



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**“EFECTO DE LA ABLACIÓN FOLICULAR Y LA
ESTIMULACIÓN HORMONAL SOBRE LA TASA DE
RECUPERACIÓN DE OVOCITOS ASPIRADOS POR
ULTRASONOGRAFÍA TRANSVAGINAL GUIADA EN VACAS
BROWN SWISS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ARNALDO COLQUE CONDORI

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2019



DEDICATORIA

*A Dios, por brindarme vitalidad y sabiduría para lograr mis objetivos. A mis amados padres, **Andres Colque Sencia y Julia Condori Mamani**, por darme la vida, valores, principios, por la motivación constante que supieron encaminarme en mi desarrollo personal y profesional.*

*A mis queridos hermanos **Fredy Colque condori, Daniela, Valery y Joel**. De quienes aprendí aciertos y fueron el apoyo incondicional en el duro trajín de la vida*

*A mis apreciados amigos **Dalia, Sandra, Gloria, Tomas** con quienes compartí la vida estudiantil, además al **Dr. Hugo Deza Calsin, M.V.Z Japhet Zapana Pineda, M.V.Z Rasiel Macedo Sucari y M.V.Z Estephani Mamani sergo**, en donde confiaron en mi capacidad y responsabilidad de asumir retos para concretarlos según lo planeado.*



AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme formado profesional, por lo cual orgullosamente llevaré en alto su nombre.

Al Laboratorio de Biotecnología del CE Chuquibambilla, de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia - UNA –Puno, por el apoyo en el uso de animales y equipos para el presente trabajo de investigación.

Reconocimiento singular al D.Sc. Manuel Guido Pérez Durand, por facilitarme las herramientas, sabiduría, soporte, su paciencia, sugerencia, quien ha corregido minuciosamente el presente trabajo y me ha dado la posibilidad de mejorarlo.

A los docentes miembros del jurado: Dr. Roberto Gallegos Acero, M.Sc. Jose Luis Malaga Pumarica y D.Sc. Natalio Luque Mamani, agradecerles por su paciencia y esmero en las sugerencias en el desarrollo de la tesis.

El presente trabajo de investigación es un esfuerzo en el cual directa o indirectamente participaron personajes contribuyendo en diferentes aspectos, con el único fin de concretarlo en forma satisfactoria; a todos ellos quedo infinitamente agradecido.

ARNALDO COLQUE CONDORI



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE ACRONIMOS

RESUMEN10

ABSTRACT11

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN14

1.1.1. Objetivo General.....14

1.1.2. Objetivos Específicos.....14

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES15

2.2. MARCO TEORICO18

2.2.1. Desarrollo Folicular o Foliculogénesis.18

2.2.2. Dinámica Folicular19

2.2.3. Fases del Desarrollo de la Dinámica Folicular.....20

2.2.3.1. Reclutamiento Folicular Primario20

2.2.3.2. Selección Folicular21

2.2.3.3. Dominancia Folicular del Ovario.....22

2.2.4. Ovogénesis.23

2.2.5. Control de la Dinámica Folicular23

2.2.5.1. Ablación Folicular.....24

2.2.5.2. Tratamientos Hormonales.....25

2.2.6. Uso de la Ecografía en Reproducción Animal25

2.2.7. Sincronización de la Emergencia de la Onda Folicular26

2.2.8. Tratamientos Superovulatorios.....28

2.2.9. Tratamiento con Progestágenos.....30



2.2.10. Aplicaciones de la Técnica de OPU (Ovum Pick-Up).....	32
2.2.10.1. Aspiración Folicular	32
2.2.10.2. Clasificación de Ovocitos	34
2.2.11. Factores que Inciden en los Resultados de la Técnica De OPU.....	34
2.2.12. Factores Técnicos que Influyen en los Resultados de OPU	35

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.	37
3.4. METODOLOGÍA.	39
3.5. PREPARACIÓN DE ANIMALES PARA LA ASPIRACIÓN FOLICULAR.	43
3.6. EVALUACIÓN DE LOS OVARIOS POR ULTRASONOGRAFÍA	43
3.9. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS.....	44
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	45

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TAMAÑO DE FOLÍCULOS SEGÚN TRATAMIENTO	47
4.2. NUMERO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.	49
4.3. EL NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS MEDIANTE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR.....	52
4.4. CALIDAD DE OVOCITOS RECUPERADOS MEDIANTE ASPIRACIÓN FOLICULAR	55
V. CONCLUSIONES	60
VI. RECOMENDACIONES	61
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	75

Área: Reproducción animal

Tema: Evaluación folicular en vacas Brown Swiss

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 23 de diciembre de 2019



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Sincronización de la dinámica folicular, con dosis de prostaglandina F2 α	79
Figura 2 Colocación del implante de progesterona intravaginal (día 0).	79
Figura 3 Aplicación del Benzoato de estradiol.	80
Figura 4 Administración de eCG (Novormon) al día 4 del tratamiento.....	80
Figura 5 Extracción de los DIV y sujeción de la vaca en un brete.	81
Figura 6 Administración de la anestesia epidural	81
Figura 7 Limpieza y desinfección de la región perianal y vulva	82
Figura 8 Armado del transductor OPU.....	82
Figura 9 Introducción del aspirador dentro de la vagina.....	83
Figura 10 Visualización de los folículos y medición.	83
Figura 11 Bomba de vacío a una presión de 75 mm Hg.	84
Figura 12 Tubo colector	84
Figura 13 Lavado de las paredes del filtro EMCON con PBS.	85
Figura 14 Placa Petri conteniendo la solución de PBS más ovocitos aspirados.....	85
Figura 15 Observación en microscopio con un aumento de 40X a los ovocitos	86
Figura 16 Ovocito de grado 2	86
Figura 17 Ovocito de grado 1	87
Figura 18 Ovocitos de grado 3 y 4.....	87
Figura 19 Ovocitos de grado 4 (desnudado).....	87



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de unidades experimentales (vacas Brown Swiss).	39
Tabla 2 Protocolo de sincronización de la dinámica folicular, del grupo control.....	40
Tabla 3 Protocolo de superestimacion hormonal.....	41
Tabla 4 Protocolo de sincronización de la dinámica folicular, con ablación.....	42
Tabla 5 Protocolo de superestimacion hormonal en combinación con ablación.	42
Tabla 6 Tamaño de folículos observados en los grupos de tratamientos (n=12).....	47
Tabla 7 Numero de folículos visualizados en vacas Brown Swiss por tratamiento.....	49
Tabla 8 Número de ovocitos recuperados mediante OPU en vacas Brown Swiss (n=12)	52
Tabla 9 Número de ovocitos obtenidos según calidad, recuperados por OPU.....	55
Tabla 10 Formato de aspiración folicular en vacas.....	75
Tabla 11 Datos obtenidos del grupo 2 (con hormona), tamaño folicular y número de ovocitos.	76
Tabla 12 Datos obtenidos del grupo 4 (con hormona + ablación) tamaño folicular y número de ovocitos.	76
Tabla 13 Datos obtenidos del grupo 1 (control), tamaño de folicular y cantidad de ovocitos....	77
Tabla 14 Datos obtenidos del grupo 3 (ablación), tamaño folicular y cantidad de ovocito.....	77
Tabla 15 Número de ovocitos.....	78
Tabla 16 Resumen de los tratamientos y resultados de las aspiraciones.....	78



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Clasificación por calidad de ovocitos; categorías de Complejo Cumulus Ovocito (COCs)	45
Cuadro 2 ANVA para número de folículos.....	88
Cuadro 3 ANVA para número de ovócito.....	88
Cuadro 4 Calidad de Ovocitos.....	88
Cuadro 5 Conversión de valores porcentuales a valores angulares para tasa de recuperación de ovocitos.	88



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

OPU	: Ovum pick up
COCs	: Ovocito-cumulos
eCG	: Gonadotropina coriónica equina
FSH	: Hormona folículo estimulante
LH	: Hormona Luteinizante
PGF2	: Prostaglandina f2
P4	: Progesterona
VE	: Valerato de estradiol
BE	: Benzoato de estradiol
SFB	: Suero Fetal Bovino
PBS	: Solución Buffer Fosfatada
IGFBP	: Factores de crecimiento ligados a la insulina y sus proteínas de enlace
CIDR	: Dispositivo de progesterona
DCA	: Diseño Completamente al Azar
FVI	: Fecundación in vitro



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el CE Chuquibambilla en el laboratorio de biotecnología animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNA - Puno. Teniendo como objetivo evaluar el efecto de la ablación folicular y la estimulación hormonal ovárica sobre la tasa de recuperación de ovocitos aspirados por ultrasonografía guiada en vacas Brown Swiss. Se utilizaron 12 vacas Brown Swiss, con edad de 4 a 10 años, las cuales se sometieron a la aspiración folicular que se realizó por ultrasonografía guiada (ovum pick-up). Se dividieron en 4 grupos (T0) n=3 con dos dosis de prostaglandinas. (T1) n=3 con implante de progesterona intravaginal más 2 mL de benzoato de estradiol y se aplicó 1600UI de eCG, Grupo (T2) se suministró dos dosis de prostaglandina, al día 13 se sometieron a una ablación folicular Grupo (T3) n=3 con implante de progesterona intravaginal, al día 2 se realizó la ablación folicular y se aplicó 1600UI de eCG, 8 días después se sometieron a la aspiración folicular. Los resultados indican que no hubo efecto por estimulación hormonal ($p > 0.05$) sobre el número de folículos (7.00 ± 3.00) y número de ovocitos (3.00 ± 2.65), igual resultado se observó para (T3) ($p > 0.05$) en número de folículos (6.83 ± 4.20) y número de ovocitos (1.67 ± 1.15) respecto al grupo 1 en el número de ovocitos (1.70 ± 1.15) y número de folículos (9.33 ± 5.04), en cuanto a la calidad de ovocitos para grupo 2, grado 1 (33.3%), grado 2 (11.1%) y grado 3 (55.6%), para el grupo 3 fue de grado 1 (40%), grado 2 (20%) y grado 3 (40%); y el grupo 1, fueron de grado 1 (50%), grado 4 (50%). Se concluye que el efecto de la ablación folicular no muestra un mayor número de folículos, la calidad de ovocitos fue superior, mientras que para la estimulación hormonal fue superior en cuanto a número de folículos observados, las calidades de ovocitos obtenidos fueron de diferentes grados.

Palabras Clave: Ablación, Brown Swiss, eCG, Ovocitos, ovum pick-up.



ABSTRACT

This research work was carried out at the Chuquibambilla CE in the animal biotechnology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics UNA - Puno. With the objective of evaluating the effect of follicular ablation and ovarian hormonal stimulation on the recovery rate of oocytes aspirated by guided ultrasonography in Brown Swiss cows. Twelve Brown Swiss cows were used, aged 4 to 10 years, who underwent follicular aspiration performed by guided ultrasonography (ovum pick-up). They were divided into 4 groups (T0) $n = 3$ with two doses of prostaglandins. (T1) $n = 3$ with intravaginal progesterone implant plus 2 mL of estradiol benzoate and 1600UI of eCG was applied, Group (T2) two doses of prostaglandin were supplied, at day 13 they underwent follicular ablation Group (T3) $n = 3$ with intravaginal progesterone implant, at day 2 follicular ablation was performed and 1600UI of eCG was applied, 8 days later they underwent follicular aspiration. The results indicate that there was no effect by hormonal stimulation ($p > 0.05$) on the number of follicles (7.00 ± 3.00) and number of oocytes (3.00 ± 2.65), the same result was observed for (T3) ($p > 0.05$) in number of follicles (6.83 ± 4.20) and number of oocytes (1.67 ± 1.15) with respect to group 1 in the number of oocytes (1.70 ± 1.15) and number of follicles (9.33 ± 5.04), in terms of oocyte quality for group 2, grade 1 (33.3%), grade 2 (11.1%) and grade 3 (55.6%), for group 3 it was grade 1 (40%), grade 2 (20%) and grade 3 (40%); and group 1, were grade 1 (50%), grade 4 (50%). It is concluded that the effect of follicular ablation does not show a greater number of follicles, the quality of oocytes was higher, while for hormonal stimulation it was higher in terms of number of follicles observed, the qualities of oocytes obtained were of different degrees.

Keywords: Ablation, Brown Swiss, eCG, Oocytes, egg collection.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En vacunos lecheros de la raza Brown Swiss del altiplano, es difícil la elección de la mejor alternativa para estimular el creciente folicular, ya sea hormonal o con la ablación folicular, así con la ayuda de la técnica del OPU, se pueda obtener ovocitos de buena calidad y a la vez saber la procedencia de la misma.

Si no se prueba o se comprueba la calidad de ovocitos obtenidos por OPU, entonces se hará mediante la fecundación de estos ovocitos y así tener nacimiento de terneros para que se evalué la calidad de ovocitos.

En la actualidad muchos de los ovocitos recolectados para la producción *in vitro* de embriones se originaban de solo hembras sacrificadas en camal, teniendo limitaciones que no permiten ser reproducidos, reduciendo la producción de embriones donde está limitada la descendencia de hembras de alto valor genético (Denis, 2008). Frente a este problema el presente trabajo pretende buscar e incentivar la técnica de OPU donde es una técnica óptima para aumentar el número y mejorar la calidad de ovocitos colectados, de forma más estable a partir de animales seleccionados y controlados, esto a partir del uso de métodos de estimulación ya sea hormonal y métodos técnicos como la ablación folicular.

La técnica de punción folicular *in vivo* conocida como OPU por sus siglas en inglés (Ovum pick up) comenzó a utilizarse en la mujer en la década de 1980 y se describe por primera vez en bovinos por Pieterse *et al.* (1988). En nuestro país se introdujo a partir del año 2005. La técnica de OPU consiste en la recolección de ovocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vagina) mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (Denis, 2001)



Dentro de las biotecnologías reproductivas, el uso de la tecnología de embriones tiene un importante rol en el incremento de genotipos superiores en las poblaciones (Galli *et al.*, 2003). Dicha producción de embriones puede ser realizada por ovulación múltiple y más eficientemente hoy en día por fertilización *in vitro*, lo que implica la aspiración de ovocitos que por muchos años han sido conseguidos de ovarios de camal, pero que hoy pueden ser obtenidos de animales vivos sin alterar su eficiencia productiva y reproductiva gracias a la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido (Ovum pick-up, OPU), que es la técnica de elección para recuperar complejos cúmulus – ovocito (COCs) para la producción de embriones (Viana, 2010).

La técnica de OPU permite la obtención de ovocitos de calidad 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 (Denis, 2008).

Ante esta situación, la obtención de ovocitos de una hembra viva mediante la aspiración folicular transvaginal representa la alternativa más viable para lograr satisfacer las necesidades de ovocitos para FIV. Esto es probablemente debido a que combina lo mejor de diversas tecnologías como la superovulación, la ultrasonografía y la producción *in vitro* de embriones (Nava et al, 2005).

Las ventajas de la técnica de recolección son su fácil utilización a nivel de campo, menor riesgo para el paciente y menor invasividad comparada con la laparoscopia. Las desventajas de esta técnica son el elevado costo relativo del equipo y la necesidad de personal capacitado para la punción y procedimientos en laboratorio (Galli, et al., 2001).

Motivo por el cual es importante evaluar otros factores más allá de la técnica, como la posibilidad de mejorar la calidad ovocitos y el desarrollo folicular a través de



modificaciones hormonales que permitan generar poblaciones ovocitárias más homogéneas y viables antes del momento de la aspiración (Merton, 2003).

Posteriormente aportar más a investigaciones con relación a la técnica de OPU, adaptándola y mejorándola, en nuestra ganadería del altiplano puneño. Teniendo como objetivo principal del presente trabajo de investigación:

1.1. Objetivos de la investigación

1.1.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de la ablación folicular y la estimulación hormonal ovárica sobre la tasa de recuperación de ovocito aspirados por ultrasonografía transvaginal guiada, en vacas Brown Swiss.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la ablación folicular sobre el número y calidad de ovocitos obtenidos por aspiración folicular (OPU).
- Evaluar el efecto de la estimulación hormonal ovárica sobre el número y calidad de ovocitos obtenidos por aspiración folicular (OPU).



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Seneda, et al. (2001), quienes reportan en vacas Holstein 64.2% de folículos menores a 4mm (pequeños) y 35.8 % de folículos mayores a 4mm (grandes).

Ongorato (2016) utilizó 30 vacas de las razas de brangus y angus, donde recibieron una dosis de benzoato de estradiol con 2 mg y 50 mg de progesterona, en día 3 se realizó la ablación folicular, donde se aspiraron folículos >8mm, y PGF al día 4 con una dosis de 150 mg, además utilizó una dosis de eCG con una dosis de 800U, donde obtuvo 13.6 ± 12 folículos aspirados, utilizando agujas N° 18, con una bomba de vacío de 60-70 mg.

Además, otros estudios dado por Ongoratto (2016), utilizó 20 vacas de la raza brangus no lactantes, fueron tratadas con PGF2 más 800 UI de eCG, y se realizó al día 7 el OPU, donde obtuvo un número total de folículos aspirados de 11.8 ± 1.4 . Además, tuvo 7.5 ± 1.4 de COCs recuperados. Otros estudios realizados en el mismo año utilizó 36 vacas de la raza angus, con la combinación de prostaglandina más la ablación y un CIDR obtuvieron 15.4 ± 12 folículos aspirados, con 6.3 ± 0.7 de COCs recuperados

Sendag (2008), utilizó 24 vacas Holstein alemanas las inyecciones de gonadotropinas se iniciaron 14 días después del estro anterior, aplicó eCG en el día 0 y al día 4 OPU, utilizó una dosis de 3000 UI (folligon) 2 días después 625 ug de cloprostenol, para la aspiración utilizó aguja de 50 cm calibre 17, con una presión al vacío de 50 mm Hg, donde obtuvo un promedio de 7.7 ± 5.6 , como número de folículos encontrados en el ovario, con un total de aspiraciones de 109. El índice de recuperación



que obtuvo fue 80.7%, además obtuvo en la calidad de ovocitos de 14 (15.9%) de grado A, 15 (17%) de grado B, 48 (54.6%) de grado C, y 11 (12.5%) de grado D.

Chong et al., (2008) empleo la estimulación intraovarica con eCG 900 UI teniendo mejores resultados en el desarrollo folicular $8,33 \pm 0,6$ y se pudo mejorar los resultados obtenidos por punción folicular guiada por ultrasonografía. Además, tuvo un incremento significativo en el número de folículos puncionados y ovocitos recolectados al estimular las donantes con eCG. Con el método usado para sincronizar la onda folicular mediante ablación fue de 50% de folículos de primer grado, (50% de 3grado)

Rivas (2019) realizo aspiración folicular a 16 vacas de la raza Bradford, multíparas entre 4 a 8 años, todas las vacas recibieron 2 mg de benzoato de estradiol, 12.5 mg de dinaprot trometamina, (prostaglandina y dispositivo intravaginal), administro diferentes dosis de eCG; dosis de eCG con 0 UI, 200 UI, 400 UI Y 800 UI; todas las vacas fueron sometidas al OPU a los 6 días, utilizó aguja calibre 20, con una presión de vacío de 100 mg Hg, equivalente a un caudal de 10 a 15 mL de H₂O/min. Logrando resultados con una tasa de recuperación de ovocitos mayor con el grupo control que con los otros grupos. Aquellas vacas que no recibieron ningún tratamiento, obtuvo 126 ovocitos, con un índice de recuperación de un 91.3 ± 2.4 , en donde con una dosis de 800 UI de eCG tuvo una recuperación de 91 ovocitos, con un índice de recuperación de un 64.1 ± 4.0 %, pero además con una dosis de 800UI obtuvo un 36.6% más folículos de > 10 mm. 44.4% de 6 a 10 mm y con un 19% de <6mm folículos observados.

Barreto, (2015) reporto resultados de 11 folículos en trabajos realizados en vacas de raza Holstein seleccionadas de acuerdo al número de partos, buena condición corporal y no presentaban problemas productivos y sanitarios.



Ribeiro, et al, (2011) utilizo 42 hembras cruzadas Nerolle, todos solos animales recibieron implantes de oído, sustancia que contiene norgestomet 3 mg en el día 0, se combinó con la aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol, se formó 3 grupos de 14 animales, con un grupo control solo OPU, eCG con 1400 UI (folligon) a los 5 días y OPU a los 7 días, donde la cantidad de ovocitos recuperado fue $16,38 \pm 15,21$ ovocitos obtuvo $5,46 \pm 9,00$ ovocitos de calidad 1; $2,00 \pm 4,16$ de calidad 2; $5,15 \pm 4,91$ de calidad 3 y $3,77 \pm 3,58$ ovocitos expandidos, donde son datos superiores a los resultados obtenido para dicho trabajo.

Aller et al. (2012), obtuvo resultados con la aplicación de eCG del 34.2% de folículos encontrados con una media de 9.6 ± 0.9 folículos. Este efecto positivo fue por el uso de eCG (1600 UI) en vacas Angus preñadas que tenían terneros lactantes.

Viana, (2009), utilizo vacas Gyr no lactantes, todas las vacas se sometieron a 4 sesiones de secuenciales de OPU a intervalos de 4 días, la primera sesión se realizó para eliminar folículos presentes (ablación), antes del inicio de la primera sesión, los ciclos estrales utilizo 0.5 mg de cloprostenol, realizando la primera sesión a las 48 horas.

Letters, (2018) obtuvo un 46.92 % folículo de 3 – 4 mm; 30.77 % de folículos de 5 – 6 mm y 23.07 % de folículo >7 mm. Además, realizó la categorización de los ovocitos recolectados encontrando un 34.1 % de grado 1; 30.0 % de grado 2; 24.2 % de grado 3 y 9.4 % de grado 4, trabajando con vacas grises rumanas con una dosis de 2000 UI.

Sait *et al.*, (2008) reportaron una media de 13.8 ± 7.7 con aplicación de FSH y 7.7 ± 5.6 con aplicación de eCG en la raza Holstein una media de 10.3 ± 5.0 con aplicación de FSH y un 6.2 ± 4.8 con aplicación de eCG.



Mercado, (2015) obtuvo, 11.00 folículos promedio, utilizando en su protocolo la progesterona combinado con estrógenos.

Betancur et al., (2011) quien obtuvo 57% de folículos de primer grado utilizando FSH-hCG, y 28.6% de segundo grado, estos resultados son superiores a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se debería a la acción de la aplicación de 0.150mg de D(+)-cloprostenol (Prostal ®, I.M) al momento de retirar el dispositivo intravaginal, y al día siguiente aplicó 1 mg (I.M) adicional de benzoato de estradiol, cuatro días después se realizó la aspiración folicular. Y 14.4% de folículos fueron de tercer grado lo cual es inferior a los resultados obtenidos en el presente trabajo (55.56%).

2.2. MARCO TEORICO

Los ovarios son glándulas exocrinas (liberan óvulos) y endocrinas (secretan hormonas), la liberación de óvulos se lleva a cabo mediante procesos en conjunto denominados ovogénesis y la foliculogénesis las cuales forman ovocitos y folículos respectivamente (Sintex, 2005). El ovario es un órgano dinámico, que provee un ambiente adecuado para la producción de sustancias como las hormonas, factores intraovaricos y liberación de gametos viables, estos últimos son contenidos desde el periodo fetal en los folículos (Johnson, 2003)

2.2.1. Desarrollo Folicular o Foliculogénesis.

Muchas de las hembras de las especies domesticas nacen con un número determinado de ovocitos, gran parte de los cuales sufrirán atresia y nunca serán ovulados. A lo largo de la vida de la hembra, los folículos primordiales permanecen en un estado de reposo y cada cierto tiempo algunos son seleccionados para desarrollarse.



La dinámica folicular es un proceso continuo que culmina ya sea con la ovulación del folículo maduro o con la regresión del mismo (Galina, 2008).

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

Los folículos primarios, se caracterizan por presentar el ovocito rodeado por una capa de células cuboides (Kastka & Rynska, 1998). Con la proliferación de estas células pasan a ser formados los folículos secundarios, que son caracterizados por la presencia del rodeado por más de dos capas de células de la granulosa, por la presencia de la zona pelúcida y por empezar la formación de la teca. Con el surgimiento de la cavidad antral el folículo pasa a ser llamado terciario o folículo de Graaf (Rajkovic, 2006)

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

2.2.2. Dinámica Folicular

Wiltbank (1996), sugiere que el crecimiento de folículos bovinos ocurre en un patrón denominado ondas de crecimiento folicular.



Con el apoyo de técnicas de biología molecular, ultrasonografía y otras, ha sido posible realizar estudios importantes sobre las variaciones que puede presentar la dinámica folicular en ganado Bos Taurus y Bos Indicus, encontrándose diferencias representativas entre y dentro de especies, ocasionadas entre otros, por defectos genéticos y ambientales (Henao, 2010).

Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, funcionando a través de estadios integrados de reclutación, selección y dominancia folicular (Fernandez, 2003).

En la mayoría de los ciclos estrales en vacas constan de 2 ó 3 ondas. En estas investigaciones se reporta que el 71,4% de las vacas tenían 3 ondas de desarrollo folicular. La duración media de los intervalos interovulatorios de vacas con 2 ondas fue de $19,8 \pm 0,6$ días, siendo significativamente ($p \leq 0,05$) más corto que vacas con 3 ondas foliculares de $22,5 \pm 0,8$ días (Noseir, 2003).

Los andrógenos tienen un papel importante en el crecimiento folicular y función ovárica. La variación en la producción de estos andrógenos es importante para determinar el número de folículos reclutados, siendo más alta la concentración de testosterona circulante en vacas de mayor población folicular, y muy bajo el nivel de testosterona en vacas de población folicular inferior (Mossa *et al.*, 2010)

2.2.3. Fases del Desarrollo de la Dinámica Folicular

2.2.3.1. Reclutamiento Folicular Primario

Fernández (2003) define como reclutamiento al proceso que está bajo la responsabilidad de factores intraováricos (factores de crecimiento ligados a la insulina y



sus proteínas de enlace IGFBP) estimulados por la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos (2 – 3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar la ovulación. Del grupo grande de folículos que inician su desarrollo solamente un pequeño porcentaje logra su potencial completo (endocrino y gametogénico), a lo que se denomina proceso de selección y crecimiento folicular (Adams, 1999).

En cada onda folicular es reclutado un grupo de folículos primordiales que crecen de manera continua debido a los incrementos en las concentraciones de FSH (Webb, *et al.*, 2003).

Al inicio del ciclo estral, un número de folículos es reclutado del *pool* de folículos antrales más pequeños (2 a 4 mm). El reclutamiento no es un fenómeno aislado o al azar. Parece que los folículos a ser reclutados como grupo han recibido anteriormente una señal que les permite crecer y desarrollarse en vez de sufrir regresión (Fortune, *et al.*, 1991)

En la última década se han propuesto dos conceptos en cuanto al reclutamiento folicular, el reclutamiento inicial y el reclutamiento cíclico. El reclutamiento inicial se atribuye a que dejan de estar presentes algunos factores inhibitorios que mantenían a los folículos en latencia. Se considera que es un proceso continuo que se inicia poco después de la formación del folículo, mucho antes de la pubertad (Mcgee *et al.*, 2000).

2.2.3.2. Selección Folicular

La selección de un folículo dominante se refiere al mecanismo que determina cual folículo de la cohorte es seleccionado para continuar creciendo y convertirse en dominante evadiendo la atresia (Webb, *et al.*, 1999). El principal evento morfológico en el proceso de selección es la divergencia (Ginther, 1996). La FSH estimula la actividad



de la aromatasa de las células de la granulosa lo que produce altas concentraciones intrafoliculares de estrógenos, la síntesis de estrógenos por parte de este folículo dominante es responsable de esta diferencia en las concentraciones intrafoliculares de estrógenos observadas en la vena ovárica entre los días 5 y 7 de la fase folicular se anticipa la fase del antro y la adquisición de receptores de LH. El folículo pasa entonces una secuencia ordenada de eventos en los que la FSH y lo estrógenos estimulan el crecimiento y formación del antro folicular y la aparición de receptores de LH (Samuel, 2001).

2.2.3.3. Dominancia Folicular del Ovario

Una característica del folículo seleccionado es su mayor capacidad para la producción de estradiol en vacas (Ginther, *et al.*, 2003). El estradiol en la hembra bovina empieza incrementarse en la circulación al momento en que inicia la desviación, lo que ocasiona el descenso de la FSH. En cada onda folicular, el folículo dominante adquiere receptores para LH y continúa su crecimiento mientras que los folículos subordinados que continúan dependiendo del FSH entran en atresia (Ginther, 2001)

Los folículos adquieren la capacidad ovulatoria a aproximadamente 10 mm, correspondiente a aproximadamente 1 día después del inicio de la desviación folicular, pero requiere una dosis mayor de LH para inducir la ovulación en comparación con los folículos más grandes. Se especuló que la adquisición de la capacidad ovulatoria puede implicar un aumento de la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa del folículo dominante y que este cambio puede ser importante para un mayor crecimiento del folículo dominante (Sartori, *et al.*, 2011).

El folículo dominante crece a una tasa constante y el resto de los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menor y



posteriormente dejan de hacerlo (Ginther, et al., 2003). Este efecto inhibitorio se mantiene hasta que esta dominancia desaparece bien porque el folículo dominante muere o porque el folículo es ovulado (Lamb, 2009).

2.2.4. Ovogénesis.

El proceso de formación y desarrollo del ovocito, comienza con las ovogonias que se derivan de las células germinales primordiales en el embrión, este proceso comienza antes del nacimiento cuando las células de origen epitelial se van agrupando alrededor de la membrana limitante del ovocito. Todos óvulos los potenciales alcanzan la gónada primitiva en esta fase temprana y proliferan alrededor, del día 50 hasta el día 130 de gestación, las células germinales del primordio se convierten en una ovogonia cuando la gónada primitiva se diferencia en ovario (Alvaro, 2003; Gigli, 2006)

Desarrollo de ovocitos y folículos; comienzan con la meiosis durante el desarrollo fetal de las ovogonias, donde sufren una serie de divisiones mitóticas que finalizan en la formación de ovocitos del día 52 de gestación (Gigli, 2006).

La ovogénesis comienza en la vida intrauterina entendiéndose como tal el proceso que permitiría a una célula llegar a ser el gameto femenino con plena capacidad de ser fecundado a partir de unas células indiferenciadas se producen células germinales primordiales (Byskov, 1982).

2.2.5. Control de la Dinámica Folicular

El uso de la ultrasonografía para estudiar el efecto de los diferentes tratamientos hormonales sobre la dinámica folicular en el bovino llevó a conducir protocolos que permiten manipular eficientemente el ciclo estral y la ovulación (Bo, 2002).



2.2.5.1. Ablación Folicular

Es la eliminación mecánica de folículos mayores a 5 mm, utilizando métodos físicos como el OPU, con la adecuación de la dinámica folicular ocurre de forma inmediata, con un aumento en los niveles de FSH en 5 horas y la emergencia de una nueva honda de desarrollo folicular 24 a 48 horas después de la eliminación de los folículos en cualquier fase del ciclo estral, lo que permite la realización del programa de superovulación en un momento electivo, adicionalmente cuando esta remoción es realizada dentro del periodo de los 8 a 12 días post estro, la eliminación mecánica de los folículos de mayor tamaño, 24 a 48 horas antes del inicio del tratamiento superovulatorio, determinan un aumento en el número de estructuras colectadas.

Una de las técnicas para la sincronización de la aparición de ondas foliculares implica la ablación transvaginal guiada por ultrasonido de todos los folículos ≥ 5 mm, independientemente de la etapa del ciclo estral (Bergfelt et al.1994), donde es eliminado los efectos supresores de los productos foliculares (estradiol e inhibina) en Liberación de FSH, dándose un aumento de FSH y la aparición de una nueva onda folicular 1 día después (Adams et al. 1992a). Los tratamientos de superestimulación se administran, comenzando 1 o 2 días después de la ablación (Bergfelt et al. 1994). El momento del estro fue más sincrónico cuando se insertó un dispositivo de progestina durante el período de superestimulación y se administraron dos inyecciones de PGF el día de la extracción del dispositivo. La ablación transvaginal guiada por ecografía de solo el folículo dominante (Shaw, et al. 2000) durante el diestro medio, seguido en 2 días por la superestimulación, también dio como resultado una respuesta superovulatoria más alta que cuando el folículo dominante no fue ablacionado. También se ha demostrado que la ablación de los dos folículos más grandes en etapas aleatorias del ciclo estral fue eficaz



para sincronizar la aparición de ondas foliculares para la superestimulación (Baracaldo et al. 2000).

2.2.5.2. Tratamientos Hormonales.

El grupo de folículos reclutados son generalmente dependientes de FSH, después de la selección, el estrógeno activa al folículo dominante que es dependiente de LH. Este mecanismo fisiológico, puede ser imitado con el uso exógeno de progestágenos y estrógenos, para sincronizar emergencia de onda folicular por supresión de FSH y/o LH. (Diskin, et al., 2002)

Un tratamiento exógeno hormonal simple e independiente de la fase de onda folicular no predice con exactitud la emergencia de la onda, debemos tener en cuenta que la FSH y LH son regulados diferencialmente y que el folículo dominante es un regulador clave de incremento y disminución de esteroides y gonadotropinas. Las funciones específicas del estradiol, inhibina no están totalmente dilucidados. (Bo, 2002)

2.2.6. Uso de la Ecografía en Reproducción Animal

La disponibilidad de equipos (ultrasonido a tiempo real) permite el escaneo de los órganos reproductivos que proporcionan un enfoque nuevo y valioso al estudio de la dinámica folicular en los animales. La ultrasonografía, es actualmente, la base de una técnica muy precisa para la estimación de la población de folículos antrales dentro de los límites impuestos por la resolución del ecógrafo (Gordon, 2004).

La pronta integración de la tecnología de ultrasonido para la industria láctea incluye aplicaciones como la aspiración folicular trans vaginal y la recuperación de los ovocitos (Pieterse et al., 1991) y como una tecnología complementaria para los procedimientos de transferencia de embriones.



El uso de la ecografía en la actualidad, permite la valoración del estatus folicular a tiempo real y permite el desarrollo de estudios sobre los factores limitantes de la respuesta ovulatoria a un tratamiento de superovulación, tanto los dependientes del tratamiento (tipo de gonadotropina y protocolo de administración) como aquellos dependientes del animal (estatus folicular), que pueden conducir a la mejora de los protocolos de superovulación utilizados (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2002).

2.2.7. Sincronización de la Emergencia de la Onda Folicular

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

Sin embargo, estudios recientes mostraron que cuando vacas de razas taurinas son estimuladas con FSH, tienen una mejor producción embrionaria con los ovocitos provenientes de folículos entre 7 – 10 mm de diámetro (Blondin, 2012). Se ha demostrado que la sincronización de la onda folicular emergente puede ser hecha de forma mecánica a través de la ablación folicular (Bergfelt *et al.*, 1994) o farmacológicamente a través de tratamientos hormonales con estradiol y progesterona, obteniendo respuestas superovulatorias similares (Bó *et al.*, 1995; Baracaldo, 2000).

Además, se ha visto que la no presencia del folículo dominante en el inicio del tratamiento aumenta la respuesta superovulatoria (Adams, 1994; Mapletoft *et al.*, 2002),



así como aumenta las tasas de ovocitos competentes para la producción de embriones *in vitro* (Hagemann *et al.*, 1999a; 1999b).

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

Otro intento para aumentar la calidad y la homogeneidad de los ovocitos al inicio del tratamiento es la remoción de todos los folículos que están presentes en el ovario. Esto puede ser alcanzado realizando aspiraciones foliculares cada 2 o 3 días antes del inicio del tratamiento superestimulador. Hanenberg *et al.* (1997) demostraron que, disminuyendo el intervalo de días entre cada aspiración, al comparar aspiraciones con 3 días de intervalo vs 7 días de intervalo, aumentó considerablemente el porcentaje de embriones obtenidos por sesión de OPU (19.7% vs 13.5%, respectivamente) ($P < 0.05$). Esto puede ser debido a que después de algunas sesiones seguidas de OPU solamente los folículos en la fase de crecimiento estarán presentes, lo que ha demostrado que reduce el número de embriones infertilizados / no viables, y aumenta la proporción de ovocitos y embriones viables.



2.2.8. Tratamientos Superovulatorios.

El periodo de crecimiento folicular y de dominancia previa a la ovulación es crítica en el desarrollo potencial de los ovocitos (Blondin *et al.*, 1995). Además, se sabe que la estimulación ovárica previa a la aspiración folicular con gonadotrofinas permite un rápido crecimiento folicular y que los ovocitos completen su maduración final (Blondin *et al.*, 1997).

Dentro de los fármacos superovulatorios utilizados para la producción *in vivo* de embriones podemos citar la gonadotrofina coriónica equina (eCG) en una única dosis (Boland *et al.*, 1991) o combinada con suero o anticuerpos anti-eCG (Dieleman *et al.*, 1987) y la hormona folículo estimulante extraída de hipófisis de cerdos, ovinos o equinos (Donaldson, 1989).

Se sabe que en algunas donantes que poseen un reducido número de folículos, el crecimiento folicular puede ser estimulado con combinaciones de FSH/LH y gonadotrofina coriónica equina (eCG) que son hormonas muy conocidas y utilizadas masivamente en protocolos clásicos de colecta y transferencia de embriones *in vivo* (Mapletoft *et al.*, 2002). Sin embargo, alteraciones en la dosis, calendario de aplicaciones o momento de la aplicación del tratamiento, son muchas veces necesarios para alcanzar los objetivos de estimulación previos a la OPU, para generar una ganancia en la cantidad de folículos disponibles para la aspiración (de Roover *et al.*, 2008).

La respuesta superovulatoria es muy variable entre los animales. De Roover *et al.* (2005), trataron donantes con FSH y observaron una respuesta exacerbada para el número de folículos y de los complejos cumulus-ovocitos (COC's) recuperados en el 9% de las sesiones de OPU (59/665). Al contrario, una baja respuesta ocurrió en 9% de las sesiones (61/665). Por lo tanto, estos autores demostraron que el número de animales



que no producen embriones puede ser menor que lo esperado en protocolos tradicionales de superovulación y TE, donde es esperado que un 10% de animales no respondan a la estimulación y un 20% no produzcan ningún embrión viable/transferible (Mapletoft *et al.*, 2002).

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

La estimulación ovárica con el uso de gonadotrofinas ha sido reportada por diversos autores, con un aumento en la recuperación de ovocitos por OPU de hembras bovinas *Bos taurus* estimuladas en comparación con las que no recibieron estimulación (Pieterse *et al.* 1992). Esto pudo ser alcanzado utilizando distintos procedimientos con gran variación del periodo entre la última aplicación de FSH y la recolección de los ovocitos. Blondin *et al.* (1997) encontraron una mejor competencia ovocitaria cuando el período entre la última aplicación de FSH y la aspiración folicular fue de 48 h, proceso conocido internacionalmente como “coasting” folicular.

Además, la estimulación del crecimiento del pool de folículos a un tamaño < 5 mm parece ser esencial. Esto sugiere que este periodo induce cambios en los COC's que se parecen a una atresia temprana y que se asemejan a los cambios que ocurren en la



premaduración *in vivo*, es decir antes que ocurra el pico preovulatorio de LH. Bousquet *et al.* (1999) aplicaron este tratamiento comercialmente en vacas Holstein en Canadá, con aspiraciones semejantes al número obtenido por superovulación y lavado uterino convencional (MOET), que fue de 4,3 embriones. Goodhand *et al.* (2000) también reportaron que la administración de FSH aumentó el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados Grado A, y un incremento en el número de embriones transferibles cuando eran utilizadas múltiples dosis de la hormona.

Estos resultados muestran que el tratamiento con múltiples dosis de FSH antes de la aspiración mejora el número de folículos disponibles para aspiración y el número y la calidad de ovocitos recuperados y embriones producidos (Goodhand *et al.*, 2000). Goodhand *et al.* (1999) igualmente reportaron un aumento en la tasa de producción de embriones del 22% al 39% (embriones por COCs procesados) después de 3 días de dosis decrecientes de FSH. Por su parte, Merton *et al.* (2003) encontraron un efecto positivo en la estimulación ovárica con FSH antes de la OPU en la capacidad de desarrollo de los ovocitos.

Por otro lado, Sendag *et al.* (2008) compararon el uso de la eCG y FSH en protocolos de estimulación folicular previos a la OPU y encontraron que ambas hormonas aumentaron el número de folículos disponibles para la aspiración, con ventaja para los animales tratados con FSH con relación a los tratados con eCG.

2.2.9. Tratamiento Con Progestágenos

La progesterona (P4) es una hormona esteroide producida principalmente por el cuerpo lúteo y la placenta. La progesterona producida por la placenta es liberada en la circulación materna y está relacionada con muchas funciones en la gestación, como el mantenimiento estructural y funcional del útero, estableciendo un ambiente propicio



para el desarrollo embrionario y favoreciendo el crecimiento de la glándula mamaria (Kastka, et al., 1998). La progesterona luteal está involucrada en la regulación del desarrollo folicular, causando atresia cuando está asociada con estradiol, por la inhibición de la secreción de gonadotrofinas (Bó *et al.*, 1995) y hay una relación inversa entre los niveles sanguíneos de progesterona y la frecuencia de los pulsos de LH. Es decir, concentraciones bajas de progesterona resultan en una alta pulsatilidad de LH de baja amplitud que estimulan el crecimiento y maduración final del folículo dominante (Stock, et al., 1993).

Por el contrario, altos niveles de progesterona causan una baja pulsatilidad de LH (y de gran amplitud) que inducen la regresión del folículo dominante. Pfeifer *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la progesterona en el número de folículos aspirados y ovocitos recuperados, así como el número de embriones producidos en donantes *Bos Indicus*, sugiriendo que la progesterona puede tener una importante función en el desarrollo folicular y en la maduración del ovocito.

En ese trabajo tanto la muy alta como la muy baja concentración de progesterona afectó negativamente la producción de embriones *in vitro* y se lo asoció a una menor cantidad de folículos (con progesterona alta) o una menor calidad de los ovocitos (con progesterona muy baja). Esta noción ha sido recientemente confirmada por los estudios de Nasser *et al.* (2011) y Rivera *et al.* (2011) en que la adición de progesterona mediante un CIDR aumento la calidad de embriones producidos *in vivo* en vacas superovuladas durante la primera onda folicular Fair y Lonergan (2012) y Wiltbank *et al.* (2012). Sin embargo, Chaubal *et al.* (2007) no observaron estos efectos positivos con el uso de la progesterona para la estimulación del crecimiento y recutamiento folicular previos a la OPU y producción *in vitro* de embriones.



2.2.10. Aplicaciones de la Técnica de OPU (Ovum Pick-Up)

2.2.10.1. Aspiración Folicular

La aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido u *ovum pick-up* (OPU) se ha convertido en la técnica de opción para recuperar los complejos *cumulus-ovocito* (COC) para la producción de embriones, tanto en medicina humana como en la industria ganadera (Galli, 2003). El rendimiento y eficiencia de OPU depende del *pool* de folículos antrales disponibles para la aspiración (Bols, 2005). Por tanto, el manejo de la onda folicular es muy importante para el desarrollo de esta técnica.

La punción folicular para la recolección de ovocitos en animales vivos permite la modulación endocrina de la actividad ovárica influyendo directamente sobre la cantidad y calidad de los complejos *cumulus ovocito* (COC's) recuperados. Entre las ventajas de OPU nos permite obtener información adicional sobre el momento de recolección del ovocito, como también conocer los valores endocrinos de la sangre, para ganar más información sobre la donante y su posible efecto directo sobre la calidad de los ovocitos (Kastelic, et al.). Los factores principales que controlan el resultado en cuanto al número y calidad de los ovocitos recuperados por OPU se pueden dividir en dos principales categorías. La primera incluye aspectos técnicos, como el método de punción, los materiales utilizados como agujas, la presión aplicada. La segunda categoría se puede atribuir a los factores biológicos como el estímulo hormonal, el estado del ciclo estral, la edad, raza, condición corporal (Bols, et al., 2012)

La frecuencia de colección utilizada para recuperar ovocitos debe adaptarse según el objetivo del programa. La colección dos veces por semana permite una máxima recuperación de ovocitos de calidad conveniente para la producción de embriones en un intervalo corto. La colección una vez por semana resulta en la



recuperación de un número pequeño de ovocitos de menor calidad, algunos con cumulus expandido y otros en atresia (Galli, et al., 2001).

Viana et al., (2009) sostienen que las sucesivas aspiraciones foliculares alteran la dinámica folicular, posiblemente aumentando la tasa de crecimiento folicular, la dominancia folicular podría establecerse en vacas sometidas a dos veces a la semana OPU y la presencia de un folículo dominante durante los intervalos inter-OPU cortos no puede afectar calidad de los ovocitos recuperados, excepto cuando un folículo codominante estaba presente.

La aspiración folicular *in vivo* fue empleada para sincronizar la onda de crecimiento folicular, este método tuvo su origen a partir de la cauterización del folículo dominante (Adams, 1999). Se recomienda la aspiración de todos los folículos mayores de 5 mm, lo cual se logra a partir de la ultrasonografía vía trans vaginal observándose el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular 1.5 días post aspiración. Trabajos realizados en Cuba en vacas de los genotipos Criollo, donde Denis (2001), ha evidenciado el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular 1.7 días después de aplicada la aspiración folicular con características similares a la onda normal.

Estos trabajos de sincronización de la onda folicular a través de OPU sirvieron de base para evaluar la respuesta superovulatoria entre este método (físico) y los tratamientos clásicos hormonales (Bo G. M., 2000; Mapletoft, 2003; Burke, 2003). Todos estos estudios son de gran utilidad para la elaboración de nuevas estrategias para la aplicación de métodos de sincronización de celos, inducir la ovulación, tratamientos superovulatorios e incremento de la fertilidad (Roller, 2006), así como para incrementar significativamente la respuesta superovulatoria cuando se hace coincidir el inicio del



tratamiento, con el inicio del crecimiento de una nueva onda folicular (De Roover R. G., 2005).

2.2.10.2. Clasificación de Ovocitos

Los complejos ovocito – cúmulos (COCs) son morfológicamente clasificados en 4 categorías, según lo reportado por Seneda et al. (2001) y Viana et al. (2010). Solamente los complejos ovocitos-cúmulos (COCs) clasificados como calidad 1 y 2 deben ser utilizados en la producción in vitro de embriones. En resumen, tenemos que los ovocitos calidad 1 y 2 son catalogados como viables para la producción in vitro de embriones, y los ovocitos de calidad 3 y 4 son catalogados como no viables para dicha biotecnología.

Los AOC se clasificaron morfológicamente según el número de capas de células del cúmulo como sigue: Grado 1, más de tres capas de células de cúmulo compactas; Grado 2, al menos una capa de cúmulos; Grado 3, desnudo; y Grado 4, atrésico, con células cúmulos oscuras y signos de degeneración citoplásmica (Seneda, 2001).

2.2.11. Factores que Inciden en los Resultados de la Técnica De OPU.

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. Existe un grupo de factores técnicos y biológicos que influyen en los resultados de la punción folicular *in vivo* (Douar, 1998).



2.2.12. Factores Técnicos que Influyen en los Resultados de OPU

A. Nivel de Resolución o Calidad de la Imagen

Este aspecto ha quedado prácticamente resuelto con los avances alcanzados en la técnica ultrasonográfica (Hashimoto, 1999).

B. Presión de Aspiración

La presión de aspiración que se alcanza en la punta de la aguja depende tanto de la presión negativa ejercida por la bomba de aspiración como del largo y ancho del sistema de tubos de recolecta y del diámetro de la aguja utilizada, por lo que resulta más aceptado expresar esta como la cantidad de fluido recolectado por minuto que en milímetro de mercurio, ya que un simple cambio en el diámetro de la aguja puede triplicar la cantidad de fluido recolectado (Bols, 2005). Este aspecto tiene gran importancia, ya que, existe una relación directa entre la presión de aspiración y la calidad de células del cúmulo intactas de éstos, dependerán los resultados que se obtengan en cuanto a maduración y capacidad futura de desarrollo embrionario.

C. Frecuencia y Momento de Ciclo Estral para Realizar el OPU

Una de las ventajas que ofrece esta técnica es precisamente que puede ser altamente repetible en un mismo animal, 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 h 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 (Simon *et al.* 1993) y número de blastocitos obtenidos después de la fertilización *in vitro* (Gibbons *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).

Utilización de estimulación hormonal antes de la OPU (ovum pick-up) 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 2 mm (Kruip *et al.* 1994). Sin embargo, se han encontrado en algunos animales baja actividad ovárica (Bousquet *et al.* 2000) en los cuales se hace necesario utilizar una combinación de FSH-LH o de gonadotropina eCG (gonadotropina criónica equina), 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.



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.

El presente trabajo de investigación se realizó en el CE Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en el Distrito de Umachiri provincia de Melgar, Región de Puno; entre los meses de Abril – Junio. Geográficamente se ubica a 156 Km de distancia de la ciudad de Puno, entre las coordenadas latitud 14° 47' 37", Longitud Oeste 70° 47' 50", a una Altitud de 3974 m.s.n.m. con una precipitación pluvial promedio de 254,9 mm (enero a mayo 2018) y 129,9 mm (junio a diciembre) y anual 659 mm; una temperatura máxima de 20,04°C en el mes de diciembre y una mínima de -18,4°C en el mes de junio, con un promedio anual de 8°C y una humedad relativa de 53% como promedio anual (máxima 81% y mínima 18%); 12,79 horas de radiación solar anual promedio, 41% de evaporación anual promedio (SENAMHI, 2018).

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL.

Se realizó la selección de 12 donadoras de la raza Brown Swiss (n=12), vacas en estado de ciclicidad, multíparas, con un peso de 350 a 400 kg; con edades promedio entre 4 a 10 años y una condición corporal entre 2,5 a 3,5 (1 = extremadamente delgado; 5 = muy obeso). Con un manejo de semi estabulación, alimentadas con suplemento de ensilaje de avena y con praderas implementadas con alfalfa (pastoreo). Siendo distribuidas aleatoriamente en 4 diferentes grupos de tratamiento (muestreo por conveniencia).



3.3. MATERIALES

3.3.1. Materiales Utilizados para la Aspiración Folicular (OPU).

- Equipo de ultrasonido transvaginal (ecógrafo) marca CHISON VET
- Tubo de plástico PVC (diámetro $\frac{3}{4}$ de 50 cm de largo)
- Tubo de aluminio (50 cm de largo y 9 mm de diámetro)
- Tubo de silicona (línea de aspiración)
- Tubo Falcon de plástico de 50 mL
- Pipeta de plástico de inseminación artificial (45 cm)
- Tapón de aspiración (WTA Brazil)
- Bomba de vacío (vakuumpumpe N86 KN.18)
- Aguja N° 18 de 7 cm. para aspiración
- Jeringas de tuberculina.

3.3.2. Materiales Utilizados para la Preparación de las Vacas.

- Insumos para la sincronización de celo: dispositivos intravaginales (PRO-CICLAR, con 750 mg de progesterona, LABORATORIO ZOOVET); prostaglandina (LUTAPROST); estrógenos (ESTROVET); eCG (NOVORMON 5000 UI).
- Insumos para preparar las vacas: clorhidrato de lidocaína al 2%, tranquilizantes (acepromacina), papel toalla, alcohol yodado, jeringas de 10 mL y 20 mL, agujas n° 18, algodón, guantes de inspección y obstétricos.



3.4. METODOLOGÍA.

Distribución de los Grupos.

Se distribuyó en grupos, con ablación y sin ablación folicular, se combinaron con el uso de la estimulación hormonal y sin estimulación hormonal, la distribución de animales a cada uno de los tratamientos se presenta en el siguiente cuadro.

Tabla 1 Distribución de unidades experimentales (vacas Brown Swiss).

	TRATAMIENTO	NUMERO DE ANIMALES
T0	Control (PGF2 α = 2 ml)	3
T1	Con Hormona (PG 750 mg + eCG)	3
T2	Ablación folicular (PGF2 α = 2 ml)	3
T3	Hormona (PG 750 mg + eCG) + Ablación	3
	TOTAL	12

Grupo 1; Control (T0)

Los animales del grupo **T0**, recibieron una sincronización de la dinámica folicular, con dos dosis de prostaglandina F2 α con 11 días de intervalo entre ambas (primero día 0 y segundo día 11). En el Día 0, en el Grupo 1 recibieron 2 mL de PF2 α (prostaglandina F2 α) por vía intramuscular (I.M.) y en el día 11, otra dosis de PF2 α de 2 mL (Fig.1 – ANEXO). En el día 13, se realizó la primera aspiración folicular guiada por ecografía, luego se realizó dos aspiraciones más con cuatro días de aparto entre las mismas (días 17, 21), los COCs obtenidos se clasificaron según su apariencia citoplasmática y número de células del cumulus según lo descrito por Chaubal, et al. (2007); Los COCs de cada una de las aspiraciones fueron evaluados.



Tabla 2 Protocolo de sincronización de la dinámica folicular, del grupo control.

PGF₂α (Dosis=2 ml)											PGF₂α (Dosis=2 ml)	1ra sesión de aspiración.	2ra sesión de aspiración.	3ra sesión de aspiración.
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	17	21

Días

Grupo 2, Con Hormona (T1)

Los animales del grupo **T1**, con tratamiento hormonal, en ese grupo se realizó un tratamiento hormonal de multiovulación. En el día 0, se colocaron un implante de progesterona intravaginal (PRO-CICLAR, con 750 mg de progesterona) (Fig. 2– ANEXO) más 2 mL de BE (benzoato de estradiol) por vía intramuscular (Fig.3 – ANEXO), al día 4, se aplicó 1600UI de eCG (NOVORMON 5000UI, laboratorio argentino SINTEX), tres días después se retiró el DIV inmediatamente, se realizó la sesión de aspiración folicular (día 7 OPU).

Tabla 3 Protocolo de superestimulación hormonal.

DIV (PG=750 mg) BE= 2 ml			eCG (1600 UI)			RETIRO DEL DIV, 1ra sesión de aspiración.
0	1	2	3	4	5	6

Días

Grupo 3, Ablación (T2)

En los animales del grupo **T2**, con ablación (técnica referida a la eliminación del folículo dominante mediante aspiración folicular, para reiniciar un nuevo ciclo), se realizó la sincronización de la dinámica folicular, con dos dosis de prostaglandina F2 α con 11 días de intervalo entre ambas (primera día 0 y segunda día 11). En el Día 0, en el Grupo 1 recibieron 2 mL de PF2 α (prostaglandina F2 α) por vía intramuscular (I.M.) y en el día 11, otra dosis de PF2 α de 2 mL (Fig.1 – ANEXO). En el día 13 este grupo fueron sometidas a la ablación folicular, fue realizado mediante la aspiración de todos los folículos >6 mm de diámetro (Barros et al., 2001). Luego se prosiguió con las 2 aspiraciones con cuatro días de intervalo (días 17, 21). Los COCs de cada una de las aspiraciones fueron evaluados.

Tabla 4 Protocolo de sincronización de la dinámica folicular, con ablación.

PGF ₂ α (dosis=2 ml)											PGF ₂ α (dosis=2 ml)	Ablación.	1ra sesión de aspiración.	2da sesión de aspiración.
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	17	21

Días

Grupo 3, Hormona + Ablación (T3)

Los animales del grupo **T3**, con tratamiento hormonal y adicionando la técnica de ablación (técnica referida a la eliminación del folículo dominante mediante la aspiración folicular, para reiniciar un nuevo ciclo), en este grupo se realizó un tratamiento hormonal de multiovulación. En el día 0, se colocaron un implante de progesterona intravaginal (PRO-CICLAR, con 750 mg de progesterona) (Fig. 2– ANEXO), el día 2, se realizó la ablación (se realiza la técnica como OPU), aspirando folículos >6mm, al día 4, se aplicó 1600UI de eCG (NOVORMON 5000UI), tres días después se retiró el DIV inmediatamente, se realizó la sesión de aspiración folicular propiamente dicha (día 7 OPU).

Tabla 5 Protocolo de superestimulación hormonal en combinación con ablación.

DIV (PG=750 mg)		Ablación		eCG (1600 UI) dosis =8 ml		RETIRO DEL DIV, 1ra sesión de aspiración.
0	1	2	3	4	5	6

Días



3.5. PREPARACIÓN DE ANIMALES PARA LA ASPIRACIÓN FOLICULAR.

Todas las sesiones de aspiración y ablación folicular, recibieron el mismo procedimiento.

- a. Se ingresó la vaca al brete realizando la sujeción respectiva. (Fig.4 - anexo)
- b. Se rasuró y desinfectó la parte de la articulación sacro-coccígea para colocar la anestesia epidural (clorhidrato de lidocaína al 2%), aplicando 5 a 6 mL/vaca. (Fig. 5 - anexo)
- c. Se extrajeron las heces del recto, procediendo a la limpieza de la región perianal y vulva, desinfección y secado con papel toalla. (Fig. 6 - anexo)

3.6. EVALUACIÓN DE LOS OVARIOS POR ULTRASONOGRAFÍA

Se realizó la evaluación de los ovarios, antes de la sesión del OPU, ambos ovarios se ecografiaron con un transductor lineal, con 7 MHz (chison 600 vet) para contabilizar y clasificarlos de acuerdo a su diámetro en pequeños (folículos pequeños, FP <6mm), medianos (folículos medianos, FM 6 – 10mm) y grandes (folículos grandes, FG >10mm).

3.7. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ASPIRACIÓN

La solución utilizada para aspiración y lavado de los ovocitos fue PBS (Solución Buffer Fosfatada) + 1% de SFB (suero fetal bovino) mas 10 U.I. de heparina/mL+ 25 ug/mL de gentamicina. (Viana, 2010)

3.8. TÉCNICA DE OPU Y ABLACIÓN

- a. Aspiración folicular fue realizada con un ecógrafo estacionario (CHISON 600VET) equipado con un transductor sectorial intravaginal de 6 MHz. Previo a su utilización fue sumergido el transductor, además se desinfecto con clorhexidina



- 1% (desinfectante), luego se colocó gel de ecografía sobre el transductor, enseguida se cubrió con una funda de plástico, evitando que exista aire entre la funda y la superficie (cristales) del transductor (Fig. 7 - anexo).
- b. Sobre la funda de plástico se lubrico con gel y se introdujo el aspirador dentro de la vagina; con la mano izquierda se introdujo a través del recto se cogió los ovarios entre los dedos, llevando el ovario hacia la punta del transductor, tratando de ubicar así los folículos (Fig.8 - anexo).
 - c. La guía de aguja se introdujo por dentro del guiador (tubo de aluminio) atravesando la pared vaginal con la aguja, observando mediante el ecógrafo, la aguja (imagen híperecoica o blanca) se dirigió hacia los folículos (imagen anecoicas u oscuras).
 - d. Se realizó la punción respectiva de los folículos, aspirando todo el líquido folicular hacia el tubo colector. La aspiración se realizó con una bomba de vacío (Vakuumpumpe N86 KN.18), (Seneda et al., 2003) a una presión de 75 mm Hg (Fig.9-Anexo).
 - e. Concluida la aspiración, se succiono nuevamente la solución (PBS+1% de suero fetal+ heparina) por la línea de aspiración, con la finalidad de lavar y recuperar, que algunos ovocitos hayan podido quedarse en la línea de aspiración.

3.9. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS

- a. Después de realizar el OPU, el tubo colector (Figura 10 – anexo) que contiene el líquido aspirado, es vertida a un filtro emcon (filtro solo para embriones), que retiene a los ovocitos aspirados. Al realizar este proceso, se adiciona PBS al filtro para realizar, de 2 a 3 lavados.
- b. Inicialmente el tubo colector es lavado con PBS y el contenido se vierte a una placa Petri de 10 x 35 mm (Figura 11 – anexo) se lavó las paredes para evitar

pérdidas de ovocitos, en seguida se observó la placa Petri (Figura 12 – anexo) en el microscopio con un aumento de 40X, buscando y clasificando cada ovocito encontrado.

- c. Para la clasificación de dichos ovocitos se tomó en cuenta la calidad de los complejos ovocito – cúmulos (COCs) lo cual fueron morfológicamente clasificados en 4 categorías, según lo reportado por (Seneda, et al., 2001; Viana, et al., 2010) (Figura 13, 14 – anexo).

Cuadro 1 Clasificación por calidad de ovocitos; categorías de Complejo Cumulus Ovocito (COCs)

CATEGORÍA	CARACTERÍSTICAS	CITOPLASMA
Grado 1	COCs compacto, más de tres líneas de células del cúmulus (>3)	Citoplasma homogéneo.
Grado 2	COCs con al menos una línea de células del cúmulus	Citoplasma homogéneo o ligeramente heterogéneo.
Grado 3	Ovocito con pérdida de células del cumulus	
Grado 4	Las células del cúmulus oscuras	Degeneración citoplasmática (atresico)

Fuente: Chaubal, et al., (2007)

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables respuesta de carácter continuo como son: número de folículos según tamaño, ovocitos recuperados y calidad de los mismos fueron comparados entre los diferentes tratamientos a través de un diseño completo al azar con un arreglo factorial de 2 x 2.



Modelo lineal del DCA con un arreglo factorial de 2x2

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = La puntuación del i sujeto bajo la combinación del j valor del factor A y el k valor del factor B.

μ = La media común a todos los datos del experimento.

α_j = El efecto o impacto de j nivel de la variable de tratamiento A.

β_k = Efecto del k valor de la variable de tratamiento B.

$(\alpha\beta)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el i valor de A y el k valor de B.

ε_{ij} = Error experimental o efecto aleatorio de muestreo.

La tasa de recuperación fue evaluada haciendo uso de una prueba de Chi-cuadrada.

Siendo el modelo para Chi-cuadrado:

$$\chi^2 = \sum^2 = 1 \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dónde:

χ^2 = Chi – Calculada.

K= Número De categorías o clase (categoría de ovocitos)

O_i= valor observado en el i-esimo tratamiento.

E_i= valor esperado en el i-esimo tratamiento.

Todo el procedimiento se realizó haciendo uso del paquete estadístico SAS

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tamaño de Folículos según tratamiento.

Las categorías del tamaño de los folículos en todos los grupos de tratamientos se muestran en la tabla 06. El número de folículos pequeños (<6mm) en el grupo testigo (1) fue un 62.3 %; con ablación (grupo 2), fue un 71.4 % de folículos encontrados, en los tratamientos del grupo 3 (hormona) se obtuvo un 30.4 % y en el tratamiento hormona/ablación (grupo 4) fue un 35.7 %, en folículos medianos (6-10 mm de diámetro), no hubo diferencia ($p>0.05$) en los dos primeros grupos, en comparación al grupo 3 fue de un 47.8 % y en el grupo 4 fue un 50 %. El mayor número de folículos grandes (≥ 10 mm de diámetro) se encontró el grupo 3, un 21.7 %; seguido por el tratamiento control y ambos grupos fueron más altos de los protocolos de ablación (grupo 2) y hormona/ablación ($p<0.05$).

Tabla 6 Tamaño de folículos observados en los grupos de tratamientos (n=12)

Tamaño de Folículos	Control (Grupo 1) n / %	eCG+P4+BE (Grupo 2) n / %	Ablación (Grupo 3) n / %	eCG+P4+Ablación (Grupo 4) n / %
<6 mm	33 / 62.3 ^a	5 / 35.7 ^b	7 / 30.4 ^b	5 / 35.7 ^b
6 a 10 mm	12 / 23.1 ^b	7 / 50 ^a	11 / 47.8 ^a	7 / 50 ^a
≥ 10 mm	8 / 15.1 ^b	2 / 14.3 ^b	5 / 21.7 ^a	2 / 14.3 ^b
Total de folículos observados	53	23	49	14

Nota: b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p>0.05$)

El número de folículos y valores porcentuales según tamaño, donde se obtuvieron para el grupo de Ablación, el 71.4 % para folículos < 6mm, 22.5 % para folículos de ≥ 6 a <10 mm y 13 % de folículos mayores a ≥ 10 mm, estos resultados



comparados con Seneda, et al. (2001), quienes reportan en vacas Holstein 64.2% de folículos <4mm (pequeños) y 35.8 % de folículos >4mm (grandes), son ligeramente superiores en la presencia de folículos <4mm e inferiores en folículos >4mm. Esta diferencia se debería a que los autores trabajaron con la raza Holstein y en un ambiente cálido, a diferencia nuestra que se trabajó en meses secos (mayo-junio) y a una altura 3974 m.s.n.m.; además rescatando que en el ganado *Bos taurus*, el efecto de desarrollo folicular parece más pronunciado durante los meses más cálidos (Zeitoun, et al., 1996).

Los resultados obtenidos en el grupo 2 (eCG) se ha estimado el 30.4 % para folículos < 6mm, 47.8 % para folículos de 6 a 10 mm y 21.7 % de folículos mayores a >10mm, comparados con Ribas, et al, (2018) que obtuvieron un 19% folículos de <6mm; un 44.4% de folículos de 6 a 10 mm y 36.6% folículos > 10 mm. Estos resultados contrastados con el presente trabajo se observa una superioridad en cuanto a los folículos de < 6 mm, pero inferior en los folículos >10 mm; ya que utilizaron un protocolo similar al presente estudio, pero trabajaron con la raza Bradford, y la diferencia por el número de vacas tratadas. Letters, (2018) obtuvo un 46.92 % folículo de 3 – 4 mm; 30.77 % de folículos de 5 – 6 mm y 23.07 % de folículo >7 mm, contrastados con los folículos de <6 mm y 6 – 10 mm, resultados similares al presente estudio, este autor trabajo con dosis de 2000 UI de eCG y con vacas Grises Rumanas.

En el presente trabajo de investigación se encontró una predominancia de folículos pequeños sobre folículos grandes, de igual manera Bols et al. (2004) mencionan haber hallado una mayor cantidad de folículos pequeños (< 5mm) 74.4% en relación a folículos grandes (\geq 5mm) con 25.6 %. Esta predominancia de folículos pequeños está dada por causa de la dominancia de un folículo, el que va inhibir el crecimiento del resto de folículos, ya que en el reclutamiento solo se consideran folículos menores a 4-5 mm (Moussa, et al. 2015).

4.2. Numero de folículos ováricos.

En la tabla 7, se muestra los promedios del total de folículo visualizados en ambos ovarios por tratamientos. El promedio de folículo presentes en el grupo1, fue de 9.33 ± 4.04 con un coeficiente de variabilidad de 79.46 %; en el grupo2, de 7.00 ± 3.00 , con un coeficiente de variabilidad de 43.30 %, para el grupo 3, fue 6.33 ± 5.03 , con un coeficiente de variabilidad de 42.86 % y para el grupo 4, fue un 6.83 ± 4.20 , con un coeficiente de variabilidad de 42.98 %. Estos valores promedios del número total de folículos presentes en los ovarios por tratamiento, resultaron ser estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Tabla 7 Numero de folículos visualizados en vacas Brown Swiss por tratamiento.

Tratamiento	n	X \pm D.S.	C.V. (%)	Min. - Max.
Control (<i>Grupo 1</i>)	3	9.33 ± 4.04^a	25.46	7.00 - 14.00
Con hormona (<i>Grupo 2</i>)	3	7.00 ± 3.00^b	23.30	4.00 - 10.00
Ablación (<i>Grupo 3</i>)	3	6.33 ± 5.03^b	22.86	1.00 - 10.00
Hormona/ablación (<i>Grupo 4</i>)	3	6.83 ± 4.20^b	22.98	1.05 - 10.00

Nota: b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p < 0.05$)

En el grupo 2, se visualizaron 7.00 ± 3.00 folículos. Siendo estos datos inferiores a los reportados por Aller, *et al.*, (2012) reportaron una media de 9.6 ± 0.9 folículos con la aplicación de eCG en la raza Angus; mientras que Sait *et al.*, (2008) reportaron una media de 13.8 ± 7.7 con aplicación de FSH y 7.7 ± 5.6 con aplicación de eCG en la raza Holstein



Mercado, (2015) obtuvo, 11.00 folículos promedio, utilizando en su protocolo la progesterona combinado con estrógenos y Viera *et al*, (2014) con 17.6 ± 1.6 folículos en donantes lactantes y 16.7 ± 1.5 en donantes no lactantes, ya que utilizaron en su protocolo de estimulación folicular la FSH, además utilizo vacas de la raza Holstein.

Ongoratto (2016), obtuvo una media de 11.8 ± 1.14 de folículos observados, resultados superiores, utilizando un protocolo similar al presente estudio, con la diferencia de dosis de eCG que fue de 800 UI en la raza Brangus y Angus. Sendag (2008), obtuvo 7.7 ± 5.6 , utilizando una dosis de 3000 UI de eCG, en la raza Holstein. Entre tanto Chong *et al.*, (2008) utilizo la estimulación intraovarica con eCG 900 UI teniendo mejores resultados en el desarrollo folicular $8,33 \pm 0,6$ y se pudo mejorar los resultados obtenidos por punción folicular guiada por ultrasonografía. Los resultados del presente estudio son inferiores a los autores indicados posiblemente se deba al método de sincronización de la onda folicular de cada uno de los animales ya que se hizo mediante punción in vivo.

Diferentes estudios realizados se centran en buscar diferencias entre vacas del género *Bos Taurus* y *Bos indicus* (tipo cebuino) Algunos autores describen un mayor número de folículos visualizados y reclutados para OPU en animales *B. indicus* Basurelli, (2012), frente a otros que describen un mayor número de folículos de tamaño grande en las razas europeas (Bols, 2001). Un estudio realizado sobre el mismo número de animales *B. indicus* y *B. taurus*, mantenidos en iguales condiciones ambientales y de nutrición, concluye que los animales del género *B. indicus* presentan un mayor número de folículos visualizados, un mayor número de ovocitos aspirados por sesión y un mayor porcentaje de división y supervivencia de blastocistos en día 7. En cuanto a sus cruces, se concluye que presentan una tasa superior de ovocitos recolectados por sesión



de OPU, frente a las razas puras y un porcentaje superior de embriones producidos *in vitro* (Boni, 2012).

La diferencia fue un reflejo de la mayor población de folículos antrales reportados en *Bos indicus* en comparación con Ganado *Bos taurus* (Bó, et al., 2003)

Viana *et al.*, (2009) sostienen que las sucesivas aspiraciones foliculares alteran la dinámica folicular, el grupo de las vacas con control hormonal (7.00 ± 3.00) fue similar estadísticamente, posiblemente se deba a la aplicación inicial del benzoato de estradiol suministrada (2 mL), creando concentraciones similares de progesterona y estrógeno en la circulación sanguínea, para que los tratamientos con estradiol sean efectivos. Bó, (1999) indica que se esperaba un día para inyectar el estrógeno después de la colocación de un progestágeno (CIDR) o administrar progesterona o progestágeno inyectable junto con el estradiol, en el momento que se coloca el implante.

En el grupo 3, donde se utilizó la ablación folicular, se obtuvo un promedio de 6.33 ± 5.03 folículos visualizados, siendo estos datos contrastados con Bergfelt et al. (1994) que obtuvieron 5.1 ± 0.5 folículos visualizados, resultados inferiores al presente estudio esta diferencia se debió a que utilizaron vaquillas.

Barretero, (2015) reportó resultados de 11 folículos en trabajos realizados en vacas de raza Holstein seleccionadas de acuerdo al número de partos, buena condición corporal y no presentaban problemas productivos y sanitarios. Con un tratamiento hormonal de benzoato de estradiol (3.6 mg) más un implante DIB® (1.0g de progesterona), estos resultados son superiores a los valores obtenidos en el presente estudio que se deberán a dos causas. Al uso de implante de (PRO-CICLAR) con 750 mg de progesterona, no fue suficiente para el adecuado control endocrino (feed back negativo a LH) en las vacas multíparas seleccionadas para el presente experimento; otro

aspecto, para el presente estudio se utilizó vacas de la raza Brown Swiss a una altitud de 3974 m.s.n.m. (SENAMHI, 2018).

En el grupo 4; se obtuvo una media de 6.83 ± 4.20 folículos visualizados, resultados comprados con Ongorato (2016) quien obtuvo en dos estudios 13.6 ± 12 y 15.4 ± 1.2 folículos, que son resultados superiores del presente estudio, que se debería al uso de vacas de las razas de Brangus y Angus, con diferente tipo de protocolo de sincronización donde utilizaron una dosis de 800 UI de eCG, y la ablación lo realizó a los 3 días después iniciado su protocolo.

Al respecto Jiménez, (2009) indica que el éxito para realizar un tratamiento superovulatorios en las vacas es el estatus ovárico a un inicio del tratamiento.

4.3. El número de ovocitos obtenidos mediante la aspiración folicular

En la tabla 8, se muestran los promedios de ovocitos recuperados por tratamientos. El promedio de ovocitos recuperados en el grupo 1 fue de 1.70 ± 1.15 , con un coeficiente de variabilidad de 69.88 %; en el grupo 2 de 3.00 ± 2.65 , con un coeficiente de variabilidad de 88.19 %, en el grupo 3 de 1.67 ± 1.15 , con un coeficiente de variabilidad de 69.28 % y en el grupo 4 de 1.67 ± 1.15 , con un coeficiente de variabilidad de 69.28 %. Estos valores promedio de ovocitos recuperados por tratamientos, resultaron ser estadísticamente no significativos ($P < 0.05$).

Tabla 8 Número de ovocitos recuperados mediante OPU en vacas Brown Swiss (n=12)

Tratamiento	X \pm D.S.	Tasa de recuperación (%)	C.V. (%)	Min. - Max.
Control (Grupo 1)	1.70 ± 1.15^a	19.93	29.89	1.00 - 4.00
Con hormona (Grupo 2)	3.00 ± 2.65^a	49.20	28.19	1.00 - 6.00
Ablación (Grupo 3)	1.67 ± 1.15^a	44.43	29.28	1.00 - 3.00
Hormona/ablación (Grupo 4)	1.67 ± 1.15^a	7.56	29.28	1.00 - 3.00

Nota: b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p < 0.05$).



El número promedio de ovocitos recuperados, en protocolo hormona (grupo 2) fue mayor que en los demás protocolos ($p > 0.05$). La tasa de recuperación de ovocitos, definida como el porcentaje de ovocitos recuperados por el número total de punciones, en el protocolo hormona (grupo 2) se obtuvo 49.20 %, con una media de 3.00 ± 2.65 ; comparados estos resultados con Sendag (2008) donde obtuvo 6.2 ± 4.8 , con un índice de recuperación de 80.7 % que son superiores a los resultados obtenidos en el presente estudio, esta diferencia se debería a que el autor trabajó con la raza Holstein y con una dosis de 3000 UI de eCG. También Sait *et al.*, (2008) reportó una media de 10.3 ± 5.0 con aplicación de FSH y un 6.2 ± 4.8 con aplicación de eCG. Ribas (2018) obtuvo tasas de recuperación de 64.1 ± 4.0 % con una dosis utilizada de 800 UI de eCG y 76.6 ± 3.6 % con dosis de 200 UI de eCG, en razas Braford. Las dosis superiores a 800 UI de eCG pueden causar una sobreestimulación excesiva del desarrollo folicular y, como consecuencia, interferir con la recolección de ovocitos o disminuir la respuesta con el uso repetido de eCG en el ganado (Ginther, et al, 2001),

Sin embargo Ongaratto, (2016), obtuvo una tasa de recuperación de 7.5 ± 0.8 . superiores al presente estudio, esta diferencia se debe que ellos trabajaron con la raza Brangus y Angus, pero diferente protocolo de estimulación folicular, utilizando una dosis de 800 UI de eCG, Letters, (2018) obtuvo 84.61 ± 2.2 % con una media de 11.36 ± 0.3 , resultados superiores al presente estudio, esta diferencia se debe a que el autor trabajó con dosis de 2000 UI de eCG y con vacas grises rumanas. Las razas europeas poseen aparentemente una mayor cantidad de folículos comparados con el Cebú y los animales mestizos (Domínguez, 1995).

Aller et al. (2012), informaron que hubo un efecto positivo del uso de eCG (1600 UI) en vacas Angus preñadas que tenían terneros lactantes.



En el grupo 3, se obtuvo una media de 1.67 ± 1.15 ovocitos, con una tasa de recuperación de 44.43 %, al comprar con Letters, (2018) donde obtuvo 66.06 ± 1.9 % con una media de 4.20 ± 0.2 , resultados superiores al presente estudio, esta diferencia se deberá a que el autor trabajó en vacas grises rumanas

En el grupo 4; con una tasa de recuperación de 37.56 ± 17.30 %, con un promedio de 1.67 ± 1.15 ovocitos recuperados, comparados con Ongaratto et al. (2016) donde obtuvieron 8.3 ± 0.9 que son superiores a los resultados del presente trabajo, que utilizó diferente protocolo de sincronización, además trabajó con la raza Brangus y Angus y con dosis de 800 UI de eCG.

No fueron observadas las diferencias significativas entre los grupos evaluados con respecto al total de ovocitos colectadas por aspiración folicular. Sin embargo, en trabajos realizados por (Pérez-Sandoval., 2019) estudiaron que el uso de la ablación folicular aumenta el porcentaje de folículos óptimos por consiguiente embriones de calidad.

Para los resultados del presente trabajo, la ablación no representó una excelente estimulación del crecimiento folicular tras la sincronización inicial de la dinámica folicular, con dos dosis de prostaglandina $F2\alpha$. El grupo sometido a tratamiento hormonal numéricamente tuvo mejores resultados (3.00 ± 2.65) en el número de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular es posible que la fuerza de aspiración pudo ser más favorable para el cúmulo de estos ovocitos, debiéndose principalmente a la acción de la combinación de los esteroides prostaglandina y benzoato de estradiol para sincronizar el inicio de una onda de crecimiento folicular, (Mapletoft, 2013) hace referencia sobre el efecto supresor de la prostaglandina $P4$ sobre la liberación de

gonadotropinas hipofisiarias principalmente sobre la LH, unido a la atresia folicular causada por el estrógeno E2.

4.4. Calidad de ovocitos recuperados mediante aspiración folicular

En la tabla 9, muestra los resultados obtenidos en el grupo 2, grupo 3, de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la calidad de ovocitos obtenidos. No hubo diferencia estadística ($p > 0.05$) de los tratamientos de hormona y ablación en

Tratamiento	Total de ovocitos	Grado 1 N / %	Grado 2 N / %	Grado 3 N / %	Grado 4 N / %
<i>Control (Grupo 1)</i>	6	3 / 50	0	0	3 / 50
<i>Con hormona (Grupo 2)</i>	9	3 / 33.33	1 / 11.11	5 / 55.55	0
<i>Ablación (Grupo 3)</i>	5	2 / 40	1 / 20	2 / 40	0
<i>Hormona/Ablación (Grupo 4)</i>	5	0	0	2 / 40	3 / 60
Total	25				

comparación con el grupo control. Las distribuciones de ovocitos según los grados morfológicos, como porcentaje del total de ovocitos recuperados.

Tabla 9 Número de ovocitos obtenidos según calidad, recuperados por OPU.

En el grupo 3, se obtuvo 5 ovocitos recuperados, donde fueron categorizados como grado 1, un 40 %; 20 % de grado 2; 40 % de grado 3. Estos resultados comparados con Letters, (2018) donde obtuvo 31.3 % de grado 1; 33.8 % de grado 2; 32.5 % de grado 3 y 2.5 % de grado 4, trabajo en vacas grises rumanas, contrastados estos resultados, donde son similares en el grado 1 y 3, pero inferiores en el grado 2.

En el grupo 2 de tratamiento con hormona (eCG) se tuvo la recuperaron de 9 ovocitos tras OPU, 22.33 % de grado 1; 11.11% de grado 2 y 55.56% de grado 3. Estos resultados fueron comparados con Ribeiro, et al, (2011) quienes obtuvieron



16,38±15,21 ovocitos recuperados de los cuales el 31.25 % ovocitos fueron de grado 1; 12.5 % de grado 2; 31.25 % de grado 3 y 25 % ovocitos expandidos, comparados estos resultados a los valores encontrados en el presente trabajo, donde son similares en el grado 2; menores en grado 1 y superiores en grado 3. Esto debido tal vez a la presión de aspiración utilizada, donde no se pudo mantenerse entre 70 a 80 mmHg, disminuyendo la cantidad de ovocitos viables.

Mientras, Sendag (2008), obtuvo con un similar protocolo se superestimulación, pero utilizando una dosis de 3000 UI de eCG, además utilizó una aguja con calibre de 17, donde tuvo resultados de 15.9 % de grado 1; 17 % de grado 2; 54.6 % de grado 3 y 12.5 % de grado 4, comparado estos resultados a los valores encontrados en el presente trabajo, 22.33 % de grado 1; 11.11% de grado 2 y 55.56% de grado 3. Similares en grado 3 y mucho mayor en grado 1 y 2. Esta superioridad de ovocitos viables se debe a la utilización de una aguja calibre de 18, además, Bols *et al.* (1997) obtuvieron las mayores tasas de recolección con las agujas de mayor diámetro (18G). Aller *et al.*, (2012) obtuvo con la aplicación de eCG del 34.2% en la raza Angus. Letters, (2018) obtuvo 34.1 % de grado 1; 30.0 % de grado 2; 24.2 % de grado 3 y 9.4 % de grado 4, trabajando con vacas grises rumanas con una dosis de 2000 UI; que son resultados inferiores al presente estudio,

Respecto a trabajos realizados por Betancur *et al.*, (2011) quien obtuvo 57% de folículos de primer grado utilizando FSH-hCG, y 28.6% de segundo grado, estos resultados son superiores a los resultados obtenidos en el presente trabajo, lo que debería a la acción de la aplicación de 0.150mg de D(+)-cloprostenol (Prostal®, I.M) al momento de retirar el dispositivo intravaginal, y al día siguiente aplicó 1 mg (I.M) adicional de benzoato de estradiol, cuatro días después se realizó la aspiración folicular. Y 14.4% de folículos fueron de tercer grado lo cual es inferior a los resultados



obtenidos en el presente trabajo (55.56%), se debería principalmente al factor operario. 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. En Cuba, Chong *et al.* (2008) reportaron un incremento significativo en el número de folículos puncionados y ovocitos recolectados al estimular las donantes con eCG. Con el método usado para sincronizar la onda folicular mediante ablación fue de 50% de folículos de primer grado, (50% de grado 3).

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 2 mm (Kruip *et al.* 1994). Sin embargo, se han encontrado en algunos animales baja actividad ovárica (Bousquet *et al.* 2000) en los cuales se hace necesario utilizar una combinación de FSH-LH o de gonadotropina eCG (gonadotropina criónica equina), 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. En Cuba, 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.

Las tasas de recuperación de ovocitos son mayores cuando la OPU se realiza en los folículos ≥ 4 mm pero menores a 10 Martínez *et al.* (2005) demostraron que la aplicación de BE y P4 producen la atresia folicular y el comienzo de una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después. Por lo tanto, la siguiente aspiración en el día 6 de tratamiento coincide con el día 2 de la onda folicular que posee una alta población de folículos que tienen entre 5 y 7 mm de diámetro disponibles en el momento de la OPU, según lo sugerido por (Seneda *et al.* 2001).

Otros autores (Goodhand *et al.* 2000, De Roover *et al.* 2008) 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.* 1997), 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.

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.



V. CONCLUSIONES

1. El efecto de la ablación folicular representa un valor significativo con una tasa de recuperación de 44.43%, donde se obtuvieron calidades de ovocitos de grado 1, 2 y 3, por aspiración folicular (OPU).
2. En la estimación de la tasa de recuperación de ovocitos con estimulación hormonal utilizando eCG se obtuvo una tasa de 49.20%. obteniendo calidades de ovocitos de diferentes grados (1, 2 y 3) que son ovocitos viables para realizar FIV. Ya que con este tratamiento también, se observa mejores folículos de 6 mm a 10 mm para la aspiración folicular (OPU).



VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el presente estudio, trabajando con un número mayor de animales, durante el experimento para poder así tener mayor cantidad de ovocitos y evaluando la calidad de cada una de ellas, utilizando los tratamientos de ablación y estimulación hormonal.
- Se recomienda realizar tratamientos similares hasta la verificación de la calidad de ovocitos, y demostrar el proceso de fecundación y nacimiento de crías mediante esta técnica de OPU.
- Se recomienda utilizar diferentes dosis de eCG, para observar la estimulación ovárica y evaluar la calidad de ovocitos obtenida. Así mismo trabajar más el estudio de la ablación folicular como otra opción de estimulación ovárica, en nuestro altiplano peruano.
- Realizar mayor cantidad de sesiones de aspiraciones por vaca, y estandarizar cada tratamiento utilizado.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl*, 54, 17-32.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP et al 1992^a. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94:177–188
- Aguilar, G.E. 2008. Sincronización de celos en vacas lecheras. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Mexico.
- Alvarez, R., & restrepo, G. 2006. Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción de animales. *universidad CES, medellen*, vol (30). medallin, Colombia.
- Alvaro, F. T. 2003. *Reproducción bovina de carne*. Montevideo-Uruguay: departamento de la reproducción animal, Facultad veterinaria. Montevideo, Uruguay.
- Aller, J. F.; Mucci, N.C.; Kaiser, G.G.; Callejas S. S.; Alberi, R.H. 2012. Efecto de los tratamientos eCG repetidos y la recolección de óvulos en la respuesta ovárica y la recuperación de ovocitos durante el embarazo temprano en vacas lactantes. *Anim. Reprod. Sci.* 133,10-15.
- Baracaldo, M.I.; Martinez, M.; Adams, G.P. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53:1239–1250
- Baruselli, P.S.; Sa Filho, M.F.; Ferreira, R.M.; Sales, J.N.S.; Gimenez, L.U.; Vieira, L.M.; Mendanha, M.F. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Dom Anim.*, 47(4), 134–141.
- Barreto, A.M. 2015. Efecto del estradiol y el factor liberador de gonadotropinas sobre la dinámica folicular de vacas holstein. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Barros CM, Nogueira MFG. 2001. Embryo transfer in *bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 56: 1483-1496.



- Bergfelt, D.R.; Lightfoot, K.C.; Adams, G.P. 1994. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42:895–907
- Betancur, Giovanni Restrepo, Jorge Gómez Oquendo, and Neil Vasquez Araque. (2011). "Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular." *Revista Politécnica ISSN* (13): 16–21.
- Blondin P, Sirard MA. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. *Molecular Reproduction Development* 41: 54–62.
- Blondin, P.; Guilbault, L.A.; Sirard, M.A. 1997. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*. 48: 803–13.
- Blondin, P.; Vigneault, C.; Nivet, a., & Sirard, M. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far. *Animal Reproduction*, 9(3):281-289.
- Bo GA, A. G. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43:31–40.
- Bó, G.A.; Adams, G.P.; Caccia, M.; Martínez, M.F.; Pierson, R.A.; Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 39: 193-204.
- Bó, G. A. y R. J. M. 1999. Control del desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones. *Sitio Argentino de Producción Animal Tos*, 1(1), 2–11.
- Bo, G. M. 2000. Artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulate with estradiol benzoate or GnRH . *En: proc. 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, 34-42.
- Bo, G. 2002. Dinámica folicular y tratamientos hormonales para la sincronizar la. *XI Congreso Venezolano de producción e Industria*, 1-5. venezuela.
- Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Martínez, M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*. 78:307-26.



- Bo' GA, P. B. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* , 65: 89–101.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF. 1991. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35: 5-17.
- Bols, P.E., Ysebaert, M. T., Van Soom, A., Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47,1221-1236.
- Bols, P. 2001. Punción folicular (Ovum Pick-Up, OPU) en la vaca. En: Palma G. A. *Biología de la reproducción*. 1ª ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ©Gustavo A. Palma.
- Bols, P. E., J. L. Leroy, T. Vanholder & A. Van Soom. 2004. A comparison of a mechanical sector and linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 62, 906-914.
- Bols, P. 2005. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Verhandelingen Van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Delgie LXVII nr. 3*, blz. 177-202.
- Bols, P.; Jorssen, E., Goovaerts IGF, Langbeen A, Leroy JLMR. 2012. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. 420–5.
- Boni, R. 2012. Ovum Pick-Up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. Department of Animal Science, University of Basilicata, Potenza, Italy. *Anim Reprod.*, v.9, n.3, p.362-369
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51: 59–70.
- Bousquet D., T. H. 2000. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51:59-70.
- Burke, C. M. 2003. Estradiol benzoate delay new follicular wave emergence in a dose dependet manner after ablation of the dominant ovarian follicle in catle . *Theriogenology* , 60:647-658.
- Byskov, A. 1982. Primordial germ cells y regulation of meiosis. En reproduction in mammals,. *Cambridge university*, 1-16.



- Caixeta, E., Ripamontec, P., Franco, M., Buratini, J., & Dode, M. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction Fertility and Development*, 21: 655–664.
- Chasombat, J. N. 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, in vitro embryo production and repeated oocyte pick up in thai native heifers undergoing superstimulation. *Asian-Australasian journal of animal Sciences*, 26(4), 488-500.
- Chaubal, S.A.; Ferre, L.B.; Molina, J.A.; Faber, D.C.; Bols, P.E., Rezamand, P.; Tian, X.; Yang, X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67: 719-728.
- Chong, M.; Denis, R.; Emilia, R.; Lliteras, C.; Gallego, Fuentes, D.; Ada Pérez & Del Valle, C. (2008). Efecto de la estimulación intraovárica con ecg sobre la población folicular y la recolección de ovocitos por punción in vivo. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 2: 39-41.
- Cupp, A., Stumpf, T., Kojima, F., Werth, L., Wolfe, M., Roberson, M., Kinder, J. 1995. Secretions of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. *Anim Reprod Sci*, 37:109–19.
- Day, M., Burke, C., Bunt, C., & Macmillan, K. 2000. Use of a low dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *Anim Sci*, 78:145–51.
- De Roover, R. G. 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 Roover, R. F. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and fsh stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. . *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 239-245.
- 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. Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal. La Habana, Cuba.



- Denis, R.G., Aguilar, A.F., Digo, E.L., Herman, I., Fuentes, D.S., Vignon, X., Bernal, A.S., Lliteras, Emilia, Chong, M.G., González, A.P. 2005. Introducción en Cuba de la técnica de punción folicular *in vivo* [CD-ROM]. En: Memorias del III Congreso de Mejoramiento Animal.
- Denis, R. 2008. Aspiración folicular *in vivo* (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencias y Tecnología Ganadera*, 2: 57-70
- Dieleman, S.J.; Bevers, M.M. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of 58 ovulations in PMSG/PG-treated cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81: 533-42.
- Diskin, M.; Austin, E. & Roche, J. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 211-228.
- Donaldson, L.E. 1989. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*, 31: 183.
- Douar, C. 1998. Effect de la composante maternelle sur le developement *in vitro* de l'embryon bovin. . *Maitrise Sciences Vétérinaires. Physiologie de la Reproduction. Ecole Nationale Vétérinaire Maison-Alfort*, 17-24.
- Durocher, J.; Morin, N.; Blondin, P. 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*, 65: 102-115.
- Eppig, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829-838.
- Fair, T. H. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod , Dev.* 42:437-442.
- Fair, T.; Lonergan, P. 2012. The Role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reproduction in Domestic Animal* 47:142-147.
- Fernandez, A. 2003. Dinamica folicular: funcionamiento y regulacion. *Departamiento de reproduccion animal. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Argentina*, 142-160



- Fortune, J.; sirois, J.; Turzillo, A., & Laver, M. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 43 (Suppl 1): 187.
- Fry, R. C. 1997. the collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, Vol. 47: 977-987.
- Galina, C. Y. 2008. *Reproducción de animales domésticos*. . Mexico: Limusa.
- Galli, C. D. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599–616.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *heriogenology*, 55:1341–57.
- Gigli, I. A. 2006. *Consideraciones de la dinamica ovarica en Equinos, Bovinos y CSA*. Buenos Aires-Argentina: Rev. Fac. Med. Vet. Area de theriogenologia.
- Ginther O.J., B. M. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, 65: 638- 647.
- Ginther, O. J. 1996. Selection of the dominant follicle in catle. *En: Biology of Reproduction*, Vol. 55. P. 1187-1194.
- Ginther, O.; Beg, M.; Donadeu, F.; Bergfelt, D., & Kot, k. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. , Sci.* (78): 239-257.
- Ginther, M.M., y Hoffman, J. O. (2014). Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. *Theriogenology.*, 1(82), 169-175.
- González - Stagnaro C., P. R. 2003. Control del ciclo em vacas y novillas en el medio tropical. En: Bovis (Sincronización del celo para la inseminación artificial en ganado extensivo). *Theriogenology*, 115:3 – 67.
- Goodhand, K.L., Watt, R.G.; Staines, M.E.; Hutchinson, J.S.M.; Broadbent, P.J. 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.; Staines, M.E.; Hutchinson, J.S.; Broadbent, P.J. 2000. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. *Animal Reproduction Science* 63: 145-158.
- Hafez, E., Jainudeen, M., & Rosnina, Y. 2004. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. *In Reprodução Animal.*, 3: 33-53.



- Hagemann LJ. 1999a. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51: 449-59.
- Hagemann, L.J.; Beaumont, S.; Berg, M.; Donnison, M.; Ledgard, A.; Peterson A.; Schurmann. A.; Tervit, H.R. 1999b. Development during single IVPs of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction Development* 53: 451- 458.
- Hanenberg EHAT, van Wagtenonk-de Leeuw AM. 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collections for *in vitro* embryo production results. *Theriogenology* 47: 158.
- Hashimoto, S. T. 1999. Ultrasound-guide follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. . *Theriogenology* , 52:131.
- Hazeleger N.L., H. D. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocyte to their developmental potential *in vitro*. *theriogenology*, 52:131.
- Henao, G. 2010. Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *Bos indicus*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, vol. 63, num. 2. Universidad Nacional de Colombia. Medellín pp. 5577 – 5586.
- Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61: 909 -920.
- Ireland, J.J.; Smith, G.W.; Scheetz, D.; Jimenez-Krassel, F.; Folger, J.K.; Ireland J.H.; Mossa, F.; Lonergan, P.; Evans, A. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 23: 1-14.
- Jiménez, C. 2009. Superovulación : estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. *Red.Med.Vet.Zoot*, 56, 195–214.
- Johnson, A. L. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod*, Sci 84 (78), 185-201.
- Kastka, L., & Rynska, B. 1998. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology*, 50: 213-222.



- Kastelic JP, Ginther OJ. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci.* 26(1–2):13–24
- Kruip, T.M.; Boni, R.; Wurth, Y.A., Roelofsen, M.M.; Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pickup for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-684.
- Kuwayama, M. 1933. In vitro fertilization and developmenet of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors. *Theriogenology*, 39.
- Lamb, G. M. 2009. Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle. *North Florida Research and Education Center, University*, 54-60.
- Letters, R. 2018. Follicle deviation and oocyte recovering by ovum pick-up from endangered Romanian Grey cows. *Biotechnological*, 23: 13918-13926
- Lopez, H., Satter , L., & Wiltbank , M. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 81:209–23.
- Macmillan, k., & Thatcher, W. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, (45):883-889.
- Mapletoft, C. M. 2003. The use of controlled internal drug realease device for the regulation of bovine reproduction . *J. Anim. SCI.*, 12(81), 28-36.
- Mapletoft, R.J.; B. G. (2013). Innovative strategies for superovulation in cattle. *Anim Reprod.*, 10(3), 174–179.
- Martinez M.F., Adams, J., & Kastelik, B. R. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, 4:757-769.
- Mcgee, E., & Hsueh, A. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *ndocr.Rev*, 21: 200-214.
- Mercado, J. 2015. Efecto del estradiol y la hormona gnrh en la dinámica folicular de vacas Holstein de alta producción. UNALM. Lima-Perú



- Merton, J.S. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651–74.
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Smith, G., Lonergan, P., Evans, A., & Ireland, J. 2010. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Society for Reproduction and Fertility*, ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899.
- Moussa, M., J. Shu, X. H. Zhang, & F. Zeng. 2015. Maternal control of oocyte quality 1192 in cattle “a review. *Elsevier; Animal Reproduction Science*; 17 pp.
- Murakami, M.; Perez, O.; Ferguson, 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. 2011. La reserva folicular. *IX Simposio Internacional de Reproducción. Cordova - Argentina.*
- Nasser, L.F.; Adams, G.A.; Bo G.A.; Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-24.
- Nasser, L.F.; Sá Filho, M.F.; Reis, E.L.; Rezende, C.R.; Mapletoft, R.J.; Bó G.A.; Baruselli, P.S. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 15, 76:320-327.
- Nava, T. H., & Hernández, F. H. 2005. Aspiración folicular transvaginal. *Manual de Ganadería Doble Propósito*, 611–614.
- Nibar,t M.; Marquant-Le Guienne B. 1995. Production d’embryonset de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elev Insémin*, 266:1-23.
- Noseir, W. 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:20.
- Ongaratto, F.L.; Tribulo, A.; Bó, G.A. 2016. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte



- complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. *Animal Reproduction*, 12: 876-883
- O'Mara, F. P. 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 7–15.
- Pedroso, R. 1999. Manual de procedimiento para la ISE y resincronización para mejorar la fertilidad de las hembras bovinas. *La Habana: CIMA*, 1-45.
- Peña, M. A. 2011. El papel de las donadoras de las receptoras y de los detectores de celo (machos y hembras) en la superovulación y transferencia de embriones. *CBB CORPOICA C.I.*, 14-24.
- Pérez-Sandoval, L., Dubeibe-Marín², E. D., Chávez-Rodríguez¹, M. S. A., & Velasco-Acosta¹, J. G.-J. M. D. 2019. Respuesta superovulatoria en vacas donantes Brahman usando ablación folicular previo a protocolos de superovulación. *Revista MVZ Córdoba*, 24(2), 7203–7208.
- Pfeifer, L.F.; Schneider, A.; Castilho, E.M.; Luz, E.M.; Ataíde, P.F.; Dionello N.J.; Pivato, I.; Rumpf, R.; Corrêa, M.N. 2005. Efeito da progesterona exógena em vacas doadoras de ovócitos sobre o desenvolvimento folicular e a produção *in vitro* de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 33: 184.
- Pieterse, M.C.; Kappen, K.A.; Kruip, T.A.; Taverne, M.A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30: 751 - 762
- Pieterse, M. K. 1991. Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. . *Theriogenology*. 80 (30) , 751-762.
- Pieterse, M.C.; Vos, P.L.; Kruip, T.H.; Wurth, Y.A.; van Beneden, T.H.; Willemsse A.H.; Taverne, M. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in PMSG-treated cows. *Theriogenology* 37: 273.
- Rajkovic, A., Panjas, S., & Matzuk, M. 2006. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models In Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction*, 10: 383-422.



- Rhodes, F., Mcdougall, S., Burke, C., Verkerk, G., & Macmillan, K. 2003. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *Dairy Sci.*, 86(6):1876-94.
- Ribas, B. N.; Missio, D.; Roman, R.; Isac N.; Normelio, N.A.; Izaias, J. 2018. Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195: 284-290
- Ribeiro, L.V.P.; Rigolon, L.P.; Cavalieri, F.L.B.; Seko M.B.; Martinez, A.C. 2011. Oocyte recovery and *in vitro* production from cows stimulated with either fsh or ecg. 60 (232): 1021-1029.
- Rivera, F.A.; Mendonça, L.G.; Lopes, G.J.; Santos, J.E.; Perez, R.V.; Amstalden M.; Correa- Calderón, A.; Chebel, R.C. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141:333-42.
- Roche, J., Austin, E., Ryan, M., O'Rourker, M., Mihm, M., & Diskin, M. 1999. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil*, Suppl 54: 61-71.
- Roller, & F. 2006. Induccion, sincronizacion y resincronizacion del celo en hembras bovinas mestizas Holstien x cebu para optimizar los programas de inseminacion artificial. *tesis en opcion al grado de doctoren Ciencia Vterinarias La Habana-CIMA*.
- Sait, S.; Yunus, C.; Muhammet, A.; Klaus-Gerd, H.; Heiner, N. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows *Animal Reproduction Science* 106, 208–214
- Samuel, S. 2001. *Endocrinologia de la reproduccion*. Argentina: Medica Panamericana S.A.
- Sartori, R., & Barros, C. 2011. Reproductive cycles in bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science* , 124: 244-250.
- SENAMHI. 2018. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrologia



- Sendag, C.Y. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. . *Anim Reprod* , Sci, 106:208–14.
- Seneda, M.M.; E. C. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. . *Anim Reprod* , Sci 67:37–43.
- Seneda, M.; Esper, C.; Garcia, J.; Andrade, E.; Binelli, M.; Oliveira, J. & Nascimento, A. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound- guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59, 1435-1440.
- Shaw, D.W.; Good, T.E. 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 53:1521–1528.
- Singh, J.; Dominguez, M.; Jaiswal, R.; Adams, G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62: 227-243.
- Sintex, F. 2005. Fisiología reproductiva del bovino. *laboratorio de especialidades veterinarias*, 08-15.
- Soto, E. P. 1998. *Avances en el manejo reproductivo de la vaca problema en ganadería de doble propósito. En: Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito.* Maracaibo – Venezuela: Edic. Astro Data S.A.
- Stock, A.E.; Fortune, J.E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132(3):1108-14.
- Stroud. 2011. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm. *Embryo Transfer Newsletter*, 29: 14-24.
- Stubbings, R.B.; Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, 43: 705-712.
- Tohei, A., Shi, F., Ozawa, M., Imai, K., Takahashi, H., Shimohira , I., Taya , k. 2001. Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol - 17 β and progesterone in cows with ultrasoundguided follicular aspiration. *J. Vet. Med. Sci.*, 63 : 45-50.
- Viana, A., Palhao, B., Siqueira, C., Fonseca, D., & Camargo, A. 2009. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (Bos



- indicus) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 73 (2010) 966–972.
- Vieira, L. M. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *theriogenology*, 73(7), 966-972.
- Viana, A.; Palhao, B.; Siqueira, C.; Fonseca, D.; Camargo, A. 2009. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 73, 966–972.
- Viana, J. H. 2010. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 73(7), 966–972.
- Vos, P. D. 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.
- Webb, R. G. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science*, 257-284.
- Webb, R.; Gosden, R.; Gong, J.; Campebl, B.; Guitierrez, C.; Garverick, H. & Armstrong, D. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, 61: 71-90.
- Wiltbank, M. C. 1996. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recente information on follicular growth. *Proceedings of the XV anual convention AETA, memorias*.
- Wiltbank, M.C.; Souza, A.H.; Giordano, J.O.; Nascimento, A.B; Vasconcelos JM, Pereira MHC, Fricke PM, Surjus RS, Zinsly FCS, Carvalho PD, Bender RW, Sartori R. 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Animal Reproduction* 9: 231-241.
- Zeitoun, M.M.; Rodriquez, H.F. & Randel, R.D. 1996. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* 45, 1577- 1581.

ANEXOS

ANEXOS A (FORMATO DE TOMA DE DATOS)

Tabla 10 Formato de aspiración folicular en vacas.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE FOLICULO														
	1ra ASPIRACION				2da ASPIRACION				3ra ASPIRACION						
	OVA IZD.	Nº PUNCIÓN	OVA DER.	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	OVA IZD.	Nº PUNCIÓN	OVA DER.	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	OVA IZD.	Nº PUNCIÓN	OVA DER.	Nº PUNCIÓN	OVOCITO
TRATAMIENTO 1 VACA 1	7		5			8		11							
						4		4							
	5		8												
						5		6							
		6			4		4								
		3 (+3)		1											
		5													

ANEXO B TABLAS

Tabla 11 Datos obtenidos del grupo 2 (con hormona), tamaño folicular y número de ovocitos.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE FOLICULO																	
	VACA 1						VACA 2						VACA 3					
	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A		OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A		OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A	
DIV+SA	8	8.68	1	1	1	5.22	13.4	1	1	1	12	5	5	1	1	1		
	7.9	8.63	1	3	1	13.3	8.1	2	1	2	5	5						
	12	5.18				6.94	7.47	3	4	3	7	7						
	10.1	3.7	7			6.01	4.25								3			
	9.12																	
	9.5																	
	8.63																	

Tabla 12 Datos obtenidos del grupo 4 (con hormona + ablación) tamaño folicular y número de ovocitos.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE FOLICULO																	
	VACA 1						VACA 2						VACA 3					
	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A		OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A		OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	Nº PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORI A	
DIV+CA	14	8	1	1	4	CLG	FC	1	1	3	5	7	1	1	1	1	3	
	10	4	4			4		2			8	6	2	2	2	2	4	
	12		4			4					5	8	6	6	6	6	4	

Tabla 13 Datos obtenidos del grupo 1 (control), tamaño de folicular y cantidad de ovocitos.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE FOLICULO																
	1ra ASPIRACION					2da ASPIRACION					3ra ASPIRACION						
	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA		
TRATAMIENTO 1 VACA 1	8.22	6.07	4	1	4	3.7	2	3			9 (CL)	12.59	4	1	4		
	6.04					9.24	2				13.82						
	4.79					4.68	2				10.82						
						3.5	2				7.8						
						4.88	2										
TRATAMIENTO 2 VACA 2	7	14 (FQ)	2			13	18	2			6	23 (CL)	3	1	1		
	3					3				4	11						
	9 (CL)										3						
											3						
											3						
TRATAMIENTO 1 VACA 3	7	5	6	1	4	13	11	3	1	1	7	3	2	1	1		
	5	8				4	4				3	2					
	5	5				5	13 (CL)					3					
	5	6				4	6					2					
	3						4										
	3																
	3																

Tabla 14 Datos obtenidos del grupo 3 (ablación), tamaño folicular y cantidad de ovocito.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE FOLICULO														
	ABLACION					1ra ASPIRACION					2da ASPIRACION				
	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA	OVA IZD. (mm)	OVA DER. (mm)	N° PUNCIÓN	OVOCITO	CATEGORIA
TRATAMIENTO 1 VACA 1	2	2				4.81	3	1	1	3	14 (CL)	2			
	1	2					3					2			
	2	2					3					2			
	2	2					3					2			
	2	2					3								
TRATAMIENTO 2 VACA 2	5.66	12.02	2			6.5	14	3	2	1	7.93	19.18(cl)	3	1	2
						3	6				4.4	3			
						3	3				2	3			
						3(+1)	7				2	3.5			
						2					2	4			
						2(+3)					2				
TRATAMIENTO 1 VACA 3	12 (CL)	5.54	3			7	7	2			10.28	2.26	1	1	3
		6.47				7	10					2.09			
		5.23				7	7					2.34			
						7	5					2.37			
						7	5					0.18			

Tabla 15 Número de ovocitos.

CATEGORIAS	SIN ABLACION		CON ABLACION	
	SIN HORMONA	CON HORMONA	SIN HORMONA	CON HORMONA
	(T0)	(T1)	(T2)	(T3)
1	3	4	2	0
2	0	1	1	0
3	0	4	3	2
4	2	0	0	3
Total	5	9	6	5

Tabla 16 Resumen de los tratamientos y resultados de las aspiraciones.

Código de Protocolo	Control (Grupo 1)	Ablación (Grupo 3)	Hormona (Grupo 2)	Hormona+Ablación (Grupo 4)
Número de animales		3	3	3
Total, número de sesiones de aspiraciones		3	2	1
Número de folículos observados		53	49	23
Total, número de folículos aspirados		29	10	17
Número de folículos/media	9.33 ± 4.04 a	6.33 ± 5.03 a	7.00 ± 3.00 a	7.00 ± 3.00 a
CATEGORIA DE FOLICULOS POR SESION				
<6 mm	33/53 (62.3)	35/49 ((71.4)	7/23 (30.4)	5/14 (35.7)
6 - 10 mm	12/ 53 (22.6)	11/49 (47.8)	11/23 (47.8)	7/14 (50)
>10 mm	8/53 (15.1)	3/49 (13/)	5/23 (21.7)	2/14 (14.3)
Total, número de ovocitos recuperados	6	5	9	5
Número de ovocitos recuperados /media	1.67 ± 1.15 a	1.67 ± 1.15 a	3.00 ± 2.65 a	1.67 ± 1.15 a
Tas de recuperación (%)	19.93 ± 6.67 a	44.43 ± 9.64 a	49.20 ± 31.70 a	37.56 ± 17.30 a
CATEGORIA DE OVOCITOS (grado)				
1/Total %	3/6(50)	2/5(40)	3/9(33)	
2/Total %		1/5(20)	1/9(11)	
3/Total %		2/5(40)	5/9(55)	2/5(40)
4/degenerados	3/6(50)			3/5(60)

Fuente propia 2019

ANEXO C (FIGURAS)

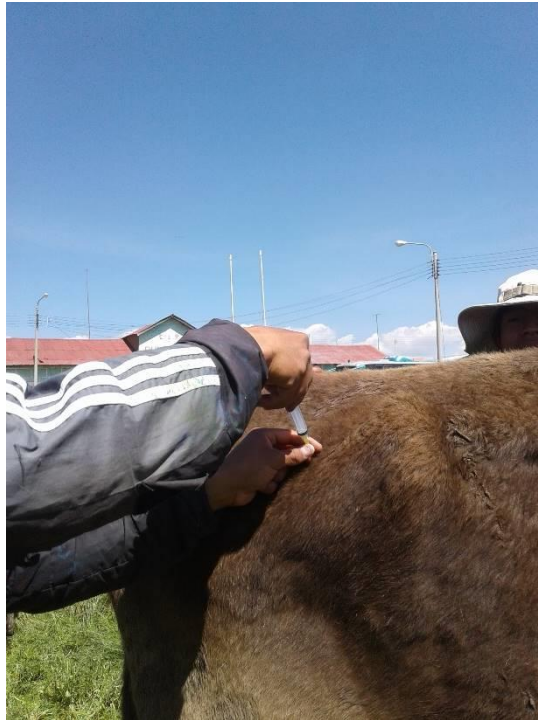


Figura 1 Sincronización de la dinámica folicular, con dosis de prostaglandina F2 α .



Figura 2 Colocación del implante de progesterona intravaginal (día 0).



Figura 3 Aplicación del Benzoato de estradiol.



Figura 4 Administración de eCG (Novormon) al día 4 del tratamiento.



Figura 5 Extracción de los DIV y sujeción de la vaca en un brete.



Figura 6 Administración de la anestesia epidural



Figura 7 Limpieza y desinfección de la región perianal y vulva



Figura 8 Armado del transductor OPU



Figura 9 Introducción del aspirador dentro de la vagina



Figura 10 Visualización de los folículos y medición.



Figura 11 Bomba de vacío a una presión de 75 mm Hg.



Figura 12 Tubo colector



Figura 13 Lavado de las paredes del filtro EMCON con PBS.



Figura 14 Placa Petri conteniendo la solución de PBS más ovocitos aspirados.

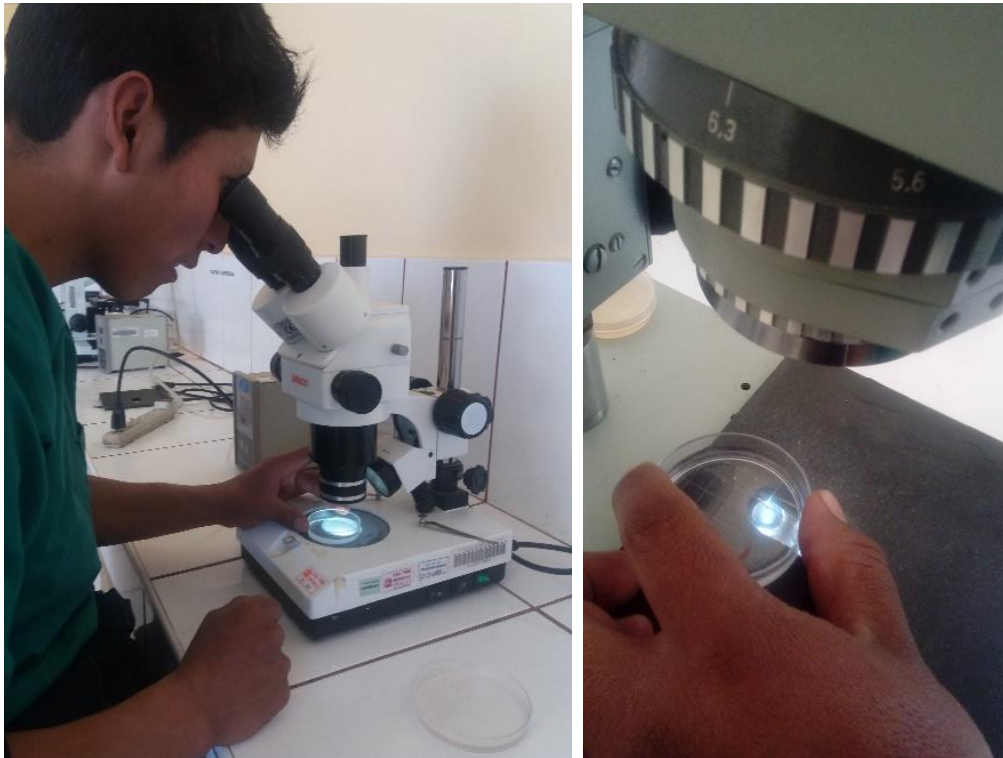


Figura 15 Observación en microscopio con un aumento de 40X a los ovocitos

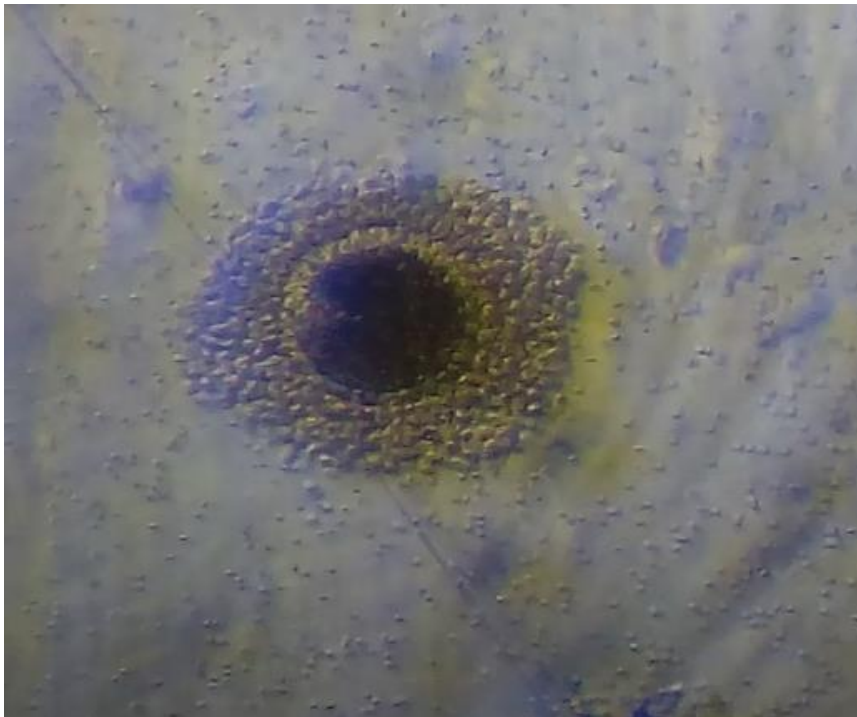


Figura 16 Ovocito de grado 2



Figura 17 Ovocito de grado 1

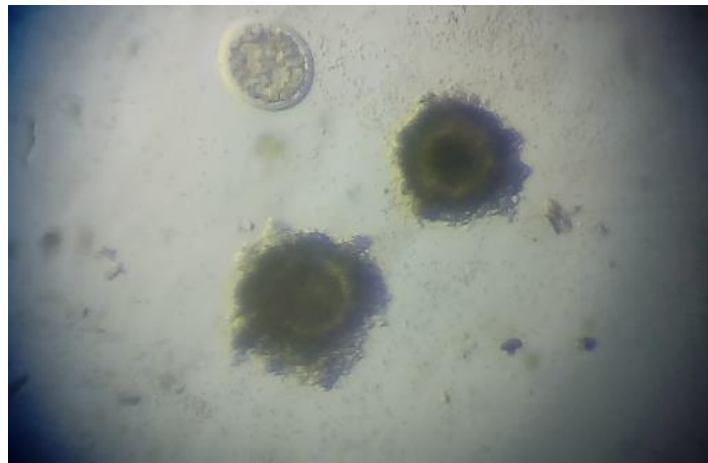


Figura 18 Ovocitos de grado 3 y 4



Figura 19 Ovocitos de grado 4 (desnudo)

ANEXO D (CUADROS ESTADISTICOS)

Cuadro 2 ANVA para número de folículos

F.V.	S.C	GL	CM	F	p-valor
modelo	14.89	2	7.44	0.44	0.6628
tratamiento	14.89	2	7.44	0.44	0.6628
error	101.33	6	16.89		
total	<u>116.22</u>	8			

Cuadro 3 ANVA para número de ovócito

F.V.	S.C	GL	CM	F	p-valor
modelo	14.89	2	7.44	0.44	0.6628
tratamiento	14.89	2	7.44	0.44	0.6628
error	101.33	6	16.89		
total	<u>116.22</u>	8			

Cuadro 4 Calidad de Ovocitos

TRATAMIENTO	NUMERO DE OVOCITOS	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3	GRADO 4
TESTIGO	5	2	1	2	0
HORMONA	9	3	1	5	0
HABLACION	6	3	0	0	3

Cuadro 5 Conversión de valores porcentuales a valores angulares para tasa de recuperación de ovocitos.

Tratamiento	Repetición	Tasa recuperación	Valores angulares
Control	R1	18.2	25.25
Control	R2	14.3	22.22
Control	R3	27.3	31.50
Hormona	R1	28.6	32.33
Hormona	R2	85.7	67.78
Hormona	R3	33.3	35.24
Ablación	R1	50.0	45.00
Ablación	R2	50.0	45.00
Ablación	R3	33.3	35.24

Ablación Folicular y estimulación hormonal ovárica.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ovocitos	12	0.14	0.00	78.38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	3.58	3	1.19	0.45	0.7256	
Ablandacion		2.08	1	2.08	0.78	0.4025
Hormonal	0.75	1	0.75	0.28	0.6103	
Ablandacion*Hormonal	0.75	1	0.75	0.28	0.6103	
Error	21.33	8	2.67			
Total	24.92	11				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.17412

Error: 2.6667 gl: 8

Ablandacion	Medias	n	E.E.	
1	2.50	6	0.67	A
2	1.67	6	0.67	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.17412

Error: 2.6667 gl: 8

Hormonal	Medias	n	E.E.	
2	2.33	6	0.67	A
1	1.83	6	0.67	A

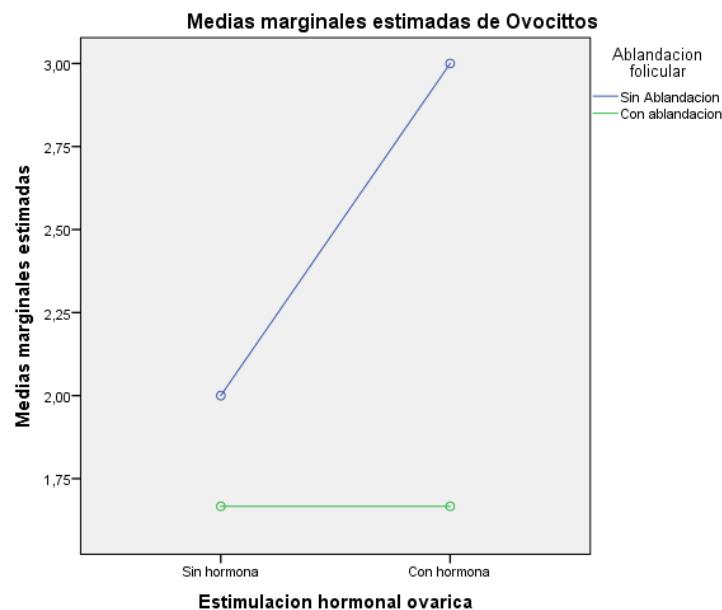
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=4.26980

Error: 2.6667 gl: 8

Ablandacion	Hormonal	Medias	n	E.E.	
1	2	3.00	3	0.94	A
1	1	2.00	3	0.94	A
2	2	1.67	3	0.94	A
2	1	1.67	3	0.94	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Efecto entre la calidad del ovocito y ablación folicular

Tabla cruzada Ablación folicular*Calidad del ovocito

			Calidad del ovocito				Total
			C 1	C 2	C 3	C 4	
Ablación folicular	Con ablación	Recuento	7	1	4	2	14
		Recuento esperado	5,0	1,1	5,0	2,8	14,0
	Sin ablación	Recuento	2	1	5	3	11
		Recuento esperado	4,0	,9	4,0	2,2	11,0
Total	Recuento	9	2	9	5	25	
	Recuento esperado	9,0	2,0	9,0	5,0	25,0	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,769 ^a	3	,429
Razón de verosimilitud	2,894	3	,408
Asociación lineal por lineal	2,425	1	,119
N de casos válidos	25		

a. 6 casillas (75,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,88.

Mediante arreglo factorial con Diseño Completamente al Azar (DCA) los tratamientos del factor Ablación folicular tienen el mismo efecto ($P > 0.05$), por otra parte, el factor estimulación hormonal ovárica también tienen el mismo efecto ($P > 0.05$). No hay significancia en la interacción ($P > 0.05$), lo que indica que los factores actúan de manera independiente.

A la prueba de significancia de asociación mediante Ji-cuadrado es bajo ($P > 0.05$), el cual nos indica estadísticamente que la calidad de los ovocitos no está asociada a la ablación folicular.