaron un incremento de folículos recolectados al aumentar el número de sesiones de aspiración en vacas al inicio de la lactancia. La subnutrición (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 blastocistos producidos *in vitro* (López et al. 1996) y el incremento proporcional encontrado por Domínguez (1995), entre la calidad de los ovocitos en la medida en que se incrementaba la condición corporal. Leroy (2004), demostraron por su parte que los cambios metabólicos detectados en el suero 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 del ovocito presente en el pueden verse limitadas.

2.14.3. Raza, Edad, Fertilidad y Categoría de la Donante

Gran cantidad de estudios demuestran mayor respuesta en ganado *Bos indicus*; debido a que los animales *Bos indicus* presentan naturalmente mayor número de folículos por onda ovocitos (Blaschi et al. 2004), como indica Cruz et al. (2009), cuando encontraron un promedio de 16.3 COCs procedente de vacas *Bos indicus* versus 4.6 ovocitos procedentes de vacas *Bos taurus*. De Armas et al. (1994), recolectaron una mayor cantidad de complejos cúmulo-ovocitos por ovario en la raza Holstein respecto a los cruzamientos (Holstein x Cebú). Sin embargo, la cantidad de blastocistos obtenidos después de la FIV fue superior en los animales mestizos. Katska y Smorag (1984), observaron una disminución progresiva en la actividad ovárica en vacas viejas, pero no decreció con la edad la capacidad de producción de gametos.

La utilización de 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 trabajos en novillas entre 6 y 8 meses en la raza Holstein Friesian (Bols et al. 1999). También se ha reportado la aplicación de esta técnica en terneras pero varía la forma de manipulación de los ovarios (Brogliatti et al. 1995), aunque el principal problema que se presenta después de aplicar OPU en animales impúberes está relacionado con la disminución en la capacidad de desarrollo *in vitro* de los ovocitos recolectados (Taneja 2000). Van Wagtendonk et al. (1998), encontraron un número significativamente mayor de blastocistos cuando utilizaron donantes de

ovocitos mayores de tres años respecto a las menores (46,7 contra 42,0 por ciento respectivamente).

Nibart y Marquant-Le et al. (1995), muestran 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 donante, donde los mejores resultados en todos los indicadores evaluados están a favor de las primeras. Denis et al. (2006), demostró que la categoría de la donante influye significativamente ($P < 0.01$) en los resultados de la técnica de OPU, siendo éstos superiores en vacas respecto a las novillas, independientemente de su estado reproductivo (gestantes y vacías).

OPU tiene entre sus ventajas que puede ser empleada en aquellos animales que no tengan buena respuesta a los tratamientos superovulatorios. 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).

Otro de los factores que influye significativamente los resultados de OPU es de la individualidad de la donante, de modo que se han reportado diferencias entre estas que van desde cero a 26 ovocitos recolectados por donante (Hasler et al. 1995). Otros trabajos han comparado la cantidad de ovocitos colectados (3.1 contra 6.1) y la cantidad de blastocistos obtenidos por sesión (0.5 y 1.5,

respectivamente) al utilizar novillas de la raza Holstein Friesian de baja fertilidad comparada con novillas saludables de la misma raza (Bols et al. 1996).

2. 14.4. Estimulación Hormonal previa a OPU

Existen numerosos reportes relacionados con la recolección de ovocitos, sin necesidad de utilizar algún tipo de estimulación hormonal (Pieterse et al. 1991), ya que en todos los casos han sido observados folículos con un diámetro superior a dos milímetros (Kruip et al. 1994). Sin embargo, se han encontrado en algunos animales con baja actividad ovárica (Bousquet et al. 2000) en los cuales se hace necesario utilizar una combinación de FSH-LH o de gonadotropina gonadotropina criónica equina (eCG), las cuales se conoce tienen un efecto positivo en los tratamientos superovulatorios utilizados en la transferencia de embriones, aunque se realizan modificaciones en las dosis y el tiempo del tratamiento.

Pieterse et al. (1988), reportaron tasas de recolección superiores después de tratar a las donantes con eCG unido a un aumento en el tamaño de los ovarios y la cantidad de folículos. Trabajos posteriores (Pieterse et al. 1992), mostraron un mayor número de folículos puncionados por sesión en vacas estimuladas hormonalmente, sin embargo, las tasas de recolección fueron inferiores. Chong et al. (2008), reportaron un incremento significativo en el número de folículos puncionados y ovocitos recolectados al estimular las donantes con eCG.

Se han reportado tratamientos progestativos (Nibart et al. 1995), o con FSH utilizando el mismo esquema de los tratamientos superovulatorios empleados en la transferencia de embriones (Paul et al. 1995). La utilización de dichos tratamientos condiciona la frecuencia de la recolección, ya que las hembras superovuladas solo pueden ser puncionadas una vez cada tres o cuatro semanas, mientras que las no superovuladas pueden ser puncionadas una o dos veces por semana.

Otros autores (Goodhand et al. 2000, De Ruigh et al. 2000), reportan un incremento tanto en la cantidad de folículos puncionados como en la cantidad de ovocitos recolectados después de estimular la donante con FSH. Stubbins y Walton (1995) por su parte no encontraron diferencias significativas en el número de folículos colectados por punción en hembras no estimuladas puncionadas dos veces por semana, respecto a vacas estimuladas con FSH puncionadas una vez por semana. 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.

También se ha estudiado el efecto de la hormona somatotrófica bovina (BTS) en la población folicular (Bols et al. 1998), encontrándose un incremento significativo en el número total de folículos puncionados en hembras tratadas con dicha hormona respecto a las no tratadas, pero en cuanto al número de ovocitos recolectados no se encontraron diferencias significativas. Murakami et

al. (2003), demostraron que la utilización conjunta de FSH con BTS podía provocar un número mayor de folículos que deben puncionarse y de ovocitos recolectados de óptima calidad.

Goodhand et al. (1999), por su parte llegaron a la conclusión que la cantidad de embriones transferibles producidos después de una sesión de OPU semanal en hembras estimuladas con FSH resulta similar al alcanzado después de aplicar dos sesiones de punción semanal en hembras no estimuladas. Recientemente Bols et al. (2004), han propuesto la inyección intraovárica de minidosis de FSH-LH para incrementar la población folicular, sin que el costo del tratamiento se incremente significativamente.

2.15. Salud de las Donantes de Ovocitos

Con el advenimiento de la técnica de producción de embriones in vitro (PEIV), se hizo posible una alta utilización de genética animal seleccionada. Esta biotecnología ha demostrado ser capaz de proporcionar un gran número de descendientes. La evaluación periódica de los animales sometidos a aspiración folicular podría ayudar a controlar la aparición y gravedad de las lesiones. Los resultados de Viana et al. (2002), demostraron que las perforaciones del fondo de saco vaginal fueron curados con prontitud, y en sólo dos ocasiones se observaron irritaciones transitorias de la vagina y el cuello del útero. En general no hay alteraciones inflamatorias o procesos infecciosos en la vagina o en el resto del trato genital tubular (Viana et al. 2003b).

Los puntos de perforación del fondo de saco vaginal pueden ser identificados hasta 48 a 72 horas después de los pinchazos (Viana et al. 2003b). La formación de hematomas en la región perivaginal también pueden encontrarse (Sauvé, 1998), pero esta condición no parece causar grandes problemas para la donante. Las perforaciones de los ovarios pueden causar la aparición de secuelas como fibrosis y adherencia, sobre todo en vacas sometidas a muchas sesiones de la punción. Los cambios histológicos tales como la mineralización del parénquima o folicular dentro de las estructuras, se encontraron con independencia del número de sesiones de la punción folicular (Demarque et al. 2003).

En los ovarios que presentaron el mayor número de punciones, el engrosamiento del epitelio ovárico, comprometió la visión de folículos externos, cuando los ovarios se evaluaron macroscópicamente (Viana et al. 2003b). Gibbons et al. (1994), encontraron que los animales sometidos a un máximo de 20 sesiones de punción, mostraron una baja incidencia de lesiones. Viana et al. (2002), no observaron ninguna reducción en la recuperación de ovocitos por vaca en el curso de su período de prueba, incluso cuando se encontraron secuelas de tratamiento.

Es importante tener en cuenta que la aspiración folicular es una técnica que tiene pros y contras. El riesgo de secuelas existe y debe ser considerado. La realización del procedimiento debe hacerse con el fin de minimizar los daños

posibles, a fin de que los resultados superen las desventajas que se esperadas (Seneda et al. 2009).

2.16. Eficiencia del OPU

La eficacia del procedimiento de aspiración folicular transvaginal está directamente relacionada con una metodología que utilizemos. Los factores técnicos pueden tener un impacto considerable en la cantidad y en la morfología del cúmulus oophorus, y, en consecuencia, en la competencia para el desarrollo (Bols et al., 1997).

Otra variable se relaciona a las variaciones existentes entre las donantes. Los Informes de ovocitos de peor calidad en los animales seniles son frecuentes.

Hoy en día existe la posibilidad de aspiración folicular en animales muy jóvenes (Brogliatti & Adams, 1996), pero animales pre-pubescentes han mostrado reducción de la competencia de sus ovocitos para llegar a blastocito (Rizos et al., 2005). Parece haber un consenso sobre la condición corporal, en la que las donantes desnutridas producen ovocitos con menos capacidad para desarrollarse hasta convertirse en blastocito (Lopez et al., 1996), también existen evidencias de que las donantes sometidas a estrés también tendrían ovocitos menos competentes (Seneda et al., 2000). Aunque las hembras Nelore tengan mayor número de folículos reclutados, los parámetros reproductivos pueden variar ampliamente entre los animales de la misma raza, o incluso entre gemelos monocigóticos (Machado et al., 2003).

A pesar de que la calidad de los ovocitos no cambian con las diferentes etapas del ciclo estral, el número de folículos disponibles para la aspiración presenta una variación considerable. Hendriksen et al. (2004) atribuyen al hecho de que un folículo dominante reduce el desarrollo y la competencia de los ovocitos pertenecientes a los folículos subordinados. Por lo tanto, al realizar la punción antes de la divergencia del folículo dominante (desde 2 a 5 días del ciclo estral) podría aumentar la PIVE.

La tasa de recuperación (número de ovocitos recuperados tras la punción de 100 folículos) ha demostrado ser más alta para los folículos menores o iguales a 4 mm (Seneda et al., 1999). De esta forma surge la estrategia de hacer un uso más eficiente, aplicando FSH y practicando la OPU cuando la presencia de pequeños folículos es mayor (Seneda et al., 2002). Los resultados de Ueno et al. (2004) sugieren que la aplicación exógena de LH ha aumentado el número y la calidad de los ovocitos recuperados en folículos con 5-8 mm de diámetro, en comparación con los animales que fueron tratados con FSH. En los animales *Bos indicus*, quizás por tener mayor número de folículos por onda, la FSH ha tenido un menor impacto en el crecimiento folicular y en la consiguiente disponibilidad de ovocitos para la producción de embriones (Blaschi et al., 2004). Sin embargo, la ausencia de necesidad de la aplicación de hormonas es considerada una ventaja de la OPU sobre la transferencia de embriones (MOET). La OPU debe ser efectuada con intervalo de 12 – 15 días, permitiendo que la donante tenga el regreso cíclico de una forma natural, no afectando la función ovárica. Es especialmente inexplicable cómo algunos animales han

producido cientos de ovocitos en una sola sesión de OPU, sin ningún tipo de estímulo. En Brasil obtuvieron 251 ovocitos de un solo animal en una sola aspiración (Seneda MM, datos no publicados) y similares resultados se han relacionado por varios profesionales.

Secuelas de la punción folicular

La evaluación periódica de los animales sometidos a pinchazos foliculares podría ayudar a controlar la aparición y gravedad de las lesiones para el procedimiento ulterior. En general no hay alteraciones inflamatorias o procesos infecciosos en la vagina o en el resto del trato genital tubular, pero los puntos de perforación del fondo de saco vaginal pueden ser identificados hasta 48 a 72 horas después de los pinchazos (Viana et al., 2003). La formación de hematomas en la región perivaginal también pueden encontrarse (Sauvé, 1998), pero esta condición no parece causar mayores problemas para la donante. La perforación de los ovarios puede causar la aparición de secuelas como fibrosis, adherencia o mineralización del parénquima folicular, sobre todo en vacas sometidas a muchas sesiones de la punción.

2.17. Perspectivas de la punción folicular

La adquisición de ovocitos mediante aspiración folicular in vivo es sólo el primer paso en la producción in vitro de embriones. Después que los ovocitos son recuperados, el proceso de maduración, fecundación y desarrollo se llevan a cabo en laboratorios especiales.

Los desafíos para lograr una mayor difusión de la aspiración folicular es el alto costo del equipo y la dedicación necesarios para la formación en la tecnología. Una mayor estandarización en la recuperación de ovocitos se puede lograr mediante la aplicación de protocolos para la sincronización del estro, con el objetivo de alcanzar la aspiración más prospera y exitosa.

Por último, es importante señalar que la OPU / PIVE no es bueno, ni malo. Como cualquier biotécnica, se trata de una herramienta para servir al ganado. Si se utilizan adecuadamente, ofrece resultados satisfactorios, lo que corresponde a las expectativas de la inversión inicial. Si se utilizan incorrectamente, puede causar daños a las donantes o, lo que es peor, generar una gran cantidad de animales genéticamente inferiores. Por lo tanto, resaltamos la necesidad de un análisis minucioso de cada una de las propuestas para trabajar con OPU / FIV, tanto para ganaderos y especialistas, para que la mayor parte de esta herramienta biotecnológica pueda contribuir al engrandecimiento del mundo ganadero.

2.18. Ventajas de la Aspiración Folicular

La aspiración aparece como herramienta promisorio para aumentar el número de descendientes, la cual posee varias ventajas observadas en la literatura cuando la comparamos con la TE convencional (RUMPF, 2007; BACELAR et al., 2010). Dentro de ellas están:

- ✓ Es una técnica simple y rápida;

- ✓ Permite hacer aspiraciones de becerras prepúberes, en vacas que estén en el primer tercio de la gestación y en vacas seniles;
- ✓ Permite la producción de varios descendientes de una única donadora;
- ✓ Permite aspirar vacas que no están aptas a producir descendientes con las técnicas convencionales;
- ✓ Permite la aspiración de vacas que presenten infertilidad por tratamientos hormonales o con disturbios patológicos del sistema reproductor (adherencias de ovario y útero, metritis crónicas, infecciones tubaricas y otras patologías);
- ✓ Recuperación de ovocitos viables de hembras recién muertas;
- ✓ No es necesario el uso de hormonas para recuperar los ovocitos,
- ✓ Es de gran practicidad para el técnico, pues puede ser realizada independiente de la fase del ciclo estral en que se encuentre la vaca.

2.19. Desventajas de la Aspiración Folicular

Algunos investigadores como (SENEDA et al., 2008), relatan que esta técnica presenta algunas desventajas para el ganadero como:

- Elevado costo;
- Necesidad de un técnico especializado en el tema;
- Lesiones ovarianas generadas por la repetibilidad de la misma.

3. MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agropecuaria, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Panamá, ubicado en el corregimiento de Chiriquí, localizado a los $8^{\circ}23'15.12''$ de latitud norte y $82^{\circ}19'47.48''$ de longitud oeste, con una elevación de 26 msnm.

FIGURA 8. INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES



Fuente: El autor

La duración de esta investigación fue de aproximadamente diez meses. Los ovarios se obtuvieron a partir de hembras sacrificadas en el matadero de Boquerón en la Provincia de Chiriquí. Una vez retirados los ovarios del animal fueron lavados tres veces con alcohol y solución salina para luego ser colocados en una bolsa plástica hermética y posteriormente a un termo que contenía solución salina a una temperatura cercana a los 35°C para ser finalmente llevados al laboratorio con la mayor brevedad posible.

FIGURA 9. OBTENCIÓN DE OVARIOS DE MATADERO.



Fuente: El autor

Al llegar al laboratorio se realizó la aspiración de los folículos presentes en los ovarios, empleando para tal fin un equipo que consta de un monitor ecográfico (marca essaote, modelo Aquila pro), con un transductor convexo de 5 MHz acoplada a una guía de agujas para punción ovárica (marca WTA), la cual se encuentra unida a una bomba de vacío (marca Pioneer, modelo PS598), mediante unas mangueras de silicona (circuito de aspiración) equipada con tubos de recolección.

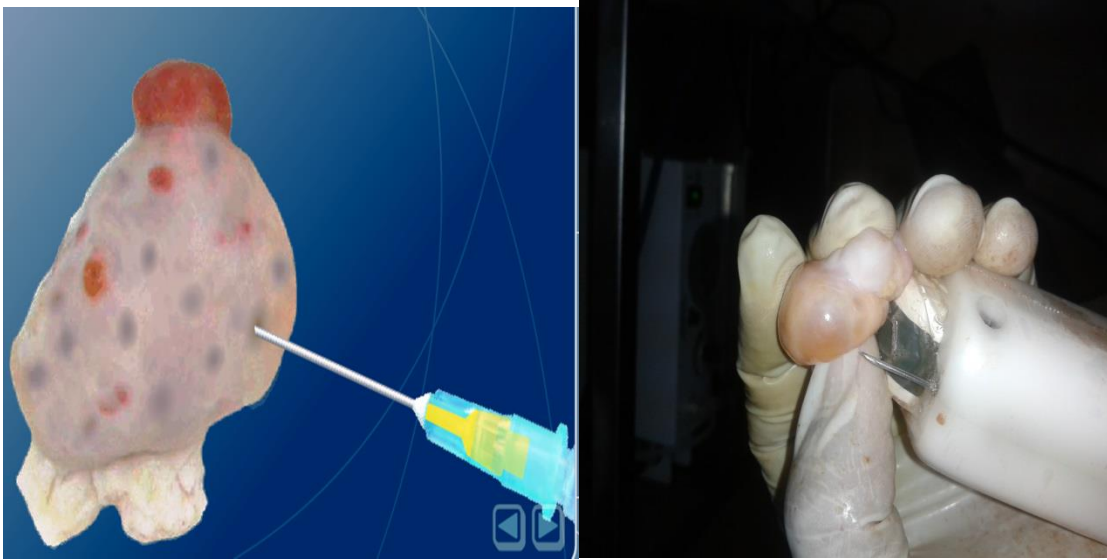
Manualmente se colocó el ovario contra el transductor acoplado a la guía de aspiración, en ese momento se realizó una combinación de observación visual del ovario para constatar la presencia de folículos y observación a través de la pantalla del ecógrafo para determinar su tamaño. Una vez localizado el folículo a aspirar se procede a introducir la aguja y a ejercer presión de vacío. Los folículos viajan de la aguja a través de mangueras de silicona y llegan hasta el tubo de recolección contenido con medio de aspiración (PBS mas Heparina en relación 50:1).

FIGURA 10. EQUIPO Y MATERIALES PARA REALIZAR LA ASPIRACIÓN FOLICULAR



Fuente: El autor

FIGURA 11. OBTENCIÓN DE OVOCITOS A PARTIR DE OVARIOS DE MATADERO.



Fuente: El autor

El líquido folicular y los ovocitos aspirado junto con el medio de colecta, fueron colocados en un filtro para colecta de embriones. Se procedió a adicionar PBS al filtro descartando el medio varias veces hasta lograr que solo quedaran los ovocitos y células sin rastros de sangre. Posteriormente este medio se pasaba del filtro a un plato Petri adicionando un poco de PBS para asegurarse de que no quedaran ovocitos adheridos al filtro para finalmente realizar la búsqueda de los ovocitos con la ayuda de un estereoscopio marca Motic.

La calidad de los COCs fue evaluada en una escala de uno a cuatro basándose fundamentalmente en los criterios de selección propuestos por de Loos *et al.* (1989), considerándose como aptos para FIV solo aquellos que se clasificaban en las categorías 1 2 y 3.

**CUADRO II. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CUMULUS
OVOCITOS (COCs)**

Clasificación	Criterios
1	Cumulus con capas múltiples Cumulus compacto La totalidad del COCs es clara y transparente Citoplasma homogéneo
2	Cumulus como el 1 o algo más oscuro y menos transparente Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en el 1 en la periferia
3	Cumulus menos compacto, más oscuro que el 1 y 2 Cumulus con manchas oscuras
4	Cumulus expandido

Fuente. De Loos *et al* (1989)

FIGURA 12. CLASIFICACIÓN Y LAVADO DE COCs.



Búsqueda de ovocitos bajo
visión estereoscópica



AL localizar los ovocitos, estos
son depositados en una placa
Petri.



Ovocitos encontrados y
clasificados

Fuente: El autor

Se aspiraron un total de 756 folículos, los cuales estaban distribuidos en tres grupos dependiendo de su tamaño (2 a 5 mm, 6 a 10 mm y 11 a 15 mm). En el proceso de aspiración también se emplearon dos diámetros de agujas distintos (18 G x 2 cm, 20 G x 2 cm) y dos presiones de aspiración (50 mm Hg, y 80 mm Hg).

De manera que se obtuvieron 12 tratamientos, con desigual número de submuestras, distribuidos de la forma que se muestra en el cuadro número tres.

CUADRO III. ARREGLO DE TRATAMIENTOS

FACTORES TÉCNICOS		TAMAÑO DE LOS FOLÍCULOS		
PRESIÓN DE ASPIRACIÓN	TIPO DE AGUJA	2-5 mm	6-10 mm	11 - 15 mm
50 mmHg	18 G	50 mmHg x 18 G T1	50 mmHg x 18 G T2	50 mmHg x 18 G T3
	20 G	50 mmHg x 20 G T4	50 mmHg x 20 G T5	50 mmHg x 20 G T6
80 mmHg	18 G	80 mmHg x 18 G T7	80 mmHg x 18 G T8	80 mmHg x 18 G T9
	20 G	80 mmHg x 20 G T10	80 mmHg x 20 G T11	80 mmHg x 20 G T12

3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se evaluaron empleando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 3, con desigual número de muestras y se trabajó con un nivel de significancia de α 0.05. Los parámetros evaluados se analizaron empleando el procedimiento CATMOD de SAS (The SAS System) cuyo modelo lineal aditivo fue:

$$Y_{ijk} = \mu + DA_i + PA_j + TFK_k + (DA*PA)_{ij} + (DA*TF)_{ik} + (PA*TF)_{jk} + (TA*PA*TF)_{ijk} + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable dependiente

μ = Efecto de la media

DA_i = Efecto del diámetro de la aguja

PA_j = Efecto de la presión de aspiración

TFK_k = Efecto del tamaño del folículo

$(DA*PA)_{ij}$ = Efecto de la Interacción del diámetro de la aguja por la presión de aspiración

$(DA*TF)_{ik}$ = Efecto de la interacción del diámetro de la aguja por el tamaño del folículo

$(PA*TF)_{jk}$ = Efecto de la interacción de la presión de aspiración por el tamaño del folículo

$(DA*PA*TF)_{ijk}$ = Efecto de la interacción del diámetro de la aguja por la presión de aspiración por el tamaño del folículo

e_{ijk} = Efecto del error

3.2. PARÁMETROS A EVALUAR

Cantidad de ovocitos colectados

Calidad de los ovocitos colectados

Tasa de recuperación de ovocitos aspirados

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera parte de nuestro estudio consistió en evaluar la tasa de recuperación de ovocitos obtenidos por tratamiento, tal como se puede observar en el cuadro IV.

CUADRO IV. TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR TRATAMIENTO.

Tratamiento	Folículos Aspirados	COCs Colectados	Tasa de Recuperación (%) ±EE
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	70	58	82.86±8.69 ^a
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	105	85	80.95±8.69 ^{ab}
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	70	55	78.57±8.69 ^{ab}
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	105	82	78.10 ±8.69 ^{ab}
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	105	81	77.14±8.69 ^{ab}
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	70	42	60.00±8.69 ^{ab}
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	14	8	57.14±8.69 ^{bc}
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	105	57	54.28±8.69 ^{cd}
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	70	36	51.43±8.69 ^{cd}
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	14	6	42.86±8.69 ^{cd}
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	14	5	35.71±8.69 ^d
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	14	5	35.71±8.68 ^d

Letras diferentes para la misma columna muestran diferencias estadísticas (P<0.05)

En este cuadro se evidenció que las tasas de recuperación parecen ser mejores cuando se aspiran folículos de menor y mediano tamaño (de 2 - 5 mm Ø y 6 -10 mm Ø respectivamente). Hubo una tendencia hacia un mayor porcentaje de recuperación en folículos pequeños: 72 % (Ø <5 mm), 68 % (Ø >5 mm) y 42 %

($\varnothing > 10$ mm) respectivamente. Sin embargo, cuando la presión de aspiración fue baja (50 mmHg), la tasa de recuperación tiende a reducirse incluso al puncionar folículos pequeños. Esto coincide con los resultados expuestos por Pieterse *et al.* (1991), donde puncionaron folículos, también provenientes de ovarios post mortem con un > 3 mm \varnothing , en diferentes momentos del estro, los folículos fueron clasificados de acuerdo a su tamaño (3-5 mm \varnothing , 6-10 mm \varnothing y > 10 mm \varnothing) y obtuvieron tasas de recuperación consistentes a lo largo del ciclo y un promedio general de 55%. Para los distintos grupos de folículos, hubo una tendencia hacia un mayor porcentaje de recuperación en folículos pequeños: 59 % (3-5 mm \varnothing), 55 % (6-10 mm \varnothing) y 43 % (> 10 mm \varnothing) respectivamente. En tanto Goodhand *et al.* (1999), lograron una mejor recuperación cuando se puncionaron ovarios que presentaban una mayor población de folículos pequeños (≤ 6 mm \varnothing). Resultados similares fueron descritos por Seneda *et al.* (2001), puncionando folículos < 4 mm y > 4 mm, donde se demostró que la tasa de recuperación es significativamente más alta para los folículos de menor diámetro.

De igual forma se apreció una tendencia matemática a obtener mejores tasas de recuperación, cuando la presión de aspiración empleada fue mayor (80 mmHg). Sin embargo esta se reduce cuando los folículos aspirados son de un diámetro mayor (> 10 mm \varnothing).

Por otra parte, cuando se analiza la influencia del diámetro de la aguja sobre la tasa de recuperación independientemente de la presión de aspiración, encontramos que al emplear agujas con diámetro 18 G, la tasa de recuperación parece ser mayor; excepto cuando los folículos aspirados son mayores a 10 mm

Ø, donde pareciera ser que la aguja de menor diámetro (20 G), logra mejores resultados y más aún cuando se incrementa la presión de aspiración de 50 a 80 mmHg.

Nuestros resultados fueron similares a un estudio realizado por Bols *et al.* (1996b), donde se compararon tres diámetros de aguja (18G, 19G y 21G) y cinco presiones de aspiración (50 mmHg, 70 mmHg, 90 mmHg, 110 mmHg y 130 mmHg), quienes obtuvieron las mayores tasas de recolección con las agujas de mayor diámetro (18G), independientemente de la presión de aspiración utilizada; mientras que para los diferentes tipos de agujas, las mayores tasas de recuperación se alcanzaron al aplicar las presiones más altas de aspiración.

CUADRO V. PORCENTAJES DE CALIDAD DE LOS OVOCITOS (COCs) ASPIRADOS POR TRATAMIENTO

Tratamiento	X Porcentual de Ovocitos aptos para FIV	X Porcentual de Ovocitos no aptos para FIV
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	71.81±12.39	28.19±12.70
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	71.76±12.39	28.24±12.70
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	71.38±12.39	28.62±12.70
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	66.34±12.29	33.66±12.70
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	63.28±12.39	36.72±12.70
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	60.00±14.65	40.00±15.02
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	60.00± 14.65	40.00±15.02
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	55.84±14.65	44.16±12.70
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	55.69±12.39	44.31±12.70
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	52.61±12.39	47.38±12.70
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	50.00±13.38	50.00±13.71
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	40.00±14.65	60.00±15.02

Según el cuadro V todo parece indicar que los folículos pequeños (<5mm Ø) y medianos (6 a 10mm Ø), aportan un porcentaje de ovocitos aptos para FIV superior a los de mayor tamaño (>10mm Ø), en tanto que ni el diámetro de la aguja, ni la presión de aspiración parecen tener mayor influencia cuando los ovocitos son clasificados solamente en aptos y no aptos para FIV; lo cual coincide con Gardon (1999), quien encontró que en un estudio realizado con ovarios de matadero, donde se aspiró folículos entre 1 y 6 mm Ø, empleando agujas de 18G; sobre un total de 3,180 ovarios recolectados, obtuvo 18,524 ovocitos de los cuales 5,305 (28.49%) fueron clasificados como aptos y 13,219 (71.50%) como no aptos para ser madurados in vitro. Estos resultados fueron inferiores a los nuestros (60 y 40% respectivamente). Por su parte Solís et al. (2012), en un estudio in vivo, que empleó frecuencias de aspiración una y dos veces a la semana, de folículos entre 3 y 9 mm, utilizando agujas 18 G y presión entre 50 y 65 mmHg, encontraron un porcentaje de ovocitos aptos para FIV entre 86.00 y 88.00%; los cuales fueron resultados superiores a los alcanzados en este estudio.

Al analizar los valores porcentuales de calidad de ovocitos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas, lo cual a nuestro criterio, estuvo influenciado por el hecho de que no mostraban una distribución normal de los datos, de manera que se procedió a la transformación logarítmica en base 10 mas 10, para lograr una distribución normal y de esta manera poder aplicar el diseño experimental planteado, obteniéndose de este modo los siguientes resultados (Cuadro VI).

CUADRO VI. DATOS PORCENTUALES PARA LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS (COCS) ASPIRADOS POR TRATAMIENTO LOGARÍTMICAMENTE TRANSFORMADOS

Tratamiento	Ovocitos aptos para FIV \pm EE	Ovocitos no aptos para FIV \pm EE
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	4.61 \pm 0.25 ^a	4.61 \pm 0.42 ^a
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	4.61 \pm 0.25 ^a	4.61 \pm 0.42 ^a
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	4.61 \pm 0.30 ^{ab}	4.61 \pm 0.34 ^a
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	4.26 \pm 0.21 ^{abc}	4.26 \pm 0.30 ^{ab}
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	4.29 \pm 0.17 ^{abc}	3.47 \pm 0.22 ^c
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	4.25 \pm 0.17 ^{abc}	3.36 \pm 0.24 ^c
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	4.25 \pm 0.16 ^{abc}	3.42 \pm 0.24 ^c
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	4.18 \pm 0.16 ^{abc}	3.50 \pm 0.26 ^{bc}
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	4.18 \pm 0.16 ^{abc}	3.42 \pm 0.22 ^c
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	3.93 \pm 0.16 ^{bc}	3.65 \pm 0.22 ^{bc}
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	3.90 \pm 0.16 ^c	3.80 \pm 0.22 ^{abc}
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	3.82 \pm 0.16 ^c	3.64 \pm 0.22 ^{bc}

Letras diferentes para la misma columna muestran diferencias estadísticas (P<0.05)

Como se puede apreciar en el cuadro VI, los tratamientos: T3, T9, T6, T12, T11, T10, T2, T5 y T8 no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí, al igual que los tratamientos (T4, T1 y T7). Mientras que, solo los tratamientos (T3, T9 y T6) difirieron con los tratamientos (T1, T7 y T4). Lo cual sugiere que el número de folículos por tratamiento es la causal de esta diferencia.

Es decir que aquellos folículos >10 mm Ø, son los que aportan la mejor calidad de ovocitos aptos para FIV, estos datos son atípicos de los originales. Sin embargo recordemos que estos datos no corresponden al comportamiento biológico observado, ya que este cuadro se realizó con la finalidad de mostrar

las diferencias significativas entre tratamiento, todo lo que se hace es comprimir los valores altos y expandir los pequeños obteniendo así una distribución normal de los datos. Por tal motivo solamente nos remitimos a expresar cuales tratamientos diferían entre sí.

**CUADRO VII. PROMEDIOS DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS
COLECTADOS POR TRATAMIENTO**

Tratamiento	Fol. Asp.	Total de COCs colectados	G1±DE	G2±DE	G3±DE	G4±DE	
						Deg	Des
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	15	11.9	0.86±0.7	2.29±2.0	2.57±1.3	2.14±1.2	3.86±3.6
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	10	6.1	1.00±1.5	1.29±0.8	2.00±0.8	0.86±0.9	0.86±0.9
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	2	0.8	0.14±0.4	0.43±0.5	0.00±0.0	0.29±0.5	0.00±0.0
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	15	8.2	1.14±1.9	1.86±1.3	1.57±1.5	0.57±0.8	3.00±2.2
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	10	5.1	0.43±0.5	1.71±1.6	1.86±2.1	0.43±0.5	0.71±1.3
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	2	0.6	0.14±0.4	0.00±0.0	0.14±0.4	0.43±0.5	0.00±0.0
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	15	12.2	0.57±0.8	2.00±1.5	3.86±2.0	1.57±1.7	4.14±2.6
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	10	8.4	0.29±0.4	1.00±0.8	4.29±1.4	1.86±0.9	0.86±0.9
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	2	0.7	0.00±0.0	0.14±0.4	0.29±0.5	0.29±0.5	0.00±0.0
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	15	11.6	0.86±1.2	1.29±1.4	6.29±2.0	1.14±1.5	2.0±1.9
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	10	7.8	1.14±1.1	1.57±1.0	2.43±2.0	1.29±1.1	1.43±2.6
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	2	1.1	0.29±0.5	0.00±0.0	0.29±0.5	0.43±0.5	0.14±0.4

Letras diferentes para la misma columna muestran diferencias estadísticas (P<0.05)

Como se muestra en el cuadro VII, el número de folículos aspirados y el total de ovocitos colectados por tratamiento, fueron tabulados, al mismo tiempo que se determinó el promedio de ovocitos obtenidos de acuerdo a los grados de

calidad. No obstante, en vista de que el número de folículos aspirados fue diferente entre tratamientos; para poder efectuar los estudios estadísticos correspondientes, fue necesario realizar un análisis porcentual de cada tratamiento como se muestra en el cuadro VIII.

CUADRO VIII. PORCENTAJE DE GRADOS DE CALIDAD DE COCs POR TRATAMIENTO

Tratamiento	COCs (n)	G1 (%)±EE	G2 (%)±EE	G3 (%)±EE	G4 (%)±EE	
					Deg.	Des.
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	82	9.22±8.57	18.65±16.39	24.73±13.91	19.07±9.11	28.32±24.94
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	42	12.81±17.89	22.02±10.63	36.98±18.00	13.29±13.84	14.90±15.81
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	6	10.00±18.90	50.00±47.56	0.00±0.00	40.00±48.80	0.00±0.00
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	57	14.80±26.60	23.02±15.04	18.03±14.41	7.20±9.91	36.96±24.53
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	37	7.76±9.86	35.60±30.09	28.03±26.14	6.68±8.64	21.94±30.47
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	5	20.00±37.80	0.00±0.00	20.00±37.80	60.00±53.45	0.00±0.00
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	85	4.40±6.05	16.32±12.09	34.97±25.28	11.75±11.36	32.56±15.88
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	58	3.21±5.54	12.61±9.74	50.52±18.66	23.08±11.54	10.57±10.78
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	5	0.00±0.00	20.00± 37.80	40.00±37.80	40.00± 48.80	0.00±0.00
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	81	7.55±10.15	10.38±11.45	53.83±10.62	10.02±11.20	18.22±16.14
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	55	14.38±13.13	19.18±10.54	29.72±20.79	16.08±15.28	20.63. ±37.09
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	8	25.00±39.34	0.00±0.00	25.00±39.34	41.67±47.56	8.33±18.90

Este cuadro muestra un aumento en el porcentaje de calidad de los ovocitos Grado 1 en los tratamientos cuando se aspiraban folículos entre 2 -10 mm Ø, en tanto que a medida que se aspiraban folículos >10 mm Ø la calidad disminuía progresivamente.

En el caso de los ovocitos con calidad grado 2, al igual que en el de los ovocitos de grado 1, se apreció una disminución del número de ovocitos, en los tratamientos donde se aspiraron folículos >10 mm \emptyset (T6, T9, T12), a excepción del T3, el cual mostró un porcentaje superior (50%) de ovocitos grado 2, lo cual pudo deberse en principio, al calibre de aguja (18G) y a la baja presión de aspiración (50 mmHg), que permitió la obtención de ovocitos con mayor número de capas de células del cúmulo y por ende mayor calidad, lo que discrepa con Bols *et al.* (1996), quienes encontraron que agujas con menor diámetro se relacionan con mayor proporción de COCs con cúmulo compacto, y al mismo tiempo concuerda, ya que también indicaron en este mismo estudio que a una baja presión de aspiración, la mayoría de ovocitos recuperados estaban rodeados de un cumulo compacto, a lo que Lenz *et al.* (1987), encontraron que un aumento gradual en la presión de aspiración provoca ovocitos morfológicamente anormales.

Para los ovocitos de grado 3, todo parece indicar que la mayor proporción de estos se obtiene cuando se aspiran folículos de pequeño (<5 mm \emptyset) y mediano tamaño (entre 6 a 10 mm \emptyset), como es el caso de los tratamientos T10, T8, T2 y T7, T11 y T1, que mostraron valores de 53.83, 50.52, 36.98, 34.97, 29.72 y 24.73% respectivamente.

Como se aprecia en el cuadro 7, en el caso de los ovocitos desnudos, los tratamientos en los que se aspiraron folículos más grandes (tratamientos T3, T6,

T9 y T12), se evidenció menor proporción de estos (0.00, 0.00, 0.00 y 8.33% respectivamente), lo cual consideramos estuvo influenciado por la proporción de folículos degenerados que presentaron estos tratamiento. Seguidamente los folículos de mediano tamaño (T2, T5, T8, y T11, con valores 14.90, 21.94, 10.57 y 20.63% respectivamente) y finalmente los tratamientos en los que se aspiraban folículos pequeños (tratamientos T1, T4, T7, T10 y con valores de 28.32, 36.96, 32.56 y 18.22% respectivamente).

Estos resultados sugieren tomar en cuenta la opinión de Seneda (1999), quien indica que los folículos más pequeños son sometidos a una mayor presión intra folicular al momento de la aspiración dando como resultado una mejor tasa de recuperación a lo que nosotros consideramos este mismo fenómeno también podría traer como consecuencia un mayor número de ovocitos de grado 3 y desnudos cuando se aspiran folículos de menor tamaño.

Cuando se analizaron el porcentaje de ovocitos degenerados, se apreció una mayor proporción de estos en los tratamientos en los que se aspiraban folículos mayores a 10 mm Ø (tratamientos T6, T9, T12, y T3, con valores de 60.00, 40.00, 41.67 y 40.00% respectivamente), en tanto que la menor proporción de estos se mostró cuando se aspiraron folículos de pequeño y mediano tamaño, lo que a nuestro criterio guarda relación con la teoría de las ondas foliculares, donde los folículos de mayor tamaño pudieran haber entrado en un proceso de atresia folicular, caracterizada como menciona Viana et al. (2004), por

alteraciones estructurares y funcionales incluyendo apoptosis de las células de la granulosa, con retracción celular, pérdida de la cohesión y expansión del cúmulo.

Al igual que en el caso de la calidad de ovocitos aptos y no aptos para FIV, para estudiar los grados de calidad de ovocitos (grado 1, 2, 3, y 4), también fue necesario realizar una transformación logarítmica en base 10 para obtener una distribución normal de los datos y así aplicar el diseño experimental planteado, como se muestra en el cuadro IX.

CUADRO IX. DATOS LOGARÍTMICAMENTE TRANSFORMADOS PARA LOS GRADOS DE CALIDAD DE COCs POR TRATAMIENTO

Tratamiento	COCs (n)	G1 (%)±EE	G2 (%)±EE	G3 (%)±EE	G4 (%)±EE	
					Degenerados	Desnudos
T1 (50mmHg x <5mm x 18G)	82	2.87±0.24 ^{ab}	3.20±0.25 ^{ab}	3.48±0.26 ^{abcde}	3.32±0.31 ^b	3.43±0.24 ^{ab}
T2 (50mmHg x >5mm x 18G)	42	2.88±0.24 ^{ab}	3.39±0.25 ^a	3.78±0.26 ^{abc}	2.97±0.31 ^{bc}	3.02±0.24 ^{abc}
T3 (50mmHg x >10mm x 18G)	6	2.56±0.24 ^{ab}	3.24±0.25 ^{ab}	2.30±0.26 ^g	2.99±0.31 ^a	2.30±0.24 ^d
T4 (50mmHg x <5mm x 20G)	57	2.86±0.24 ^{ab}	3.38±0.25 ^a	3.18±0.26 ^{cdef}	2.71±0.31 ^c	3.67±0.24 ^a
T5 (50mmHg x >5mm x 20G)	37	2.74±0.24 ^{ab}	3.52±0.25 ^a	3.39±0.26 ^{bcde}	2.70±0.31 ^c	3.06±0.24 ^{abc}
T6 (50mmHg x >10mm x 20G)	5	2.64±0.24 ^{ab}	2.30±0.25 ^c	2.64±0.26 ^{fg}	3.33±0.31 ^a	2.30±0.24 ^d
T7 (80mmHg x <5mm x 18G)	85	2.60±0.24 ^{ab}	3.14±0.25 ^{ab}	3.69±0.26 ^{abcd}	2.96±0.31 ^{bc}	3.69±0.24 ^a
T8 (80mmHg x >5mm x 18G)	58	2.52±0.24 ^{ab}	3.02±0.25 ^{ab}	4.06±0.26 ^{ab}	3.44±0.31 ^b	2.89±0.24 ^{bcd}
T9 (80mmHg x >10mm x 18G)	5	2.30±0.24 ^b	2.64±0.25 ^{bc}	2.99±0.26 ^{defg}	2.99±0.31 ^{ab}	2.30±0.24 ^d
T10 (80mmHg x <5mm x 20G)	81	2.73±0.24 ^{ab}	2.90±0.25 ^{abc}	4.14±0.26 ^a	2.86±0.31 ^{bc}	3.16±0.24 ^{abc}
T11 (80mmHg x >5mm x 20G)	55	3.06±0.24 ^a	3.30±0.25 ^{ab}	3.52±0.26 ^{abcde}	3.10±0.31 ^b	2.96±0.24 ^{bcd}
T12 (80mmHg x >10mm x 20G)	8	2.90±0.24 ^{ab}	2.30±0.25 ^c	2.90±0.26 ^{efg}	3.24±0.31 ^a	2.56±0.24 ^{cd}

Letras diferentes para la misma columna muestran diferencias estadísticas (P<0.05)

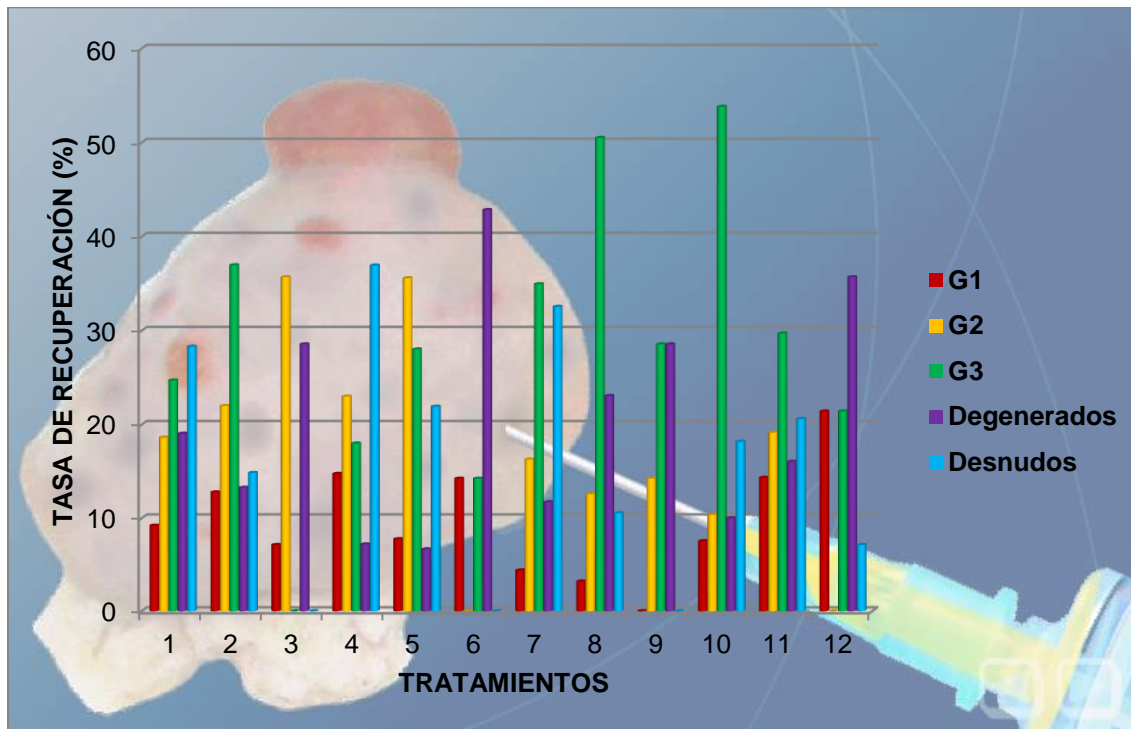
Al analizar los grados de calidad de ovocitos encontramos que en los grado 1 prácticamente no se apreciaron diferencias entre tratamientos, excepto en el tratamiento 9 y el tratamiento 11, donde hubo diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).

En el caso de los ovocitos grado 2 se encontró que los tratamientos (T1,T2,T3,T4,T5,T7,T8 y T11) difirieron entre sí ($P < 0.05$), con los tratamientos (T6,T9,T10 y T12).

Por otro lado al evaluar los ovocitos de grado 3, la gran mayoría de los tratamientos mostraron diferencias estadísticas entre sí. Lo mismo sucedió cuando se evaluaron los ovocitos de grado 4 (desnudos y degenerados), en la mayoría se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Sin embargo recordemos que estos datos no corresponden al comportamiento biológico observado, ya que este cuadro se realizó con la finalidad de mostrar las diferencias significativas entre los tratamientos, todo lo que se hace es comprimir los valores altos y expandir los pequeños obteneindo así una distribución normal de los datos de tal manera que se aplique el diseño experimental planteado. Por tal motivo solamente nos remitimos a expresar cuales tratamaientos diferían entre sí.

FIGURA 13. PORCENTAJE DE CALIDAD DE OVOCITOS POR TRATAMIENTO



Como se muestra en el gráfico uno, en la gran mayoría de los tratamientos se obtuvo un gran porcentaje de ovocitos grado 3, seguido de los degenerados, grado 2, desnudo y grado 1. En coincidencia con esta investigación; Solís (2012), encontraron una tendencia estadística a obtener mayor calidad de ovocitos grado 3.

Por su parte en un estudio realizado por Barcelar *et al.* (2010), en donde utilizaron una escala de clasificación muy similar a la nuestra, encontraron mayor cantidad de ovocitos de grado 3, seguido de los de categoría 2 y finalmente categoría 4 y 1, resultados comparables a los obtenidos en esta investigación.

5. CONCLUSIONES

- El diámetro de la aguja influye sobre la tasa de recuperación de los ovocitos, ofreciendo las agujas 18G los mejores resultados; en tanto, no parece tener mayor influencia sobre la calidad de los ovocitos.
- La presión de aspiración parece no influir sobre la calidad de los ovocitos recolectados; sin embargo, si se encontró diferencias en las tasas de recuperación siendo esta mejor cuando se aspiraron folículos <10 Ø.
- Los folículos <10 mm Ø, aportan un porcentaje de ovocitos aptos para FIV, superior a los de mayor tamaño (>10 mm Ø), con una tendencia a una mayor proporción de ovocitos grado 3 en todos los casos.

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Utilizar agujas 18 G para aspirar folículos de pequeño y mediano tamaño (2-10 mm Ø), lo cual nos permite obtener mayores tasas de recuperación. Las agujas 20G se deben utilizar para los folículos de mayor tamaño (>10 mm Ø).

- ✓ En cuanto a la presión de aspiración es recomendable utilizar presiones de 80 mmHg, lo cual nos permite obtener mayores tasas de recuperación con aceptables niveles de calidad en los ovocitos colectados.

- ✓ Estudiar distintas combinaciones de diámetro de aguja y presión de aspiración en función del tamaño de los folículos, a fin de lograr una interacción que permita la obtención de mejores resultados, tanto en la tasa de recuperación como en la calidad de los ovocitos colectados evaluando factores como raza o edad de los animales con miras a mejorar los procesos de OPU-FIV a nivel práctico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams G.P; Matteri R.L; Kastelic J.P; Ko J.C; Ginther O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94:177-188.

Adams G.P; Kot K; Smith C.A; Ginther O.J. 1993. Effect of a dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 73:267-275.

Adams G, Pierson R. 1995. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*, 43, 113-120.

Aerts J.M.J; Oste M; Bols, P.E.J. 2004. Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guide biopsy collection of the bovine ovary. *Proceedings of the 15th ICAR, Porto Seguro, Brasil, Abstract 2:* 435.

Aller J.F; N.C. Muccia; G.G. Kaisera; G. Ríosa; S.S. Callejas; R.H. Alberioa. 2009. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Animal Reproduction Science.* 19(2010): 1-18.

A.R. PETERS and PJH BALL *Reproduction in cattle - 1987 - 1994 Butter worths* – UK.

Argov N; Arav A; Sklan D. 2004. 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.

Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L., Leibfried, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 943-956.

Bacelar D; Constantino M; Padilha L; Barreiros T; M.M. Seneda. 2010. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. *Ciências Agrárias, Londrina*. 31(1):163-172.

Badtram G.A; Gaines J.D; Thomas C.B; Bosu W.T.K. 1991. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology*. 35: 1153-1167.

Bage; Renée; Petyim; Sudsaijai; Larsson; Birgitta; Hallap; Triin; Bergqvist; Ann-Sofi; Gustafsson; Hans; Rodríguez 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.

Ball P. J. H; Peters A. R. 2006. Reprodução em bovinos. 3. ed. São Paulo, Brasil: pp. 195-198

Banks W. J; 1991. Sistema reprodutor feminino. Histologia Veterinária Aplicada. 2ª ed., São Paulo. Brasil. Manole. Trad. Francisco Javier Hernandez Blazquez. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

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

Bellenda O.G.. 2003. La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo (en línea). Consultado 3 de dic. 2010. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/11-ecografia_aplicada.pdf.

Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*. 42: 895-907.

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. 2004. Utilização prévia do Pluset na aspiração follicular: impacto na produção in vitro de embriões em vacas *Bos indicus* . *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 186. (Abstract).

Blondin P and M –A Sirard (1995) Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes Mol Reprod Dev 41, 54-62.

Bo G.A. y Mapletoft R.J. 1999. Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones (en línea). Córdoba, Argentina. Consultado 14 de nov. 2013. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/01-control.htm.

Bo G. A. y Caccia M. 2000. Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino (en línea). Córdoba, Argentina. Consultado 14 de oct. 2013. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/39-ultrasonografia_reproductiva_en_bovino.htm.

Bo G.A; Medina M; Tegli J.C; Costamagna A; Brogliatti G.M. 2000. Fixed-time artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulate with estradiol benzoate or GnRH. En: Proc. 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Stockholm. Sweeden,. pp. 34-42.

Bo G.A. 2002. Dinámica folicular y tratamientos hormonales para la sincronizar la ovulación en el ganado bovino (en línea). Córdoba, Argentina. Consultado 24 de nov. 2013. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/grabielfofr.PDF.

Bols P.E.J; Van Soom A; Ysebaert M.T; Vandenheede J.M.M; Kruif, A. (1996a). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex

morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45: 1001-10014.

Bols PEJ, Van Soom A, A de Kruif (1996b) Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up (OP)techniek: geboorte van de eerste OPU kalveren in België (Use of transvaginal oocyte pick-up OPU calves born in Belgium) *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 86-91

Bols P.E.J; Ysebaert M.T; Van Soom A; Kruif A. 1997. Effects of needle tip level and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*. 47:1221-1236.

Bols P.E.J; Ysebaert M.T; Lein A; Coryn M; Van Soom A; de Kruif A. 1998. Effect of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during OPU-FIV program. *Theriogenology*. 49: 983-995.

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.

Bols P.E.J; Van Holder T; Leroy J.L.M.R; Van Soom A. 2004. Ultrasound-guided transvaginal injection of a low dose of FSH-LH into the bovine ovary as an alternative way to simulate follicular growth: preliminary result. *Reprod. Fert. Dev.* 16:230-231.

Bols P.E.J. 2005. Puncture of mature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Verhandelingen Van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Delgie LXVII*. 3: 177-202.

Bols P. E. J; Leroy J. L. M. R; Viana J. H. M. 2005b. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 103-118.

Bousquet D; Twagiramungu H; Durocher J; Barnes F.L; Sirard A. 2000. Effect of LH injection before ovum pick-up in vitro embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. En: 15th Scientific Meeting. *Theriogenology*. 53: 347 (Abstract).

Boyezuk D.A. 2007. Ecografía reproductiva: Precocidad diagnóstica en nuestros establecimientos ganaderos (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 3 de dic. 2010. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/18-precocidad.pdf.

Brad K. 1994. Clinical applications of bovine Reproductive Ultrasonography. *Food Animal*. 16 (8): 1085-1097.

Broadbent P.J; Dolman D.F; Watt R.G; Smith A.K; Franklin M.F. 1997. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology*. 45: 1027–1040.

Brogliatti G.M; de la Fuente J; Bergfelt D.R; Adams G.P. 1995. Ovarian dynamics subsequent to ultrasound-guide follicle ablation in calves. Proceeding of the 11th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association.

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.

Bukovsky A; Caudle M.R; Svetlikova M; Upadhyaya N.B. 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive biology and endocrinology* 2: 20-20.

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.

Buratini J.Jr; Teixeira A.B; Costa I.B; Glapinski V.F; Pinto M.G.L; Giometti I.C; Barros C.M; Cao M; Nicola ES; Price C.A. 2005. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*. 130: 343-50.

Burke C.R; Mussard M.L; Gasser C.L; Gram D.E; Day M.L. 2003. Estradiol benzoate delay new follicular wave emergence in a dose dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*. 60: 647-658.

Buxadê C. 1995. Zootecnia; Bases de la Producción Animal. Tomo I. Madrid, Esp. Mundi-Prensa Libros S.A. 306 p.

Byskov A.G. 1975. The role of rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *Journal of Reproduction and Fertility*. 45: 201-209.

Byskov A.G. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*. 66: 71-117.

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, Esp. 491 p.

Chaubal S.A; J A Molina; C L Ohlrichs; L B Ferre; D C Faber; P E J Bols; J W Riesen; X Tian; X Yang. 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.

Chen, S., Lien,Y.,Cheng,Y.,Chen,H.,Yang,Y.2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction*, 16:2350-2356. Consultado el 09 de enero de 2014.

Disponible en <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>

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.

Conti M; Andersen C.B; Richard F; Mehats C; Chun S.Y; Horner K; Jin C; Tsafirri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology*. 187: 153-159.

Cox N.M; 1997. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *Journal of Reproduction and fertility Supplement*, 52: 31-46.

Cruz F.B; Tondello Martins L; 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. *Ciências Agroveterinárias*. 8 (2): 184-187.

Curran S; Kastelic J.P; Guinther O.J. 1989. Determining sex of bovine fetus by ultrasonic assesment of the relative location of the genital tubercule. *Anim. Reprod. Sci*. 19: 17.

Dayan. A. 2010. Impacto de la aplicación de biotecnologías en la reproducción bovina: Aplicación de la técnica (en línea). Consultado el 17 de diciembre de 2012. Disponible en <http://www.cigal.biz/ponencias/impacto.html>.

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 Armas, R. 2007. Transferencia de embriones en el ganado bovino. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Chiriquí, Panamá. p. 45-48.

De la Riera D. 2004. La ecografía reproductiva, un campo en expansión. Frisona Española. 14: 102-110.

De la Sota L; Formía N; Lares S; Fernández G. 2003. Aplicaciones de la ultrasonografía en el manejo reproductivo de rodeos de carne y leche (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 3 de dic. 2010. Disponible en: http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Aplicacoes_ultrasonografia_manejo_carne_leite.pdf.

De Loos F; Van Vliet C; van Maurik P; Kruij, ThAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Research. 24: 197-204.

Demarque K.C; Rodrigues C.F.M; Nogueira L.A.G; Pinho T.G; Tortelly R. 2003. Histologic changes in ovaries of cows submitted to repeated follicular punctures. Acta Scientiae Veterinariae. 31: 315.

Denis R.G; Prado J.A; Puertas N; Fuentes D; Bernal A.S; Nuñez I; Torres A; Ruiz M; Cárdenas M. 2000. Introducción de la ultrasonografía en la reproducción animal. Manual. CIMA, La Habana, Cuba. pp 2-40.

Denis R.G. 2001. Dinámica y sincronización de las ondas foliculares a través de la punción guiada por ultrasonografía en vacas del genotipo Criollo. Tesis para la

opción al grado de Master en Ciencias de la Reproducción Animal. La Habana, Cuba. Universidad de la Habana.

Denis R.G; Lleretni R; Fuentes D.S; Lliteras E; Chong M.G; Bernal A.S; Hayes O; Maura R; Castro F.O; Digo E.L; González A.P. 2004. Producción de embriones bovinos a partir de ovocitos colectados por la técnica de punción folicular in vivo (Ovum pick-up). Rev. Cub. Reprod. Animal. 30(1): 91-98.

Denis R.G. 2006. Obtención de ovocitos por punción folicular in vivo (ovum pick-up) guiada por ultrasonografía en vacas del genotipo Siboney de Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. CIMA, 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.

Derivaux, J. 1980. O ciclo sexual dos mamíferos. Reprodução dos animais domésticos. Ed. Acribia. Trad. Dr. Renato Campanarut Barnabé.

De Roover R; Genicot G; Leonard S; Bols P; Dessy F. 2005. Ovum pick-up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. Anim. Reprod. Sci. 86:13-25.

De Ruigh L; Mullaart E; Van Wagtendonk-de, Leeuw A.M. 2000. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocytes and embryom yield. Theriogenology. 53: 349.

DesCôteaux L; Colloton J; Gnemmi G. 2010. Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Iowa, USA. Blackwell Publishing. 246 p.

Díaz T. 1999. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. Rev. Fac. Cien. Vet. UCV. 40(1): 3-18.

Dode, M. A. N.; Rumpf, R. 2002. Produção in vitro de embriões na espécie bovina. Palestra proferida na Embrapa Gado de Corte. Brasil.

Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnik JL, Brananan CO, Lock LF. 1991. Requirements for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. Nature, 352: 809-811.

Domínguez M.M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. Theriogenology. 43: 1405-1418.

Dominiko., First. Maturation of denuded bovine oocytes result in normal fertilization and development Biol Reprod. 44:353.

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.

Douar C. 1998. Effect de la composante maternelle sur le development in vitro de l'embryon bovin. *Maitrise Sciences Vétérinaires. Physiologie de la Reproduction*. Ecole Nationale Vétérinaire Maison-Alfort: 17-24.

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.

Durán F.R. 2007. *Volvamos al Campo. Manual del Ganadero Actual*. 2da edición. Colombia. pp 645-646.

Eddy E; Clark J; Gong D; Fenderson B. 1981. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Research*. 4: 333-362.

Eppig JJ.1979 A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cell- oocytes junctional contact maintained in vitro *J Exp Zoo* 209,345.

Eppig J. y O'Brien M. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology Reproduction*. 54: 197-207.

Evans A; Adams G.P; Rawlings N.C. 1992. Follicular waves and gonadotropins in 36 week old heifers. *Biology of Reproduction* 46(I): 323.

Evans A.C.O; Adams G.P; Rawlings N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod Fert.* 102: 463-470.

Fair T; Hyttel P; Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev.* 42:437-442.

Fernández A.T. 2003. Dinámica folicular: funcionamiento y regulación (en línea). Montevideo, Uruguay. Consultado 14 de nov. 2013. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.htm.

Findlay J.K. 1994. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reprod. Fertil Dev.* 6: 127-139.

Fissore R. A; Pashen R. L; Bondurant R. H. 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract II. No pregnant, pregnant, and pathological conditions of the uterus. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 167-177.

Fogwell R.L; J. L. Cowley; J. A. Wortman; N. K. Ames; J. J. Ireland. 1985. Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle. *Theriogenology* 23:389-398.

Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Oestrus cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.

Fortune J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicular growth of prenatal follicles. *Animal Reproduction Science*. 79: 135-163.

Frandsen R.D; Lee W.W; Dee Falls A. 2009. *Anatomy and physiology of farm animals*. 7a ed. Iowa, USA. Wiley-Blackwell. 533 p.

Fricke P.M. 2001. Manipulación de la Función ovárica (en línea). Wisconsin, USA. Consultado 14 de oct. De 2013. Disponible en: http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Reproducci%F3n/du_605.es.pdf.

Fricke P.M. 2004. Aplicaciones prácticas del ultrasonido para el manejo reproductivo en ganado lechero (en línea). Wisconsin, USA. Consultado 14 de Oct. de 2013. Disponible en: [www.wisc.edu/dysci/uwex/rep-phys/45pubs/ultrasound/502 spanish.pdf](http://www.wisc.edu/dysci/uwex/rep-phys/45pubs/ultrasound/502%20spanish.pdf).

Fry R.C; Simpson T.C; Squires T.J; Parr R.A; Damanik R.M. 1994. Factors affecting transvaginal oocytes pick-up in heifers. *Therionelogy*. 41: 197.

Galli C; Crotti G; Notari C; Turín P; Duchi R; Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Therionelogy*. 55: 1341-1357.

Garcia A. y Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasoundguided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development *Therionelogy* 50. 575–585.

Gardón J. 1999. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro. Tesis Doctoral. Cordoba. 135 p.

Gibbons, J.R, Beal, WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 1994. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*. 42: 405-419.

Gigli I; Russo A.; Agüero A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In. *Vet*. 8(1): 183-204.

Ginther O.J; J.P. Kastelic; L. Knopf. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci*. 20:187-200.

Ginther O.J; L. Knopf; J.P. Kastelic. 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycle with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, 87: 223-230.

Ginther O.J; L. Knopf J.P. Kastelic. 1989c. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod*. 41: 247-254.

Ginther O. J; Wiltbank M.C; Fricke P.M; Gibbons J.R; Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 55: 1187-1194.

Ginther O.J; K. Kot; L.J. Kulick; S. Martin; M.C. Wiltbank. 1996b. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 108: 271-279.

Ginther O.J; Beg M.A; Donadeu F.X; Bergfelt D.R. 2003 Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78: 239-257.

Gnemmi G. 2004. La ultrasonografía en ginecología buiátrica. *Rev. Taurus*. 3 (12): 26-32 y 4 (13): 22-30.

Gong J.G; Campbell B.K; Bramley T.A. Gutierrez C.G; Peters A.R; Webb R. 1996. Suppression in the secretion of follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously with a gonadotropin Releasing Hormone agonist. *Biol. Reprod.* 55: 68-74.

Goodman A. y Hodgen G.D. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research* 39:1-73.

Goodhand K.L; Watt R.G; Stainer M.E; Hutchinson J.S.M; Broadbent J.P. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*. 51: 951-961.

GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v. 51, p. 951-961, 1999.

Goodhand KL; Staines ME; Hutchinson JSM; Broadbent PJ. 2000. In vivo oocyte recovery and in vitro production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Anim Reprod Sci*, 63:145-158.

Gordon I. 1996. *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. Dublin, Ireland. CAB International. 523 p.

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.

Hanzen C. y Laurent Y. 1991. Application of ultrasonography in pregnancy diagnosis and evaluation of embryonic mortality rate in cattle. *Annales de Medecine Veterinaire.* 135: 481-487.

Hasler J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 75: 139-168.

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.

Hawk, H.W., Wall, R.J., 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41 (8), 1571–1583.

Hazeleger N.L; Hill D.G; Stubbings R.B; Walton J.S. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 43: 509-522.

Henao R.G y Trujillo E.L. 2000. Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 13 (2): 108-120.

Hendriksen P.J.M. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocyte. *Theriogenology*. 61: 909-920.

Heyman, I., Chavatte-Palmer, Pascale, LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X., Renard, J.P. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology or Reproduction*. 66: 6-13.

Hirao, Y.N. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Reprod. Fert* 100: 333-339.

Holly L. 1987. *Biología de la Reproducción Bovina: Introducción al proceso de examen de la fertilidad de la hembra y el macho*. La Habana, Cuba. Editorial Científico-Técnica. 344 p.

Hopper H.W; Silcox R.W; Byerley D.J; Kiser T.E. 1993. Follicular development in prepubertal heifers. *Animal Reproduction Science* 31: 7-12.

Hosoe M and Y Shioya (1997) Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex *Zigote* 5, 371-376.

Hyttel P, T Greve and H Callesen (1989) Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle J Reprod Fert 38, 35-47.

Imai K; Kobayashy S; Tsujino T; Shin-noh M; Goto G; Kaneyama K; Kojima T. 2000. Effect of the frequency of ovum pick-up intervals on follicle number, oocyte recovery and embryo production rates in cattle. Theriogenology. 53: 359-361.

Jamnongjit M. y Hammes S.R. 2005. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. Seminars in reproductive medicine. 23: 234-241.

Katska L; Smorag Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. Anim. Reprod. Sci. 7: 451-460.

Kelly S.J. 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. The journal of experimental zoology. 200: 365-376.

Kezele P; Nilsson E; Skinner M. 2002. Cell-cell interactions in primordial follicles assembly and development. Frontiers in bioscience. A journal and virtual library. 7: 1990-1996.

Kimball F.A. y Hansel W. 1974. Estrogen cytosol binding proteins in bovine endometrium and corpus luteum. Biol Reprod. 11: 566-577.

Kruip, T.; Boni, R.; Wurt, Y.; Roelfsen, M. and Pieterse, M. 1994. Potencial use of Ovum Pick-up for embryo production and breeding in cattle. Teriogenology 42:675-684.

Leifried,L.,First,N 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.J Anim. Sc 48:76-83.

Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., First, N. L. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.

Lenz S, Leeton J, P Renou (1987) Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound J In Vitro Fertil Embryo Transfer 4, 51-55.

Leroy J.L.M.R. 2004. Metabolic Changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology. 62:131-1143.

Lonergan,P.,Vergos, E., Kinis,A.,Sharif,H., Gordon,I. 1991. The effect of recovery method o the type of bovine oocytes obtained for IVM.Theriogenology,35:231.

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; Neysy; Nuñez; Ismary; Montes; Ineyda; 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. 45:292 (abstract).

Lorton SF, NL First (1979) Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. Biol Reprod 21, 301–308.

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.

Lussier J.G; Matton P; Guilbault L.A; Grasso F; Mapletoft R.J; Carruthers T.D. 1994. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular fluid treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fert.* 102: 95-105.

Machatkova, M.; Krausova, K.; Jokesova, E.; Tomanek, M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology.* 61(2-3): 329-335.

Madison V, Avery B and T Greve (1992) Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro *Anim Reprod Sci* 27, 1-1.

Magalhães, D.M.; Fernandes, D.D.; Araujo, V.R.; Almeida, A.P.; Matos, M.H.T.; Figueiredo, J.R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2009; 33(4):171-182.

Maillard S; H Quinton; J Lauffenburger; N Cordonnier-Lefort, C Richard, J Marchal, P Mormede, and JP Renard. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. 125: 555-563.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, DeLeon V, Sanchez S, Pronovost SM. 1993. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role of the c-kit receptro in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Development Biology*, 157: 85-89.

Manual Merck De Veterinária. 2001. Editor Susan E. Aiello, Editor associado Asa Mays; [tradução Paulo Marcos Agria de Oliveira]. 8 ed. São Paulo: Roca.

Mapletoft K.R.J; M.F. Martínez; M.G. Colazo; Kastelic J.P. 2003. The use of controlled internal drug release device for the regulation of bovine reproduction. *J. Anim. Sci.* 81: 28-36.

Marín P.C; Rodríguez A; Dorado M.J; Hidalgo P.M; Corral P.S; Sanz P.J. 2002. Utilidad del perfil de progesterona plasmática y ecografía en el diagnóstico de quistes ováricos en vacas repetidoras de celos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 15(1): 51-62.

Marquant-Le G.B; Gerard B; Solari A; Thibault C. 1989. In vitro culture of bovine eggs fertilized either in vivo or in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 29: 559-568.

Martin T.L; Fogwell R.L; Ireland J.J. 1991. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 44: 693-700.

Martínez M.F; Colazo M.G; Kastelic J.P; Mapletoft R.J. 2003. Effect of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated. *Theriogenology.* 59: 224.

MARTINEZ, I.N. & SOUZA, L.C. Transferência de Embrião e Fertilização “in vitro” (FIV) em Bovinos. 2007. 88 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Produção e Reprodução em Bovinos) – Universidade Castelo Branco – Centro de Ciências Agrárias, Rio de Janeiro, 2007.

Masui Y. 1991. The role of cytotstatic factor (CSF) in the control of oocyte cell cycle-a summary of 20 years study. *Development Growth and Differentiation*, 33: 543-551.

McDougall S; C.R. Burke; K.L. Macmillan; N.B. Williamson. 1995. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Res. Vet. Sci.* 58: 212-216.

McGee E; Hsueh A. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews.* 21: 200-214.

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 fertilisation. *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 comercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology.* 59: 651-674.

Monget P; y Monniaux D. 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility.* 49: 321-333.

Motlik J, Pavlok A, Lapathitis G and M Kubelka (2000) Impact of two-step in vitro culture systems on developmental potency of oocytes *Rep Dom Anim* 35, 267-271.

Murakami M; Pérez O; Fergunson E; Behboodi E; Denniston R.S; Godke R.A. 2003. Use of in vivo-recovered oocytes and adult somatic cells from the same donor for nuclear transfer in cattle. *Vet Rec.* 153: 713-714.

Murphy B.D; Pescador N. 1996. Biología celular de la Foliculogénesis bovina. II Simposio Internacional de Reproducción Animal. Resúmenes. Córdoba, Argentina. 31 octubre-2 noviembre. pp 1-11.

Murphy M.G; W.J. Enright; M. A. Crowe; K. McConnell; L. J. Spicer; M. P. Boland; J. F. Roche. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 92: 333-338.

Nagano M, Katagiri S and Y Takahashi (2006) Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential *Zygote* 14, 53-61.

Nava H. y Hernández H. 2005. Aspiración folicular transvaginal (en línea). Maracaibo, V. Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Consultado 03 enero. 2014. Disponible en http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion8/articulo3-s8.pdf.

Nava. H, Hernández. H. 2009. Aspiración folicular (OPU): técnica (en línea). Consultado el 18 de diciembre de 2012. Disponible en <http://revistageneticabovina.com/#/aspiracion-folicular>.

Nibart M; Marquant-Le G.B. 1995. Production d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elevage et Insémination*. 266: 1-23.

Nibart M; Silva-Pleixer M; Thuard J.M; Durand M; Guyader-Joly C; Ponchon S; Marquant-Le G.B; Humblot P. 1995. Production d'embryons chez les bovins par fécondation et culture *in vitro* d'ovocytes collectés sous échographie. *Renc. Rech. Ruminants*. 2:399-402.

Noakes D.E; Parkinson T.J; England C.W. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Editorial Elsevier. 8 ed. 868 p.

Osaki,S.,Matsumura,K.,Yamamoto,K.,Miyano,T.,MiyakeM.,Kato,S.1997.
fertilization of bovine oocytes grown *in vitro*. *Reprod Fert Devel*. 9: 781-787.

Ospina J. y Aldama H. 1995. *Enciclopedia Agropecuaria, Producción Pecuaria*. Ed. Terranova editores. Bogotá, Colombia. p-p 74-78.

Palma G.A. 2001. *Biología de la Reproducción*. Balcarce, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 701 p.

Palma G.A. 2008. *Biología de la Reproducción*. 2a Ed. Córdoba, Argentina. Mar de la Plata. 669 p.

Pangas S.A; Choy Y; Ballou D.J; Zhao Y; Westphal H; Matzuk M.M y Rajkovic A. 2006. Oogenesis required germ cells-specific transcriptional regulators *Sohlh* and *Lhx8*. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 8090-8095.

Paul J.B; Looney C.R; Lindsey B.R; Godke R.A. 1995. Gonadotrophin stimulation of cattle donors at oestrus of transvaginal oocyte collection. *Theriogenology* 43:294-297.

Pedroso R; Roller F. 1999. Manual de procedimiento para la ISE y resincronización para mejorar la fertilidad de las hembras bovinas. La Habana : CIMA. p. 1-45.

Perea F.G. 2005. Manual de Ganadería Doble Propósito. Ecografía Reproductiva. Trujillo, Venezuela. pp 602-606.

Peters K.E; Bergfeld E.G; Cupp A.S; Kojima F.N; Mariscal V; Sanchez T; Wehrman M.E; Grotjan H.E; Hamernik D.L; Kittok R; Kinder J.E. 1994. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biology of Reproduction* 51: 1248-1254.

Petyim 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. *J. Vet. Med.* 48: 49-63.

Petyim S; Bage R; Hallap T; Bergqvist A.S; Rodriguez-Martinez H; Larsson B. 2003. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*. 60: 175–188.

Picton H.M; Harris S.E; Muruvi W; Chambers E.L. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction England*. 136: 703-715.

Pierre M; Martínez B; Méndez M.J. 1997. Uso de la ecografía en la reproducción del ganado vacuno. Frisona Española -Temario del Criador- Ene-Feb. pp 114-118.

Pierson R.A. y Ginther O.J. 1986. Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. *Theriogenology*. 26(5): 649-659.

Pierson R.A; Bo G.A; Adams G. P. 1993. Uso de la ultrasonografía para el estudio de los eventos reproductivos en el bovino. Simposio Internacional de Reproducción Animal. Resúmenes, 22 - 24 oct. Córdoba, Argentina. p. 10.

Pieterse M.C; Kappen K.A; Kruip ThAM; Taverne M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.

Pieterse M.C. 1989. Ultrasonic characteristics of physiological structures on bovine ovaries. en: M.A.M. Taverne y A. H. Willemse. *Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 37-51.

Pieterse M.C; Vos P.L.A.M; Kruip Th.A.M; Wurth Y.A.; van Beneden Th.H; Willemse A.H; Taverne M.A.M. 1991. Transvaginal Ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 35: 19-24.

Pieterse M.C; Vos P.L.A.M; Kruip Th.A.M; Wurth Y.A; Van Beneden Th.H; Willemse A.H; Taverne M.A.M. 1992 .Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG treated cows. *Theriogenology*. 37: 273 (abstract).

Price C.A; R. Webb. 1989. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 86: 303-308.

Quintela L.A; Días C; Garcia P; Peña A; Becerra J.J. 2006. *Ecografía y reproducción en la vaca*. Santiago de Compostela, España. Universidad de Santiago de Compostela. 92 p.

Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. 1972. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Development Dynamics.* 194: 177-192.

Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinologica*, 34, 1-68.

Rajamahendran R; Ambrose D; Burton B. 1994. Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction : a review. *Can. Vet.* 35: 563-572.

Ramos A.A; A.M. Ferreira; W.F. Sá; L.S.A. Camargo; J.H.M. Viana; M.R.J.M. Henry. 2006. Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 58(3): 341-347.

Rath D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer News.* 11: 10-15.

Reinders J.M.C; Van Wagtendonck-deLeeuw A.M. 1996. Improvement of a MOET program by addition of in vitro production of embryos after ovum pick-up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*. 45: 354(abstract).

Roa N. y Castillo E. 2006. Ultrasonografía: Uso en la reproducción del bovino doble propósito (en línea). Aragua, Venezuela. Consultado 14 oct. 2013. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%208/08roa_n.pdf.

Rodriguez P; Limback D; McGinnis L.K; Plancha C.E; Albertini D.F. 2008. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *Journal of Cellular Physiology*.

Roller F. 2006. Inducción, sincronización y resincronización del celo en hembras bovinas mestizas Holstein x Cebú para optimizar los programas de inseminación artificial. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba. CIMA. 105 p.

Roschlau K; Kuwer A; Roschlau D; Kuhnt C; Johanning S; Poppe P; Michaelis U; Dexne U. 2003. OPU and IVP increase the efficiency of embryo transfer programmes in the bovine: five years practical experiences. *Association Europeenne de Transfert Embryonnaire. A.E.T.E Newsletter*. 18: 2-3.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. *R. Bras. Zootec.*, v.36, suplemento especial, p.229-233, 2007.

Ruperez R. 1997. Diagnóstico del sexo fetal por ecografía en la vaca. *Albéitar*. 9: 17-18.

Sato, E., Matsuo, M., Miyamoto, H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocyte in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 1. *J. Anim. Sci.* 68:1182-7.

Sasamoto Y; Sakaguchi M; Katagiri S; Yamada Y; Takashashi Y. 2003. The effects of Twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum Pick-up in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 1083-1086.

Sathananthan A.H; Selvaraj K; Girijashankar M.L; Ganesh V; Selvaraj P; Trounson A.O. 2006. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy research and technique.* 69: 396-407.

Sauvé R. 1998. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS.* 26(1): 141-155.

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.

Savio J.D; Boland M.P; Roche J.F. 1990. Developmental of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 88: 581-591.

Savio J.D; Thatcher W.W; Badinga L; de la Sota R.L; Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 197-203.

Schellander K.E.A. 1989. In vitro fertilisation of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*. 31: 927-33.

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. *Vet. Rec.* 134: 440-443.

Seneda, M.M. 1999. Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultrasonografia. Efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do oócito para o desenvolvimento in vitro. 1999. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 57 p., UNESP, Jaboticabal.

Seneda M.M; Esper C.R; Garcia J.M; Vantini R; Oliveira J.A. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*. 67: 37-43.

Seneda M.M; Esper C.R; Garcia J.M; Andrade E.R. 2002. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção oócitos bovinos: Revisão de literatura. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 23(1): 101-110.

Seneda MM & Blaschi W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. p.231-237, 2004.

Seneda M.M; da Silva F.K; Max C.M; Gomes G.E; Lisboa L.A; J. Pontes. 2008. Folículogénesis en Bovinos (en línea). Londrina, Paraná, Brasil. Consultado 12 de oct. 2013. Disponible en: http://invitrobrasil.com/pdf/pesquisa/15-Seneda_MM_et_al_2.pdf.

Seneda, M.M., Godmann, M., Murphy, B.D., Kimmins, S., Bordignon, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction* 2008; 135:829-38.

Seneda M.M; da Silva F.K; Max M.C; Gomes G.R; Lisboa A.L; Pontes J.H. 2009. Aspiración de ovocitos por ultrasonografía transvaginal y producción de embriones (en línea). Londrina, Paraná, Brasil. Consultado 12 de oct. 2013. Disponible en: http://www.invitrobrasil.com.br/pdf/pesquisa/14-Seneda_MM_et_al_1.pdf

Silvia W.J. 1999. The role of uterine and ovarianhormone in luteolysis: a comparison among species. *Reprod Domest Anim.* 34: 317-378.

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: 312.

Sinowatz F; Kollé S; Petersen E. 2001. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells, tissues, organs*. 168: 24-35.

Sirois J; J.E. Fortune. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39:308-317.

Sirois J; J.E. Fortune. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-925.

Solís C.A. 2006. Estudio de la dinámica folicular mediante ultrasonografía en novillas Simental por Brahman F1. Tesis Licenciatura. Chiriquí Panamá. Universidad de Panamá. 156 p.

Solís. A; Guerra. R; Sandoya. G; De Arma. R. 2012. Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman (en línea) Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro de Investigaciones en Biotecnologías Agropecuarias. Consultado el 28 de diciembre de 2013. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101012/101210.pdf>.

Sorensen A. 1982. Reproducción Animal: Principios y Prácticas. Trad. R.E. Mata. McGraw-Hill. 539 p.

Sorensen R; Cyert M; Pedersen R. 1985. Activa maturation promoting factor is present in mature mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*, 100: 1637-1640.

Stock A.E; J.E. Fortune. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108-1114.

Stubbins R.B; Walton J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamic in Holstein cows. *Theriogenology*. 43: 713-721.

Sunderland S.J; Crowe M.A; Boland M.B; Roche J.F; Ireland J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal Reproduction and Fertility*. 101:547-555.

Suzumori N; Yan C; Matzuk M.M; Rajkovic A. 2002. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of development* 111: 137-141.

Tamayo T.M. 2000. La ecografía como medio diagnóstico y evaluación de los procesos reproductivos en el bovino (en línea). La Habana, Cuba. Consultado 16 oct. 2013. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/36-ecografia_reproduccion.pdf.

Taneja M. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol. Reprod*. 62: 206-213.

Taylor C; R. Rajamahendran. 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71: 61-68.

Thanghe S; Van Soom A; Nauwynck H; Coryn M; Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 414-424.

Thatcher W.W; K.L. Macmillan; P.J. Hansen; M. Drost. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*. 31: 149-164.

Thatcher W.W; M.A. Driancourt; M. Terqui; L. Badinga. 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. *Dom. Anim. Endocrinol*. 8: 223-234.

Totzauer I; Kolle S; Sinowatz F; Plendl J; Amselgruber W; Petersen E. 1998. Localization of the zona glycoprotein ZPB (ZP3 Alpha) and ZPC (ZP3 Beta) in the bovine ovary during pre and postnatal development. *Annals of Anatomy*. 180: 37-43.

Tsai S.J. y Wiltbank M.C. 1998. Prostaglandin F₂alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod*. 58(2): 346-52.

Turzillo A.M. y Fortune J.E. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 89: 643-653.

Van Der Schans A; Van Der Westerlaken L.A; Eyestone W.H; Boer M.A. 1991. ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*. 35: 288(abstract).

Van Soom A; Thange S; De Pauw I; Maes D; de Kruif A. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction en domestic animals*. 37: 144-151.

Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M; Aerts B.J.G; Den Daas J.H.G. 1998. Abnormal offspring following in vitro production of bovine pre-implantation embryos: a field study. *Theriogenology*. 49: 883-894.

Velasquez D.J. y Mendieta M.E. 2005. Factores que regulan el desarrollo folicular II: (en línea). UAM-Iztapalapa. DF, México. Consultado 12 nov. 2013. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros98/folicular.htm>.

Viana J.H.M; Ferreira A. M; Sá W.F; Júnior A. P. 2001. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular e fertilização in vitro no Estado de. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. Minas Gerais, Brasil.

Viana J.H.M; Camargo L.S.A; Ferreira A.M; Sá W.F; Fernandes C.A.C; Araújo M.C.C; Ramos A.A; Marques Jr. A.P. 2002. Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology*. 57: 630.

Viana J.H.M; Ferreira A.M; Camargo L.S.A; Sá W.F; Fernandes C.A.C; Marques Júnior A.P. 2003. Efeito da pré-estimulação ovariana sobre características de oócitos após punção folicular em bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55(1): 68-74.

Viana J.H.M; Nascimento A.A; Pinheiro N.L; Ferreira A.M; Camargo L.S.A; Sá W.F; Marques Jr. A.P. 2003b. Caracterização de sequêlas subseqüentes à punção folicular em bovinos. *Pesquisa Vet. Bras.* 23(3): 119-124.

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.

Viana, J.H.M. & Bols, P.E.J. Variáveis Biológicas Associadas a Recuperação de Complexos Cumulus-oócito por Aspiração Folicular. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33 (Supl 1), p. 1-4. 2005.

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 times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. *Theriogenology*. 41: 29-840.

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.

Wassarman P.M; Letourneau G. 1976. RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature*. 361: 73-74.

Wassarman P.M; Albertini D.F. 1994. The mammalian ovum. In-. KNOBIL, E. NEIL, J. D. (Ed.). *The Physiology of reproduction*. New York, Raven Press. pp 79 – 122.

Watson E.D; Bae S.E; Thomassen R; Thomson S.R; Woad K; Armstrong D.G. 2004. Insulin-like growth factors-1 and -2 and Insulin-like growth factor-binding protein-2 indominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction* 128(3): 321-9.

Webb R, Garnsworthy P, Gong J, Armstrong D. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, 82, 63-74.

Wiltbank M.C; Diskin M.G; Niswender G.D. 1991. Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum. *Journal of reproduction and fertility* 43: 65-75.

Xu Z.Z; Garverick H.A; Smith G.W; Smith M.F; Hamilton S.A; Youngquist R.S., 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone

receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*. 53: 951-957.

Yang X.Y; Zhao J.G; Li H.W; Li H; Liu H.F; Huang S.Z; Zeng Y.T; Huang S.Z. 2005. Holstein-Chinese yellow hybrid recipient oocytes recovered by ovum pickup. can improve the development of cloned bovine embryos 2005. *Reproduction Fertility and Development*. 2002: 2001-2006.

Younis, A. I., Brackett, B. G., Fayrer-Hosken, R. A. 1998. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res*. 23:189–20.

Zeitoun M.M; Rodriguez H.F; Randel R.D. 1996. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology*. 45: 1577-1581.