

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**  
**ANTONIO NARRO**  
**UNIDAD LAGUNA**  
**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Factores asociados a la obtención de ovocitos para FIV (Fertilización *in vitro*)  
por medio de la técnica de OPU (*Ovum pick up*) en ganado *Bos Taurus*.**

**POR**

**ARTURO ALEXIS LÓPEZ MARRUFO**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA.**

**NOVIEMBRE DE 2017.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Factores asociados a la obtención de ovocitos para FIV (Fertilización *in vitro*)  
por medio de la técnica de OPU (*Ovum pick up*) en ganado *Bos Taurus*.

POR

ARTURO ALEXIS LÓPEZ MARRUFO

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

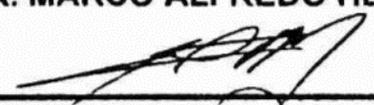
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

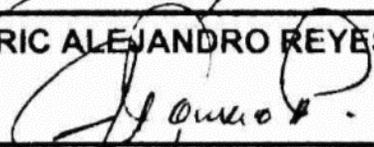
PRESIDENTE:

  
DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA

VOCAL:

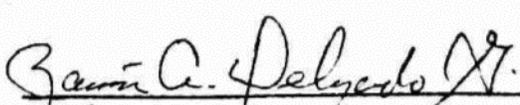
  
MVZ. ERIC ALEJANDRO REYES RAMÍREZ

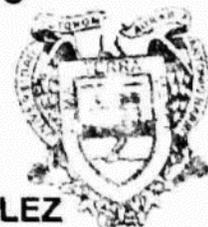
VOCAL:

  
MC. JAIME ISAIÁS ROMERO PAREDES RUBIO

VOCAL SUPLENTE:

  
DR. RAMIRO GONZÁLEZ ÁVALOS

  
DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA.

NOVIEMBRE DE 2017.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**Factores asociados a la obtención de ovocitos para FIV (Fertilización *in vitro*)  
por medio de la técnica de OPU (*Ovum pick up*) en ganado *Bos Taurus*.**

**POR**

**ARTURO ALEXIS LÓPEZ MARRUFO**

**TESIS**

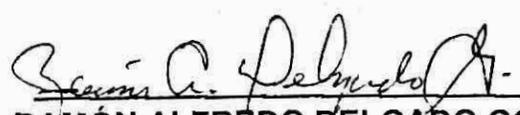
**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**APROBADA POR**

**ASESOR PRINCIPAL:**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

Regional de Ciencia Animal



**TORREÓN, COAHUILA.**

**NOVIEMBRE DE 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi *Alma Terra Mater* por permitirme realizar en sus aulas la aprehensión del conocimiento; al Dr. Marco Alfredo Hernández Vera por su asesoría brindada para concluir satisfactoriamente este trabajo.

A mis maestros, quienes siempre me guiaron en el transcurso de mi formación profesional siendo ejemplo y sabiduría.

A todo el personal y compañeros de In Vitro Brasil por el apoyo incondicional brindado para poder culminar este título.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Arturo López Hernández y Rosa Amelia Marrufo Pedroza, con todo cariño y admiración a ustedes a quienes debo la vida. Gracias por haberme inculcado los valores necesario para llegar a esta etapa en mi vida y por ser mi mas grande ejemplo de superación. Hoy les dedico este titulo, mi mejor herencia, nuestro mas grande logro.

A mis hermanos, Wendy, Ricardo y Nataly. Por todo el cariño, amor y confianza que siempre me han brindado. Gracias por apoyar mis sueños.

A todos mis familiares que siempre confiaron en mi muchas gracias.

A mis hermanos a los cuales no nos unio una misma sangre pero si una misma casa y un mismo objetivo. A aquellos que dios se llevo en el camino pero siempre confiaron en que llegaría este momento, muchas gracias, esto nunca hubiese sido sin ustedes un abrazo hasta el cielo. A todos aquellos que se encuentran hoy presentes muchas gracias por todo su apoyo, se que nos vienen cosas buenas. Dios nos mantenga siempre juntos para vivirlas en todo su esplendor.

## RESUMEN

Hoy en día, la producción de leche es una de las actividades pecuarias más importantes. Esta actividad se realiza en la mayor parte del territorio mexicano, con más de 789 mil unidades de producción. La Comarca Lagunera se sitúa en el primer lugar a nivel nacional en la producción de leche en el periodo enero-junio 2016 con un total de 1,218,886, litros, seguido de Jalisco con un total de 1,036,918 litros, (SAGARPA, 2016). Dentro de las biotecnologías reproductivas que se han introducido para exacerbar la producción de leche de bovino, se encuentra la producción de embriones fertilizados *in vitro* (FIV) y obtenidos por medio de aspiración mediante una guía y apoyado con equipo de ultrasonido, *ovum pick-up* (OPU). El objetivo del presente trabajo fue analizar los registros de 2,587 de hembras donadoras de ovocitos, de la raza Holstein altas productoras. Los ovocitos fueron obtenidos durante el periodo de junio del 2016 a marzo del 2017, recolectados por el Centro de Embriones In vitro Brazil México, S.A. de C.V., ubicado en el municipio de Torreón, Coahuila. De los registros generados se analizó la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos por medio de aspiración ecogiada, *ovum pick-up* (OPU). También se examinaron los factores como índice de temperatura-humedad, estatus del animal y tipo de animal. El ganado al que le fueron aspirados los ovocitos proviene de establos comerciales en la producción de leche y por lo tanto corresponden a la producción comercial de embriones *in vitro*. Las variables estudiadas fueron el número total de ovocitos recuperados y el número total de ovocitos viables para maduración; y como factores a considerar el tipo de animal aspirado, (vaquilla o vaca), el estatus del animal (vaca lactante abierta, vaca lactante preñada, vaquilla abierta y vaquilla gestante) y el día de aspiración, generándose una nueva variable denominada índice de temperatura y humedad (ITH). Se realizó un análisis de varianza preliminar con un modelo mixto aleatorio donde se incluyeron esos factores y como variables de respuestas el total de ovocitos y el total de ovocitos viables para el proceso de FIV, mostrando diferencias significativa entre los factores estudiados ( $p < 0.01$ ). También se observó que a medida que aumenta el ITH disminuye la obtención de ovocitos totales, colectando la mejor cantidad y calidad (11.5 ovocitos por donadora) con valores promedio ITH de 66.5

o <70. Se observó que el promedio de colectas de ovocitos por OPU es de 11.29±8.56 y 11.02±7.76 para vacas y vaquillas, respectivamente, no existiendo diferencia significativa entre ambos; se destacó que existe una mayor media de obtención de ovocitos (11.02) en vacas gestantes lactantes que en las vacas vacías lactantes con una media de 9.38 ovocitos por sesión de OPU.

**Palabras clave:** *ovum pick-up*, fertilización *in vitro*, Holstein, embrión, Índice temperatura y humedad (ITH)

# ÍNDICE GENERAL

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	4
HIPÓTESIS.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 REPRODUCCIÓN EN EL GANADO BOVINO.....	5
1.2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR EN LA HEMBRA BOVINA.....	5
1.2.1. Ovario.....	5
1.2.2. Oviducto.....	6
1.2.3. Útero.....	7
1.2.4. Cérvix.....	7
1.2.5. Vagina.....	8
1.2.6. Vulva.....	8
1.2.7. Vascularización.....	9
1.3. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....	9
1.3.1. HIPOTÁLAMO.....	9
1.3.1.1. <i>Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)</i> .....	10
1.3.2. HIPÓFISIS.....	10
1.3.2.1 <i>Hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)</i> .....	11
1.3.3. GLÁNDULA PINEAL.....	11
1.3.3.1. <i>Melatonina</i> .....	12
1.3.4. GÓNADAS.....	12
1.3.4.1. <i>Sistema del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF)</i> .....	12
1.3.4.2. <i>Familia de factores transformadores de crecimiento (TGF)</i> .....	13
1.3.4.3. <i>Estradiol</i> .....	14
1.3.4.4. <i>Inhibinas y activinas</i> .....	14
1.3.4. FORMACIÓN Y MADURACIÓN FOLICULAR.....	15
1.3.5. ONDAS FOLICULARES.....	16
1.3.6. OVULACIÓN.....	22
1.3.7. CUERPO LUTEO.....	23

1.3.7.1. Desarrollo del cuerpo luteo .....	23
1.3.7.2. Mantenimiento del cuerpo luteo.....	24
1.3.7.3. Regresión del cuerpo lúteo .....	24
1.3.8. PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS .....	25
1.3.8.1. Prostaglandinas F2 alfa y Tromboxanos en el Proceso de Ovulación. ....	25
1.3.8.2. Prostaglandina F2 alfa en el proceso de luteolisis .....	25
1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN.....	26
1.4.1 ESTRÉS CALÓRICO.....	27
1.4.2.1. Temperatura confort para las vacas de leche .....	28
1.4.2.2. Efectos del estrés calórico en el sistema metabólico.....	29
1.4.2.3. Efectos del estrés calórico sobre el sistema endocrino reproductivo .....	30
1.4.2.4. GnRH, LH, FSH e Inhibina .....	31
1.4.2.5. Estradiol y androstenediona.....	32
1.4.2.6. Cuerpo lúteo y progesterona.....	33
1.4.3. FOTOPERIODO .....	34
1.5. BIOTECNOLÓGICAS DE LA REPRODUCCIÓN .....	35
1.5.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL .....	35
1.5.2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> .....	36
1.5.3. ASPIRACIÓN FOLICULAR.....	39
1.5.3.1. Técnica de aspiración folicular .....	40
1.5.3.2. Presión de la bomba .....	42
1.5.3.3. Aguja.....	43
1.5.3.4. FRECUENCIAS DE ASPIRACIONES EN LA EFICIENCIA DE LA OPU .....	44
1.5.3.5. INFLUENCIA DEL TIPO DE DONADORA EN LA EFICIENCIA DE LA OPU.....	46
1.5.3.5.1 Edad de la donadora .....	47
1.5.3.5.1. Donadoras gestantes.....	48
1.5.3.6. INFLUENCIA DE LA RAZA EN LA EFICIENCIA DE LA OPU .....	49
1.5.3.7. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN DE LA DONADORA EN LA EFICIENCIA DE LA OPU.....	50
1.5.3.8. EFECTOS DEL ESTRÉS CALÓRICO EN LA EFICIENCIA DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR .....	52
2. MATERIALES Y METODOS.....	55
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
4. CONCLUSIONES .....	64
5. LITERATURA CONSULTADA .....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pg
TABLA 1 Diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas raza Holstein por medio de OPU	57
TABLA 2 Diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas raza Holstein procedentes de 8 distintos orígenes por medio de OPU	58
TABLA 3 Comparacion del numero de ovocitos de vacas y vaquillas gestantes, novillas y vacas vacias de raza Holstein por medio de OPU.	59
TABLA 4 Comparacion del numero de ovocitos obtenidos de raza Holstein por medio de OPU, a distintos rangos de ITH.	60
TABLA 5 Ovocitos totales obtenidos por OPU	62

## ÍNDICE DE GRAFICOS

GRAFICA 1	Diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas raza Holstein por medio de OPU	Pg 63
-----------	---	----------

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la producción de leche es una de las actividades pecuarias más importantes en la mayor parte del territorio mexicano, con más de 789 mil unidades de producción. Las explotaciones de ganado lechero son las segundas más importantes dentro del sector pecuario. Se estima que el ganado lechero tiene una generación de empleos de más de 200 mil permanentes y arriba de 500 mil indirectos (SAGARPA, 2009). En el 2016 en México se registraron aproximadamente 6,450,000 cabezas de ganado lechero distribuidos en 4 tipos de explotaciones: tecnificado, semi-intensivo, granjas familiares y de traspatio, llevando una producción nacional de 11,857,000 litros de leche, ocupando en el 2016 la posición 7 a nivel mundial. A pesar de este gran incremento en la producción de leche, en el año de 2006 se importaron 143 mil 529 toneladas de leche en polvo y para el 2015 la cifra ascendió a 259 mil 790 toneladas lo que llevo a un aumento del 81% en tan solo 10 años corroborando que evidentemente el desabasto a nivel nacional ha aumentado en el siglo XXI, ubicando a México como el 5º país que más importa leche a nivel mundial. Es indispensable desarrollar las metodologías necesarias para que el sector pecuario absorba ese desabasto en el menor tiempo posible y genere una mayor producción láctea a nivel nacional (SAGARPA, 2016).

La ganadería de la Comarca Lagunera se encuentra en los grandes distritos de riego en el altiplano mexicano. En 1997, en este sistema se ubicaba el 8% de las cabezas de ganado lechero, en las cuales se aportaba el 25% de la producción nacional, y de 80 a 90% de la leche pasteurizada. El tamaño promedio de las unidades de producción superaban las 589 vacas con una media en la producción

de 5,860 litros. El porcentaje de productores que inseminaba era de un 100%, los intervalos entre partos con promedio de 13.2 meses y una tasa de parición de un 91%. Por otro lado, la región productora de los Altos de Jalisco también se encuentra en el altiplano mexicano. Sin embargo, ahí se dispone de una menor superficie con riego. Este sistema aportaba 20% más de la producción láctea que la Comarca Lagunera, es decir participaba con 45% de la producción nacional de leche y disponía de 25% de las vacas del país. En el mercado de la leche fresca esta región aportaba con 50 a 80% del total de las ventas directas. El porcentaje de promedio de productores que realizaban la inseminación artificial es de un 14%, con un intervalo entre partos de 17 meses y una tasa de parición del 70% (Odermatt y Cruz 1997). Según datos recabados por SAGARPA, hoy la Comarca Lagunera ha dado un rotundo giro, pues se establece en el primer lugar a nivel nacional en la producción de leche en el periodo enero-junio 2016 con un total de 1,218,886 litros seguido de Jalisco con un total de 1,036,918 litros, (SAGARPA, 2016). El trabajo en la tecnificación que se ha llevado rotundamente a través de 19 años en la Comarca Lagunera ha contribuido a su mayor desarrollo en la producción láctea. En promedio aproximadamente el 80% de las diferencias entre los hatos se debe principalmente al ambiente, relacionado a las variaciones climáticas, modificaciones en el manejo alimenticio y valor bromatológico, sanitario y reproductivo. Aproximadamente el 20% es atribuido al potencial genético del animal. El déficit de producción láctea a nivel nacional con respecto al consumo, impulsa al ganadero a incrementar su hato lechero y al mismo tiempo su producción de leche por vaca, adoptando nuevas biotecnologías que ayuden al rápido desarrollo de su hato (Velazquez y Hernandez, 2008), Por otro lado, el constante aumento demográfico mundial, que

probablemente llegue a los 12,000 millones de personas en las próximas décadas, es motivo de intranquilidad en la comunidad científica internacional, en relación al potencial reproductivo y productivo de los animales para transformar alimentos de alta calidad para el consumo humano. Las biotecnologías de la reproducción animal representan una oportunidad para optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales (Cordova *et al.*, 2011). La aceptación mundial de la tecnología de IA, proporciona el ímpetu para el desarrollo de otras tecnologías como la criopreservación y el sexaje de espermatozoides, la regulación del ciclo estral, y la recolección, cultivo, congelación, y transferencia de embriones (Giraldo, 2007). La calidad del ovocito es de suma importancia para estas tecnologías de reproducción asistida (Chagas *et al.*, 2014), Hoy en día se siguen desarrollando numerosas investigaciones enfocadas en la manipulación de el desenvolvimiento folicular, buscando obtener una mejor calidad y en algunas ocasiones cantidad de ovocitos (Baruselli *et al.*, 2012), siendo importante descifrar las posibles influencias ambientales o biológicas que interfiere en la calidad ovocitaria y buscando la selección de las hembras donadoras que nos pueden ofrecer mejores resultados en las biotecnología de la reproducción (Chagas *et al.*, 2014).

## **Objetivo**

La presente investigación tiene como objetivo analizar cómo ha sido la calidad y cantidad de los ovocitos obtenidos de donadoras Holstein altas productoras, en interacción con factores como el índice de temperatura-humedad, estatus del animal y tipo de animal.

## **Hipótesis**

Los factores como de medio ambientales, estatus del animal y tipo de animal, se relacionan más con la obtención y calidad de ovocitos procedentes de donadoras Holstein en la Comarca Lagunera.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 REPRODUCCIÓN EN EL GANADO BOVINO**

La hembra bovina es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año). Cada ciclo dura  $21 \pm 4$  días y el celo 6 a 18 horas. La ovulación tiene lugar 24 a 30 horas después de comenzado el estro (Gigli et al., 2006). Muchos autores describen la importancia de caracterizar el tracto genital en los distintos tipos de ganado (Hernández y Miguel, 2010). Conocer la anatomía del aparato reproductor representa, igual que en la mayoría de los métodos de estudios de los distintos sistemas en los animales, la base para facilitar la comprensión de su funcionamiento, por lo que es importante el conocer su anatomía funcional, ya que su análisis permite fincar sólidas bases para comprender como es que se lleva acabo el fenómeno por el cual perpetúan las especies; la reproducción (Galina, 2012). A continuación, sigue una revisión de la morfología y principales funciones fisiológicas del aparato reproductor femenino.

### **1.2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR EN LA HEMBRA BOVINA**

#### **1.2.1. Ovario**

El ovario de la vaca es un cuerpo firme y ovoide, su tamaño en promedio es de 4 cm de largo, 2.5 cm de ancho y 1.5 cm de espesor. Por inclusión al ligamento ancho está unido a la pared corporal y el tracto reproductor se relaciona con la porción ventral del cuerpo del ilion al nivel de la bifurcación del útero (Dyce et al.,

2010). Principalmente el ovario está constituido por médula y corteza, rodeado por epitelio superficial. El estroma de la corteza contiene algunos fibroblastos, así como células mesénquimales, las cuales son capaces de diferenciarse en células tecales e intersticiales (Galina, 2012). La médula del ovario consiste en un tejido conectivo fibroelástico irregularmente dispuesto y extenso sistema vascular y nervioso que llegan al ovario a través del hilio. La corteza ovárica contiene folículos ováricos, cuerpos lúteos o ambos que pueden estar en diferentes etapas de desarrollo o regresión. El flujo de sangre hacia el ovario cambia proporcionalmente al cuerpo lúteo, se ha observado un mayor riego por parte de la arteria ovárica cuando existe un cuerpo lúteo funcional en el ovario (Hafez y Hafez, 2002).

### **1.2.2. Oviducto**

Tiene una forma cilíndrica compuesto de músculo, se encuentra sostenido por el mesosalpinx, en promedio miden de 20-35 cm de largo (Hernández y Miguel, 2010), su abertura próxima al ovario tiene forma de embudo y se le denomina infundíbulo (Galina, 2012). El infundíbulo tiene paredes delgadas y se extiende sobre la parte lateral del ovario, en el borde libre del mesosalpinx (Dyce et al., 2010). Se continúa con la parte media del oviducto y la más larga llamada ampulla y finalmente el istmo. Uniéndose a la cavidad uterina por la unión uterotubárica. Su pared está compuesta por:

Serosa: es una capa delgada de tejido conectivo cubierta por una capa simple de epitelio plano.

Muscular: se constituye como dos capas de fibras musculares lisas, circulares internas y longitudinales externas.

Mucosa: formada por pliegues que se encuentran en mayor grado en ámpula e infundíbulo y menor en istmo. (Galina, 2012).

### **1.2.3. Útero**

El útero se conforma por un cuerpo que mide aproximadamente entre 2-5 cm y dos elongaciones llamadas cuernos que pueden tener una longitud de 20-45 cm, con un ancho a nivel de la desembocadura de los mismos en el útero de 3-4 cm. (Galina, 2012; Hernández y Miguel, 2010). Los cuernos son formados a partir de los conductos paramesonefricos derecho e izquierdo, y el cuerpo se forma por la fusión de estos dos conductos. Histológicamente está constituido por perimetrio muscular, miometrio y endometrio. Está suspendido por la porción del ligamento ancho llamado mesometrio (Galina, 2012).

### **1.2.4. Cérvix**

El cérvix es el órgano que divide al útero de la vagina impidiendo el contacto con el exterior con excepciones en el momento del parto y el estro. El lumen del cérvix es llamado canal cervical y este compuesto por dos orificios la os interna y la os externa. Posee una capa muscular circular bien desarrollada, que contiene fibras elásticas. La mucosa forma una gran cantidad de pliegues, cuyo epitelio contiene células productoras de moco. Sus funciones son el transporte por medio del moco cervical, y servir como el primer filtro de selección y barrera de los espermatozoides

(Galina, 2012). El cérvix se encuentra en promedio de 3-5cm de ancho. De largo se ha encontrado con valores de 7-11 cm y otros autores describen que en el ganado bos indicus es un poco más grande de 10-15 cm, y en especial en la raza Santa Gertrudis, con 25-30 cm de largo. El número de anillos cervicales va de 2 a 5 (Hernández y Miguel, 2010).

### **1.2.5. Vagina**

La vagina es un órgano fibrinomuscular de pared gruesa que se extiende desde el cérvix hasta la vulva. Se compone de mucosa muscular y adventicia. La mucosa está formada por el epitelio escamoso estratificado que descansa sobre una gruesa lamina propia (Galina, 2012), La longitud de la vagina va de 15-35 cm en promedio (Hernández y Miguel, 2010). La mayoría de sus paredes vaginales laterales carecen de peritoneo; están incluidas cranealmente dentro del grosor del ligamento ancho y caudalmente forman parte de la disposición retroperitoneal (Dyce et al., 2010).

### **1.2.6. Vulva**

Es la porción terminal del aparato genital femenino, formada por los labios vulvares izquierdo y derecho, los cuales se unen en las comisuras ventral y dorsal. La uretra se encuentra en el piso de la vulva. El himen es una delgada membrana transversa que se encuentra en la unión de la vagina y la vulva. En la comisura ventral de la vulva se encuentra el clítoris. La porción terminal de la vulva contiene

las glándulas vestibulares y de bartholini (Galina, 2012). La abertura vulvar en ganado lechero va de 6-10 cm (Hernández y Miguel, 2010).

### **1.2.7. Vascularización**

La arteria ovárica, es una rama de la aorta en el bovino e irriga el ovario, el oviducto y la porción adyacente del cuerno uterino. La arteria uterina tiene su origen en la arteria iliaca interna y entra en la cavidad pélvica en el interior del ligamento ancho. La arteria vaginal, proviene de la iliaca interna cerca de la espina isquiática, corre sobre la superficie dorsolateral de la vagina antes de cambiar de dirección y seguir hacia adelante sobre la pared vaginal lateral. Un plexo venoso muy abundante es encontrado en los tejidos parametriales del ligamento ancho y sobre la cara ventral del útero y vagina. El plexo corresponde a un reservorio de sangre que puede drenar en varias direcciones. El mayor vaso es la vena ovárica que pasa por el borde craneal del ligamento ancho (Dyce et al., 2010).

## **1.3. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

### **1.3.1. Hipotálamo**

Se encuentra en la región del tercer ventrículo ocupando una pequeña parte del cerebro. Existen conexiones neurales entre el lóbulo posterior de la hipófisis (neurohipofisis) y conexiones vasculares entre el hipotálamo y la hipófisis anterior. Entre la hipófisis e hipotálamo existe un sistema porta que empieza y termina en capilares sin pasar a través del corazón. Parte del flujo venoso que sale de la hipófisis es de tipo retrogrado que expone al hipotálamo a altas concentraciones de

hormonas de la hipófisis anterior, dando la cualidad de retroalimentación negativa a la hipófisis (Hafez, 2002). El hipotálamo secreta hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que, de acuerdo al patrón de secreción, produce los mecanismos moleculares necesarios para la liberación de hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) de la hipófisis (Gigili et al., 2006).

#### **1.3.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)**

El hipotálamo es el encargado de secretar esta hormona, fue descubierta en 1977 por los científicos Guillemin, Schally y Yallow recibiendo el Premio Nobel por el descubrimiento. Después de su secreción por parte del hipotálamo, entra a capilares y llega a la hipófisis vía vasos portales. Dependiendo de la intensidad y cantidad de los pulsos liberados se secreta por parte de la hipófisis como respuesta FSH y LH hipófisis (Gigili et al., 2006).

#### **1.3.2. Hipófisis**

Se localiza en la silla turca, una depresión ósea en la base del cerebro. La glándula se subdivide en lóbulo anterior y lóbulo posterior o neurohipofisis. La hipófisis anterior tiene cinco tipos de células distintas que secretan 6 hormonas. Las células somatotropicas secretan hormona del crecimiento (GH), las corticotropicas secretan hormona adenocorticotropica (ACTH), las mamotropicas secretan prolactina (PRL). Las tirotropicas secretan la hormona estimulante de la glándula

tiroides (TSH). Las gonadotropicas secretan la hormona folículoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Hafez, 2002; Gigli et *al.*, 2006).

### **1.3.2.1 Hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)**

La FSH es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. Las células de la teca interna de los folículos terciarios responden al estímulo de la FSH produciendo andrógenos y estimulando la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y transformando a los andrógenos en estradiol. Aumentando el aumento de la vascularización al folículo dominante permitiendo una mayor obtención de nutrientes. La FSH provoca que las células de la granulosa que rodean al ovocito se multipliquen por mitosis, el estradiol en conjunto con la FSH estimula la formación de la cavidad antral propiciando receptores para la LH en las células de la granulosa del folículo preovulatorio (Gigli et *al.*, 2006).

La función de la LH es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenar la ovulación y controlar el desarrollo y mantenimiento del cuerpo luteo (CL). Ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana en las células de la granulosa y teca del folículo preovulatorio. Produce un aumento de AMPc vía adenilciclase, estimulando la conversión de colesterol en pregnenolona y desencadenando los sucesos de la ovulación (Gigli et *al.*, 2006).

### **1.3.3. Glándula pineal**

La epífisis (glándula pineal) se origina como una evaginación neuro-epitelial de la parte superior del tercer ventrículo. La actividad hormonal de la glándula está

influenciada por los ciclos de luz-obscuridad y estacionalidad, causando así que su función sea muy importante en el control neuroendocrino de la reproducción. La glándula convierte la información neural de los ojos relacionado con la luz del día en una secreción endocrina de melatonina, que es secretada al torrente sanguíneo y al líquido cefalorraquídeo (Hafez, 2002).

#### **1.3.3.1. Melatonina**

Esta hormona es liberada por la influencia de horas luz secretada por la epífisis o glándula pineal tiene la capacidad de regular la secreción de GnRH. Por lo tanto, las horas luz en algunos animales influye en las oleadas de hormonas gonadotropinas. Este fenómeno es llamado fotoperiodo (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.4. Gónadas**

Las gónadas en ambos sexos desempeñan dos funciones importantes la gametogénesis que es la producción de células germinales y la secreción de hormonas gonadales. Las células de la teca interna en el folículo de Graaf son la fuente primaria de estrógeno circulante. Desde la rotura del folículo las células de la granulosa y la teca son remplazadas por el cuerpo lúteo (Hafez, 2002).

##### **1.3.4.1. Sistema del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF)**

Es llamado así porque tiene una secuencia de aminoácidos muy similares a la insulina. Estos son producidos por las células de la granulosa y la teca interna, y son quizá los factores intraovarios mejor caracterizados. En el ovario se han

identificados el IGF-I y el IGFII. Los factores de crecimiento se encuentran regulados por un factor llamado proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulínico. En el ovario se han encontrado las proteínas 2 y 4, estas proteínas se encargan de impedir la unión al receptor de la IGF antagonizando su efecto (Gigli *et al.*, 2006).

La IGF actúa incrementando la proliferación de las células de la granulosa, la síntesis de hormonas esteroideas y promueve la producción de síntesis de inhibina y activinas. Se puede decir que amplifica las acciones desencadenadas por la FSH. La acción de IGF está regulada por la enzima proteolítica PAPP-A, por sus siglas proteína plasmática asociada a la preñez, ya que aumenta la bioactividad de la IGF al degradar las proteínas de unión (Gigli *et al.*, 2006). En un estudio realizado en el 2004 se encontró en una yegua un aumento de esta enzima proteolítica (PAPP-A) en folículos preovulatorios mayores de 35 mm. Es decir que los folículos dominantes tienen mayor bioactividad de IGF traduciéndose en una mayor respuesta del estímulo de FSH (Gerard *et al.*, 2004).

#### **1.3.4.2. Familia de factores transformadores de crecimiento (TGF)**

Los miembros de esta súper familia, integrada por más de 40 proteínas, regulan la proliferación y diferenciación en una amplia variedad de tejidos. Actúan a través de señales intracelulares que activan la cascada serina-treonina quinasa resultando en la translocación de proteínas desde el citoplasma al núcleo celular. Dentro de estos factores se encuentra; el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), la hormona antimülleriana (AMH), activinas, inhibinas y la proteína morfométrica ósea (BMP). Existen más de 40 BMP recibiendo este nombre porque

fueron aisladas primero de un hueso. En el folículo han sido identificados los factores: GDF-9, BMP-15 Y BMP-6. En las células tecaes, de folículos preantrales y antrales se identificaron la BMP-4 y la BMP-7. Lo folículos primarios y secundarios producen en las células de la granulosa AMH y expresan receptores de AMH (Gigli et al, 2006).

#### **1.3.4.3. Estradiol**

Gigli y sus colaboradores (2006) plantean la teoría dos células dos gonadotrofinas para describir los procesos que comprometen la síntesis del estradiol consistiendo en lo siguiente; las células de la teca interna y las células de la granulosa actúan conjuntamente para producir el estradiol. Las células de la teca interna producen andrógenos a partir de colesterol por estímulo de la LH. Los andrógenos se difunden a las células de la granulosa. La FSH actúa en las células de la granulosa promoviendo la acción de la enzima de aromatasa que se encarga de transformar los andrógenos a estradiol (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.4.4. Inhibinas y activinas**

Las inhibinas y activinas son producidas por las células de la granulosa de folículos dominantes. La inhibina como la activina actúan de forma paracrina inhibiendo o aumentando el desarrollo de los folículos subordinados. Las inhibinas actúan den forma sistémica disminuyendo a la secreción de FSH a nivel de la hipófisis. La secreción de las inhibinas es regulada por las pulsaciones de FSH lo que nos genera un circuito de regulación (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.4. Formación y maduración folicular**

El ovario tiene en su corteza distintas estructuras que pueden ser encontradas en diferentes estadios de desarrollo. Los folículos son una de las estructuras que tiene un cambio muy constante alrededor de las distintas etapas del ciclo estral (Hafez, 2002) Por ultrasonografía transrectal, se demostró que el modelo de ondas de crecimiento folicular comienza ya a las dos semanas de edad (Evans et al., 1994). Las terneras al nacimiento poseen una dotación de folículos primordiales, que varía entre 42.000 y 325.000, pero a los 10- 15 años este número se reduce a 1000–500 (Erickson, 1966). Se estima que Terneras con una población de 6.000 a 23.000 folículos primordiales, pueden presentar la condición clínica de hipoplasia ovárica en distintos grados. Si presenta menos de 500 folículos primordiales la probabilidad de lograr una ovulación es muy baja (Gigli et al., 2006).

La activación inicial de folículos primordiales es gonadotrófica independiente comenzando desde la vida fetal. Es por esto que los folículos se desarrollan hasta el estadio antral sin requerir de las hormonas encargadas de estimular la actividad ovárica. El ovocito 1 son las células germinales cuya meiosis iniciada en el período prenatal se encuentra detenida en la profase de la primera división meiótica, en el estado denominado diploteno. Los ovocitos 1 Rodeados por un epitelio plano de células de la granulosa, toman el nombre de folículos primordiales (Gigli et al., 2006). El folículo primario se desarrolla a partir del primordial, y este es identificado por la formación de gran número de capas celulares foliculares que se encuentran rodeando el ovocito. Estas células se transformarán a granulosa, en esta etapa se comienza a rodear de una capa de material extracelular dando forma a lo que sería

la zona pelucida característica con la que se diferencia el folículo primordial del primario (Hafez, 2002). Después iniciará a forma una cavidad llamada antro folicular con lo que será diferenciado a folículo secundario. (Galina, 2012). Bajo la influencia de gonadotropinas hipofisiarias, las células de la granulosa de folículos de capas múltiples secretan el líquido folicular o albuminoso, que se acumula en los espacios intercelulares. Secreción y acumulación continua de líquido dan por resultado la disociación de células de la granulosa lo cual causa la formación de una gran cavidad llena de líquido, el antro diferenciándose así el folículo terciario o de graaf (Hafez, 2002), el cual tiene las mismas estructuras que el secundario. A diferencia que todas las capas celulares se encuentran aumentadas, de tamaño y el líquido folicular aumenta al grado de que el folículo se proyecta hacia la superficie del ovario (Galina, 2012). El ovocito permanecerá al estar totalmente constituido en un montículo central de células de la granulosa llamado cumulo ovigero. El folículo se encuentra rodeado por células procedentes del estroma llamadas theca folliculi la cual está constituida por dos capas la teca interna y la teca externa. La teca interna está formada por agregados de células epiteloideas que contiene vesículas de lípidos en el citoplasma, por lo que tiene función esteroidogénica. La teca externa está formada por capas concéntricas de células de estromas (Galina, 2012).

### **1.3.5. Ondas foliculares**

A partir de estudios ecográficos se definió a la onda folicular como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que en un punto divergen continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo

dominante) mientras que los otros (folículos subordinados) se atresian. Todos los folículos pertenecientes a una misma onda tienen la capacidad de ser dominantes. Esto se comprobó en un estudio donde quirúrgicamente se extraía el folículo dominante una vez producida la selección. Pasando a dominar el folículo subordinado que le sigue de tamaño a los demás. (Gigli et al., 2006). Las hembras *Bos taurus* y *Bos indicus* presentan generalmente dos a tres ondas de crecimiento folicular en su ciclo sexual. El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral es determinado por la longitud de la fase luteal; si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento posdesviación o en su fase estática temprana (3–4 días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Lucy et al., 1992). En los ciclos estrales de 2–3 ondas, la emergencia de la primera onda folicular, ocurre generalmente alrededor del día de la ovulación. La emergencia de la segunda onda ocurre en el día 9–10 para los ciclos de 2 ondas y el día 8-9 para los de 3 ondas (Gigli et al., 2006). El folículo dominante presente en el inicio de la luteolisis será el folículo dominante ovulatorio y la emergencia de la próxima onda (primera del nuevo ciclo) se demorará hasta el momento de la ovulación. En las ondas foliculares no ovulatorias las concentraciones de estradiol circulante se mantienen bajas lo cual indica que, a pesar de que el tamaño preovulatorio puede ser alcanzado, el folículo dominante no alcanza las características funcionales preovulatorias tales como la producción de estradiol (Ginther et al., 2003). El folículo dominante (folículo estrógeno activo) de la última onda continúa su crecimiento y la biosíntesis de estradiol, hasta que se alcanza el nivel suficiente de estradiol circulante, para producir el feed back positivo sobre el

área de control cíclico del hipotálamo que aumenta los pulsos de GnRH/ LH/ FSH, e inducen el pico preovulatorio de LH y FSH y por lo tanto el proceso de la ovulación. Después del pico de LH este feedback se interrumpe y las células de la granulosa sintetizan progesterona y se luteinizan (Gigli et al, 2006).

El reclutamiento folicular se divide en 2 para facilitar su estudio, Activación inicial y activación de folículos antrales, La inicial comprende desde folículos primordiales hasta terciarios. Tanto la activación inicial como el crecimiento hasta la formación del antro es gonadotrófico independiente, no necesita de la FSH y LH para su desarrollo. La Segunda fase de activación se caracteriza por la dependencia de la hormona FSH para su desarrollo (Gigli et al., 2006).

Aún no se ha podido determinar cuál o cuáles son los mecanismos que determinan el momento preciso en que un grupo de folículos primordiales comienzan a diferenciarse y a crecer. Actualmente, la hipótesis más aceptada sugiere que la regulación de la activación folicular está dada por la interacción de factores inhibidores (por ejemplo, la hormona anti-mulleriana AMH) y factores activadores. Cuando predominan estos últimos, un grupo de folículos primordiales abandona el grupo de folículos inactivos y comienza el proceso de diferenciación. (Gigli et al., 2006). En el 2002 se realizó un estudio donde observaron que la reserva ovárica de folículos primordiales en ratones modificados genéticamente para que no expresen el gen que codifica AMH, se agota más rápidamente que en ratones normales. Esto podría dar una idea a la hipótesis de que la AMH secretada por las células de la granulosa tendría como fin inhibir la activación de folículos primordiales (Durlinger et al., 2002).

Los ovocitos que logran alcanzar el estadio de folículo primordial quedan detenidos en la profase I. La meiosis recién se reinicia en los folículos preovulatorios bajo el estímulo de la LH que dará lugar a la formación de receptores para la estimulación posterior de la FSH. Hoy gracias a estudios moleculares es sabido que los folículos secundarios ya muestran receptores para la FSH requiriendo de su estimulación para formar la cavidad antral. Los folículos preantrales pueden quedar retenidos en su crecimiento por largos períodos hasta que ocurre la segunda activación denominada activación de folículos terciarios o antrales. Segunda fase de activación se caracteriza por la dependencia de la hormona FSH para su desarrollo (Gigli et al., 2006).

El proceso de activación de folículos antrales se divide en 3: Reclutamiento (activación de un grupo de folículos terciarios), selección (un folículo se selecciona sobre los otros) y dominancia (el folículo seleccionado, dominante, continúa creciendo mientras los otros subordinados regresan y se atresian). Después de que los folículos primordiales empiezan a diferenciarse, tienen dos caminos posibles ovular o atresarse. Alrededor del 99% de los folículos que inician su activación se atresian sin llegar a ovular nunca. Histológicamente la atresia se caracteriza por la presencia de vacuolas en el citoplasma del ovocito y por la presencia de núcleos picnóticos en las células de la granulosa. antes que los cambios en las concentraciones hormonales se hagan evidentes y mucho antes de que los cambios de tamaño sean visibles ecográficamente, el mecanismo de selección está determinado por mecanismos intraováricos. Es bien sabido que el folículo dominante a comparación de los subordinados, presenta concentraciones mayores

de estradiol en el líquido folicular, IGF-I libre (debido a la disminución de las proteínas ligadoras de IGF), activina-A e inhibina-A antes del desvío folicular, es decir, antes que la dominancia se haga evidente ecográficamente. (Gigli et al., 2006). Estudios comparativos entre las concentraciones de androstenediona en folículos dominantes y subordinados demostraron no tener alguna diferencia significativa concluyendo entonces que la disminución de estrógenos en los folículos subordinados no es por falta de andrógenos (Donadeum et al., 2002). El folículo dominante expresa más receptores para LH que los subordinados. Por lo que es posible que la LH participe en el proceso de selección folicular tal vez provocando ese aumento en la síntesis de estradiol por parte del folículo dominante. El folículo dominante tiene un sistema de retroalimentación positivo de auto-amplificación establecido por un mecanismo compuesto por el estradiol y el TGF $\beta$  (sintetizado por la teca interna) que interactúa con la FSH, para aumentar el número de células de la granulosa y acrecentar la actividad de la aromatasa. Este sistema de amplificación permite el desarrollo del folículo aun cuando la FSH tiene una disminución sistémica debido a las concentraciones de inhibina. La alta producción de inhibina producida por el folículo dominante actúa localmente (acción paracrina) inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados y en forma sistémica, por un mecanismo de retroalimentación negativo a la FSH a nivel de la hipófisis. (Gigli et al., 2006).

Cada onda folicular recluta entre 20 - 5 folículos (Adams et al., 1992), la formación de ondas foliculares, es producida a lo largo del tiempo, en diferentes estados fisiológicos como el período prepuberal, preñez y el período posparto. La

“ventana de reclutamiento” momento de la emergencia folicular, es de 2 días en el bovino. El folículo dominante durante su fase de crecimiento y estática temprana suprime la emergencia de la próxima onda. Los folículos antrales pequeños en el bovino que llegan a un tamaño de 0.2 mm, tienen una primera etapa de crecimiento hasta 4 mm, con proliferación de las células de la granulosa regulada por factores de crecimiento (regulación parácrina). una segunda etapa de 4 mm a 9 mm dependiente de la FSH y factores de crecimiento en los que se inicia la expresión y actividad de la  $3\beta$  HSD y la  $17\alpha$  hidroxilasa en células de la granulosa y teca interna; una tercera etapa de 9 mm a tamaño preovulatorio (10 – 20 mm) dependiente de la LH, factores de crecimiento y concentraciones basales de FSH. Los folículos mayores de 10 mm son capaces de ovular (folículo estrógeno activo) en presencia de niveles basales de progesterona. El folículo dominante comparativamente pequeño, de la segunda onda en los ciclos de 3 ondas (expuesto a altas concentraciones de progesterona durante la fase de crecimiento) produce un período de dominancia relativamente breve y permite la emergencia de la tercera onda, antes que se inicie la luteolisis. La vida funcional promedio de un folículo dominante desde la emergencia es de 8-11 días (Ginther et al., 2003).

El cuerpo lúteo regresa más temprano en los ciclos de 2 ondas (día 16 –17), que en los ciclos de 3 ondas (19 – 21 días) resultando en ciclos estrales de menor duración (Gigli et al., 2006).

### 1.3.6. Ovulación

Se define como ovulación a los complejos desencadenados por la elevación de la LH, que como resultado produce la expulsión del ovocito del folículo preovulatorio, después de que es producida la ruptura de las células foliculares que rodean al ovocito, éste es expulsado hacia el oviducto. Es bien sabido que el pico preovulatorio es un factor clave para que se desencadene la ovulación, mas sin embargo el proceso de cómo es que se da la ruptura de la pared folicular no está del todo esclarecida, hasta el momento han sido expuestas 3 teorías por las que se cree que es dado este proceso. La primera fue propuesta en 1858 y se basaba en la presión intrafolicular, en donde se relacionaba la liberación del ovocito como respuesta a una explosión ocurrida por el aumento de presión debido al incremento del líquido folicular y a la tensión ejercida por las células musculares lisas del ovario que se encuentran entre las células de teca externa. Esta teoría quedo descartada desde que fue posible medir la presión intrafolicular demostrando que la misma permanece constante al momento de la ovulación (15-20 mmHg) (Gigli et *al.*, 2006).

La segunda teoría propuesta en la contracción de la musculatura lisa por factores desencadenantes a la hora de la ovulación, quedo descartada también en 1994 donde fue determinado que la contracción se produciría por las fibras de colágeno y no por fibras musculares (Espey, 1994). Las contracciones espasmódicas de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos ováricos en respuesta al estímulo producido por la PGF2 alfa, podría estar colaborando en la ovulación, más sin embargo esta no sería la causa principal de la expulsión del ovulo (Gigli et *al.*, 2006).

La tercera teoría es basa en enzimas proteolíticas y los cambios vasculares, apoyada por Espey y Lipner en 1994, quienes inyectando enzimas proteolíticas directamente en el interior de la cavidad antral de folículos próximos a ovular, lograron desencadenar cambios morfológicos similares al proceso ovulatorio. El aumento preovulatorio de la LH aumenta la expresión de las enzimas proteolíticas y sus factores inhibitorios permitiendo que la ovulación sea un proceso controlado, en seguida La procolagenasa se activa en colagenasa rompiendo el colágeno de la teca externa y disminuyendo la tensión de la pared folicular. La plasmina aumenta tanto en las células granulosas como en las células tecales por estímulo de la LH, pero la regulación en uno y otro tipo celular es diferente, sirviendo como control en la degradación del folículo, A medida que se desarrollan los cambios que contribuyen en el degradamiento del tejido conectivo, se va formando el estigma en el apéndice folicular. El estigma es la zona más delgada de la pared folicular por donde se liberará el ovocito en el momento de la ovulación (Gigli et al., 2006).

### **1.3.7. Cuerpo Luteo**

Las células de la granulosa a medida que se luteinizan producen progesterona, La FSH comienza a aumentar luego del día 0 (día de la ovulación) (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.7.1. Desarrollo del cuerpo luteo**

Se da del día 5 al día 10 influenciado por las cantidades de LH la cual actúa manteniendo la funcionalidad del CL (Gigli et al., 2006).

La yegua debido a su metabolismo de LH en el hígado tiene concentraciones altas post ovulación lo que explica porque su periodo de desarrollo del CL inicia desde el 0 al 5 (Gigli, 2006).

#### **1.3.7.2. Mantenimiento del cuerpo luteo**

La alta afinidad de los receptores de LH de las células luteales, permiten que el CL se mantenga activo pese a las concentraciones bajas de esta hormona durante el diestro. En la vaca este período abarca del día 10 al 17 (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.7.3. Regresión del cuerpo lúteo**

En la ausencia del reconocimiento materno de la preñez, se produce la regresión del CL alrededor del día 16-17 en la vaca (Gigli et al., 2006).

El útero es el órgano que determina la regresión del CL a través de la secreción de la hormona luteolítica prostaglandina f2alfa (Gigli et al., 2006).

En rumiantes el CL está formado por células de la granulosa y teca interna. Posee receptores para oxitócina y para estradiol, sugiriendo que los estrógenos tendrían una acción directa sobre la lisis del CL (Gigli et al., 2006).

### **1.3.8. Prostaglandinas y tromboxanos**

#### **1.3.8.1. Prostaglandinas F2 alfa y Tromboxanos en el Proceso de Ovulación.**

Los tromboxanos aumentan su expresión en folículos preovulatorios. Su acción es antagónica al efecto producido por las prostaglandinas a nivel vascular, logrando que la ovulación sea un proceso autocontrolado (Gigli et al., 2006).

La PGF<sub>2</sub>α y PGE<sub>2</sub> intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas y en Cambios vasculares. La administración de inhibidores de la síntesis de PGF<sub>2</sub>α como la indometacina bloquea la ruptura de la pared folicular (Gigli et al., 2006).

#### **1.3.8.2. Prostaglandina F2 alfa en el proceso de luteolisis**

La PGF<sub>2</sub>α en estos animales, actuaría sobre el CL por dos mecanismos (Gigli et al., 2006).

Por un lado, estimula a las células luteales grandes a secretar oxitocina, produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva al estimular la liberación de más PGF<sub>2</sub>α por parte del endometrio (Gigli et al., 2006).

El segundo mecanismo consiste en regular directamente su propia síntesis estimulando a las células tecales a producir PGF<sub>2</sub>α. El mecanismo de autorregulación de su propia síntesis se encuentra activo en el CL del bovino a partir del día 5. Esto explicaría por qué una sola inyección de PGF<sub>2</sub>α antes del día 4 no

produce luteólisis pero dosis repetidas o una sola inyección a partir del día 5 sí produce la regresión del CL (Gigli et al., 2006).

#### **1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN**

En el hemisferio norte de junio a septiembre y en el hemisferio sur de diciembre a marzo son los periodos en que disminuye la fertilidad (sub-fertilidad) en vacas lecheras llamado como verano de infertilidad, son muchos los factores que contribuyen a esta sub-fertilidad como la temperatura ambiente, humedad y fotoperiodo. (De Rensis et al/2017).

El aumento en el estrés calórico en vacas provoca un incremento en la sub-fertilidad, incidiendo un mayor número de vacas en anestro, disminuyendo el porcentaje de preñes en el hato, incrementado el número de días abiertos, además de aumentar en gran número las pérdidas de gestación y reabsorciones embrionarias. Gran cantidad de estudios reportan una disminución de 20 a 30 % en parámetros de concepción y porcentajes de preñez. Estudios retrospectivos en gran escala han delimitado porcentajes de preñes en vacas post-parto a primer servicio en 44-27% y 1.2-12.9% en frío y temporadas de calor, esto puede ser explicado tal vez porque las probabilidades de que una vaca tenga problemas en la ovulación es 3.9 veces mayor en épocas de calor comparado con los meses de invierno. (De Rensis et al., 2017).

### 1.4.1 Estrés calórico

El aumento en el estrés calórico en vacas provoca un incremento en la sub-fertilidad, incidiendo un mayor número de vacas en anestro, disminuyendo el porcentaje de preñes en el hato, incrementado el número de días abiertos, además de aumentar en gran número las pérdidas de gestación y reabsorciones embrionarias. Gran cantidad de estudios reportan una disminución de 20 a 30 % en parámetros de concepción y porcentajes de preñez. Estudios retrospectivos en gran escala han delimitado porcentajes de preñes en vacas post-parto a primer servicio en 44-27% y 1.2-12.9% en frío y temporadas de calor, esto puede ser explicado tal vez porque las probabilidades de que una vaca tenga problemas en la ovulación es 3.9 veces mayor en épocas de calor comparado con los meses de invierno. (De Rensis et *al.*, 2017).

La incidencia en temporada de calor de gestaciones doble aumenta en 3.7 y la incidencia de abortos se ve aumentada en un 5.4 veces más en época de calor que en estaciones de frío, esto está relacionado a la reducción del desarrollo folicular durante las épocas de calor que son consecuencia de una reducción de la secreción de inhibina, provocando el aumento de las concentraciones plasmáticas de fsh por arriba de lo normal, alterando el proceso de reclutamiento de los folículos dominantes lo que resulta en ovulaciones dobles, incremento de gestaciones dobles y aumento del riesgo de abortos, así como el incremento en la incidencia de quistes en los hatos. (De Rensis et *al.*, 2017)

#### 1.4.2.1. Temperatura confort para las vacas de leche

La temperatura ambiente ideal para las vacas lecheras está entre 5-25 °C, una temperatura mayor a 25 °C puede afectar la fisiología general y reproductiva de las vacas. En un estudio en Florida temperaturas de 29.7°C fueron relacionadas con ligera hipertermia, (temperatura rectal de 39°C) y temperaturas arriba de 31.7°C se relacionaron con temperaturas rectales arriba de 39°C con frecuencias respiratorias de 60/minuto indicando un nivel de estrés calórico (Dikmen y Hansen, 2009). Se debe tener en cuenta que la humedad relativa puede exacerbar la temperatura media por lo que es un dato que debe ser evaluado constantemente a la hora de realizar un registro de temperatura (De Rensis et al., 2017). Los efectos de la temperatura y la humedad son cuantificados usando el índice de temperatura-humedad (ITH). Descubierta por Thom en 1959 desarrollado para tener una percepción del estrés en humanos siendo adaptado posteriormente a los hatos lecheros (Thom, 1959). Se ha estimado en un estudio realizado en el 2007 que los días con un ITH, mayor a 72 por un periodo de 35 días, 6 días antes del empadre, disminuye las tasas de concepción de vacas lactantes alrededor del 30%, comparado con vacas que están sometidas por debajo de un ITH de 72 (García-Ispuerto et al., 2007).

El efecto negativo sobre la fertilidad y producción que provoca el estrés calórico ha ido aumentando a través de las décadas, en el 2080 la temperatura global será proyectada con un incremento de 3 a 12 °F (De Rensis et al., 2017; Battisti y Naylor, 2009). El déficit de producción láctea a nivel nacional con respecto al consumo, impulsa al ganadero a incrementar su hato lechero y al mismo tiempo

su producción de leche por vaca por lactancia (Velazquez y Hernandez, 2008) por lo que es indispensable el encontrar el modelo adecuado que se adapte a la moderna vaca alta productora de leche sin olvidar los cambios climáticos globales que incrementan los niveles y duración del estrés calórico. (Battisti y Naylor, 2009).

#### **1.4.2.2. Efectos del estrés calórico en el sistema metabólico**

La mayoría de la literatura mencionan que los efectos del estrés calórico son primeramente observados en la fertilidad y posteriormente en los efectos metabólicos y nutricionales (De Rensis, 2017). Durante las épocas más calientes del año la reducción voluntaria de la cantidad de alimento ingerido, es uno de los principales efectos que genera el estrés calórico, provocando un desbalance energético negativo, el cual es observado en vaquillas, pero tiene una mayor repercusión en vacas lactantes sobre la fertilidad debido a su mayor necesidad de alimento y su metabolismo hepático (Dikmen y Hansen, 2009). La disminución en el consumo de materia seca desencadena un descenso de hormonas metabólicas y factores de crecimiento necesarios para un óptimo desarrollo folicular (Dikmen y Hansen, 2009). Las concentraciones plasmáticas de factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1) y la glucosa tuvieron un descenso en épocas de verano comparado con invierno (Igono et al., 1988). El factor de crecimiento 1 insulínico es necesario para un óptimo desarrollo de los folículos teniendo un efecto directo sobre la calidad de los ovocitos (O'Callaghan y Boland, 1999), la glucosa actúa directamente a nivel hipotalámico en la modulación de la secreción pulsátil de LH (De Rensis et al., 2017).

El aumento del jadeo y salivación excesiva para disipar calor provocan un desbalance en las sustancias buffer que se encargan de mantener un adecuado PH de la sangre y rumen. Desarrollándose al final como una alteración ácido básica con efectos negativos sobre la fertilidad (De Rensis et *al.*, 2017).

Se ha demostrado que el estrés calórico genera especies de oxígeno reactivo (ROS), reportando la sustancia reactiva ácido tiobarbitúrico en la sangre de vacas sometidas a un alto estrés calórico, comparadas con estaciones de frío, esta sustancia, daña al ovocito e interfiere en la preimplantación del embrión. Se han realizado estudios donde la administración de antioxidantes ha resultado ser efectiva para proteger al ovario y los ovocitos, durante el estrés calórico, mas, sin embargo, es necesario investigar cual antioxidante es preciso utilizar (De Rensis et *al.*, 2017).

#### **1.4.2.3. Efectos del estrés calórico sobre el sistema endocrino reproductivo**

Existen efectos directos por parte del estrés calórico hacia el sistema reproductivo endocrino, durante el verano puede ser afectado directamente el hipotálamo, relacionado con el decrecimiento de la secreción de gonadotropinas, principalmente la GnRH con lo que se ve comprometida la actividad ovárica (De Rensis et *al.*, 2017).

La prolactina también participa en la disminución de la fertilidad durante el verano, esta hormona está clasificada como una hormona sensible a la temperatura, por lo que sus concentraciones aumentan durante el verano (De Rensis et *al.*,

2017). Se ha propuesto que talvez esta hormona aumenta para generar una climatización entre el individuo y el calor que se encuentra en su medio, Sin embargo, no está muy bien definido como es que la prolactina podría ayudar en un proceso de adaptación al estrés calórico (Beede y Gainesville, 1985).

La prolactina afecta el desarrollo folicular, disminuyendo el competente desarrollo de los ovocitos (Lebedeva, et *al.*, 2014), en vacas que están amamantando hay un incremento en los niveles de prolactina, lo explica porque muchos de estos animales con cría al pie tiene periodos tan largos de anestro post-parto. Concluyendo que altas concentraciones plasmáticas de prolactina que posiblemente es secretada por vacas lecheras para su climatización en temporadas de calor, es contribuyente a la disminución de la función ovárica. (De Rensis et *al.*, 2017).

#### **1.4.2.4. GnRH, LH, FSH e Inhibina**

Muchos estudios reportan la disminución pulsátil de LH y picos preovulatorios comparados con épocas de invierno, esto puede ser relacionado por un efecto directo en el hipotálamo, o indirectamente por los cambios en la circulación de cortisol, prolactina, estradiol o progesterona, también debemos tomar en la reducción en la ingesta de alimento que conlleva a un desbalance energético negativo. El efecto del estrés calórico sobre la LH se refleja en una disfunción en la ovulación, incrementando la variabilidad de los intervalos entre celos, y ovulaciones (De Rensis et *al.*, 2017).

Existe una controversia entre algunos autores en determinar si realmente si los niveles de FSH y estradiol sufren algún cambio en vacas lecheras bajo estrés calórico, en un estudio en el 2001 se describió que no existía una diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de FSH y estradiol en vacas sometidas a estrés calórico (Ronchi et al., 2001). Mientras que en ese mismo año Rhot y sus colaboradores observaron que si existía un incremento en las concentraciones plasmáticas de FSH causado por la reducción de la secreción de inhibina por parte del ovario, alterando los mecanismos de dominación folicular (Rhot et al., 2001), lo que nos trae como consecuencia, el incremento en el número de vacas con folículos anovulatorios, quistes ováricos, ovulaciones dobles y nacimientos dobles (De Rensis et al., 2017).

#### **1.4.2.5. Estradiol y androstenediona**

La reducción de la secreción de androstenediona puede indirectamente comprometer la fertilidad porque es un precursor de la síntesis de estradiol, y los niveles de estrógeno por debajo de lo normal en plasma están directamente relacionados con el decrecimiento de la duración e intensidad de expresión del estro e incremento en la incidencia de anestros y ovulaciones silenciosas (De Rensis et al., 2017).

Estudios de vacas en situaciones controladas de estrés calórico mencionan que no existe una comparación consistente sobre las concentraciones de estradiol en sangre, pero lo que, si está bien evidenciado, es que el estrés calórico en condiciones in vitro reduce la capacidad estereogénica de la teca y la granulosa de

las células ováricas disminuyendo las concentraciones de estradiol en sangre (De Rensis et al., 2017). Las concentraciones bajas de estradiol en sangre, disminuye el desarrollo folicular, modifica los mecanismos ovulatorios y reduce la calidad de ovocitos y embriones. (Ronchi et al., 2001).

La androstenediona sufre un descenso similar a lo ocurrido con el estradiol, en un estudio fueron expuestas vacas Holstein lactantes a un estrés calórico por 12 horas, observándose una disminución en la androstenediona producido del cultivo del tejido de la teca de folículos preovulatorios colectados 28 días después de que las vacas fueron expuestas al estrés calórico. (Ronchi et al., 2001).

#### **1.4.2.6. Cuerpo lúteo y progesterona**

Estudios que se han realizado acerca de la cantidad de progesterona plasmática después de una exposición a un estrés calórico son contradictorios, reportando en alguno de ellos un incremento, decremento e igualdades en concentraciones. Adjuntando que estas diferencias pueden ser correlacionadas al tipo de estrés (agudo vs crónico), el estado del ciclo estral, o estatus metabólico del animal (De Rensis et al., 2017).

Se ha atribuido que parte de la caída de la fertilidad en estrés calórico a la función luteal y desarrollo progestacional del útero comprometiendo la supervivencia del embrión. Tal vez influenciada por el incremento de la secreción endometrial de prostaglandinas f2 alfa resultado del estrés calórico, lo que lleva a una luteolisis prematura. (De Rensis et al., 2017). En un estudio del 2014 se reportó que la administración de progesterona posterior a la inseminación artificial puede

augmentar las tasas de fertilidad en verano, en vacas lecheras con una baja condición corporal o que han sufrido un desorden reproductivo post-parto, lo que puede corroborar estas atribuciones (Friedman et al., 2014).

### **1.4.3. Fotoperiodo**

La disminución de la fertilidad en el verano observada en las vacas no es debido únicamente a el estrés calórico, atribuyendo esto porque en países donde en verano las vacas se encuentran en climas confortables este fenómeno es observado. El fotoperiodo puede ser un factor que contribuya la disminución de la fertilidad, en vacas lecheras. En ganado de carne durante el verano, el fotoperiodo modifica la eficiencia reproductiva, reduce la secreción de melatonina, disminuyendo los pulsos de gnrh lo que nos lleva a una disminución en la actividad del eje hipotálamo hipófisis gonadal (De Rensis et al., 2017).

Se han realizado series de estudios en donde es administrada melatonina a vacas lecheras durante el verano reportando en algunos casos el éxito al disminuir los días abiertos y numero de vacas que necesitan más de 3 servicios para quedar gestantes. Mientras que en otros hatos se obtuvo resultados contradictorios reportando que el tratamiento con melatonina durante el verano no contribuye en alguna mejoría en los parámetros reproductivos en vacas lecheras. Llegando a la conclusión de que La melatonina podría tener propiedades antioxidantes. Por lo que debe ser tomada en cuenta al poder ser un factor que contribuya a esta sub-fertilidad de verano (De Rensis et al., 2017).

## **1.5. BIOTECNOLÓGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN**

### **1.5.1. Inseminación Artificial**

La inseminación artificial puede definirse como la biotecnología para la aplicación de semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación. La primera realización de esta técnica esta reportada en 1780 por el fisiólogo italiano Lazaro Spallanzani, en una perra. Pero los primeros que observaron por primera vez un espermatozoide fueron Leeuwenhouk y su asistente Hamm (Giraldo, 2007).

Cassou, produjo las pajillas comerciales utilizadas mundialmente, con un método de sellado de pajillas plásticas y una pistola para inseminación. Originalmente se usaron solo las pajillas para 0.5ml de semen, pero las pajillas para 0.25ml de semen se hicieron populares al requerir menos espacio para el almacenamiento (Giraldo, 2007).

La IA ha tenido un gran impacto benéfico en la ganadería lechera, pues conduce a un incremento en la intensidad de selección porque solo un pequeño número de toros es requerido para generar progenie, y en la ocurrencia de selección los toros son identificados por mérito genético, basado en registros del desempeño de sus hijas (Hansen y block, 2004). Los protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo permitieron a la inseminación artificial desarrollarse promoviendo el avance genético, aumentado la eficiencia reproductiva en ganado de carne y leche. En los protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo el, desarrollo final folicular y el tamaño del folículo dominante, determinan en gran medida la calidad del

ovocito, la ovulación y el desarrollo uterino reflejándose en una mayor tasa de concepción (Baruselli et al., 2012).

### **1.5.2. Transferencia de embriones y producción de embriones *in vitro***

La Historia de la FIV en mamíferos, se remonta a 120 años, en 1878 Schenk, fecundó *in vitro* ovocitos de coneja, con espermatozoides homólogos (Cordoba et al., 2011). Mas sin embargo el primer acontecimiento de transferencia de embriones en mamíferos fue desarrollado por Heape en 1890, el logro transferir, dos embriones de angora en un ratón de laboratorio logrando obtener nacimientos (Mapletoft et al., 2005), después de esto se generaron una serie de experimentos en ratones y cabras, hasta 1949 que fue reportada la primera transferencia de embrión en bovinos, pero no fue hasta 1951 que Willet y sus colaboradores consiguieron el primer nacimiento de un ternero por medio de esta práctica (Seidel y Seidel, 2005). La aplicación de transferencia de embriones dio inicios en la industria del ganado a principios de los 1970, cuando en Europa se empezaban a popularizar las razas de doble propósito, buscando así una forma de comercializar esa cualidad de las hembras a países interesados como América, Australia y Nueva Zelanda (Seidel y Seidel, 2005). Fueron importados animales a Canadá con un alto valor genético, pero eran relativamente escasos, debido a restricciones de salud en traslado internacionales, en este momento la transferencia de embriones oferto un excelente método para poder multiplicar esa cualidad de las hembras de una forma más eficiente (Mapletoft et al., 2005). En 1987 Smith y la universidad de de Guelph introdujeron el concepto MOET por siglas en inglés Multiple ovulation and embryo

transfer. presentaron el programa logrando incrementar la intensidad de la selección de ciertas características deseables y redujeron los intervalos entre generaciones, resultando en un aumento en la ganancia genéticas (Mapletoft et al., 2005). Después En 1996, Eppigy O'Brien, lograron obtener un ratón vivo a partir del cultivo in vitro de folículos primordiales abriendo nuevos desafíos a la biotecnología de la reproducción (Gigli et al., 2006). Aunque en un principio la fertilización *in vitro* se orientó principalmente al estudio de factores enfocados en la fecundación capacitación espermática y maduración del ovocito. En las dos últimas décadas, esta técnica ha puesto énfasis en la producción de embriones de animales de granja, estando en vanguardia el ganado bovino, ovino y porcino, permitiendo aprovechar mejor el potencial biológico de los animales de importancia económica y de esta manera contribuir a su aplicación en mejora de la producción animal internacional (Cordoba et al., 2011).

La transferencia de embriones bovinos con fines comerciales ha llegado a convertirse, en espacio de unos treinta años, en un importante negocio a escala internacional (Mapletoft et al., 2005). Las técnicas están consolidadas, en el 2005, anualmente se producían en el mundo más de 500,000 embriones a partir de vacas súper ovuladas, calculando que aproximadamente un 15% de la producción de embriones era producidos *in vitro* (Mapletoft et al., 2005), ya para el 2010 De 843 862 embriones producidos en el mundo, 307 845 (36.5%) eran producidos *in vitro* (Embryo Transfer Newsletter, 2010). Connotando un aumento por arriba del doble en tan solo 5 años en la producción de embriones *in vitro*. Para el 2011 el número total de embriones PIV (producidos *in vitro*) transferidos fue de 453,471 en todo el

mundo. Lo que nos corrobora su aceptación como una biotecnología en la reproducción (Stroud, 2011).

La producción de embriones in vitro puede ser un método para sobrepasar la infertilidad de hembras asociadas a problemas en ovulación y fertilización con un alto valor genético. El semen sexado es una herramienta muy tentadora utilizada en la producción de embriones in vitro ya que se puede obtener un mayor número de embriones por esta técnica con un menor número de espermatozoides a los valores utilizados en IA resultando en un mayor porcentaje de hembras al nacimiento que aumentarían el número de vaquillas para remplazos (Hansen 2006). Se ha planteado que posiblemente la producción de embriones in vitro podría ayudar a mejorar las tasas de preñes obtenidas bajo estrés calórico. Siendo esto un grave problema que disminuye rotundamente las tasas de fertilidad en época de verano (Baruselli et al., 2012). La tasa de selección cuantitativa puede incrementar con el uso de la tecnología de embriones producidos in vitro, incrementando la exactitud y la intensidad de la selección y reduciendo los intervalos entre generaciones. Ha sido reportado que la producción de embriones in vitro es evidentemente a un menor costo que la obtención de los mismos por súper ovulación por lo que es más redituable al productor. (De rensis et al., 2017; Hansen, 2006). Brasil es el país con un mayor desarrollo en la técnica de PIVE teniendo una media de 15 ovocitos y 6 embriones por sesión de donadora en 53,019 sesiones realizadas (Meiyu et al., 2013).

### 1.5.3. Aspiración folicular

La técnica de aspiración folicular transvaginal eco-guiada, es una forma no invasiva por la cual es posible la recolección de ovocitos de hembras con alto valor genético (Hansen, 2006). La aspiración folicular asociada a la producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una tecnología interesante que permite la selección de donadoras aumentando la posibilidad de obtener un mayor número de descendencia por parte de la hembra en el ganado bovino. A pesar de la variabilidad que puede tener una donadora de otra al ser sometida a este tipo de biotecnologías se estima que puede producir un promedio 50 hijos por año (Meiyu et al., 2013). El éxito de esta tecnología está directamente relacionado con la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos (Baruselli et al., 2012). La recolección de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones también puede provenir de hembras sacrificadas u ovariectomizadas. Mas esta metodología presenta grandes limitaciones puesto que no permite ser un proceso repetitivo, disminuyendo la producción de embriones y por tanto está limitada la posibilidad de descendencia de las hembras sacrificadas (Denis, 2008). Además, estudios actuales han demostrado que los ovocitos recolectados *in vivo* por la aspiración folicular ofrecen una mayor competitividad a la hora de desarrollarse a blastocistos comparados con los ovocitos obtenidos de ovarios de rastro (Karadiole et al., 2010). Incluso esta técnica asociada a la producción de embriones *in vitro* ha tenido comparaciones con la producción de embriones *in vivo* por métodos de super ovulación, reportándose en un estudio realizado en vacas Holstein donde se obtuvieron mejores resultados en la producción de un mayor número de mórulas y blastocitos por OPU-IVF ( $11.8 \pm 7.6$ )

que por la ovulación múltiple (6.4+/- 6.3) por lo que esta biotecnología podría ser una opción a la transferencia de embriones por superovulación (Imai et al., 2006).

La técnica ovum pick-up (OPU) es un procedimiento no invasivo por el cual se recolectan ovocitos de folículos antrales en animales vivos (Meiyu et al., 2013). La implementación de esta técnica dio origen en los humanos, empezándose a utilizar en la mujer en las décadas de 1980 (Denis, 2008) pero no fue hasta 1987 que se realizó la primera propuesta de OPU en bovinos por Denmark, Mediante métodos invasivos por medio de una laparatomía (Meiyu et al., 2013), resultando esta técnica demasiado invasiva y laboriosa, siendo frecuentes las formaciones de adherencias en los ovarios, además de exponer a la donadora a una posible peritonitis (Denis, 2008). Después en 1988 por Dutch y sus colaboradores desarrollaron la primer OPU en el ganado bovino por métodos no invasivos (Meiyu et al., 2013)

#### **1.5.3.1. Técnica de aspiración folicular**

La ovum pick-up-fertilización *in vitro* (OPU –FIV) es una de las técnicas más flexibles y repetitivas para producir embriones provenientes de donadoras vivas. A diferencia de la transferencia de embriones por súper ovulación (Meiyu et al., 2013). La aspiración folicular no interfiere con la reproducción y producción en los ciclos de las donadoras (Denis, 2008).

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

colector (Denis, 2008). La OPU se realiza de modo habitual sólo con la aplicación de anestesia epidural (5 ml de lidocaína al 2%), de modo que, se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto, lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios (Denis, 2008). Antes de iniciar la operación, se hace pasar por la aguja una solución de solución fosfatada buferada (PBS) a la cual se le adiciona 0,4 % de suero de albúmina bovino (SAB) o 1 % de suero fetal (SFV) y 10 UI /ml de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre, que es abundante en el tubo de recolección. Posteriormente se extraen las heces fecales del recto y se procede a la limpieza, desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua, desinfectante y papel higiénico. Una vez colocada la aguja en la guía del transductor se introduce este a través de la vagina, la mano libre del operador se introduce por el recto para proceder a la localización y acercamiento del ovario al transductor, que se coloca a la derecha o izquierda del cérvix según el ovario seleccionado, para iniciar la punción. Los folículos son observados como imágenes anecogénicas en el monitor del ecógrafo (color negro), por medio de la manipulación del ovario, posteriormente se inicia la presión negativa y se hace avanzar la aguja perforando la pared vaginal y folicular, siendo posible visualizar la aspiración al desaparecer de la pantalla la imagen del folículo (Denis, 2008). El contenido de la punción cae directamente a un filtro o a un tubo de recolección, el cual se mantiene a 37°C hasta el momento en que se procede a la búsqueda y clasificación de los ovocitos colectados (Denis, 2008).

Desde que fue establecida la técnica de aspiración folicular numerosas modificaciones se han llevado a cabo con el fin de tener un mayor número y calidad de complejo ovocito cumulus (Boni, 2012).

### **1.5.3.2. Presión de la bomba**

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. Este aspecto tiene gran importancia, ya que, existe una relación directa entre la presión de aspiración y la calidad de células del cúmulo intactas y de éstos dependerán los resultados que se obtengan en cuanto a maduración y capacidad futura de desarrollo embrionario (Denis, 2008).

Es evidenciada la obtención de ovocitos con una menor calidad a una mayor presión de la bomba que se refleja en un decremento progresivo de la producción de blastocitos *in vitro* (Boni, 2012), esto se debe a que el número de complejos cúmulo ovocitos (COCs) intactos disminuye en la misma medida en que la presión de aspiración es mayor, aumentando el número de ovocitos desnudos (Denis, 2008) los cuales está comprobado que tienen una muy baja mitosis después de la fertilización *in vitro* (Chagas et al., 2014). A sido observado que la presión de la bomba de vacío debe de estar determinada en función del calibre de la aguja,

autores recomiendan el uso de agujas 18 g con una presión de mmHG entre 50-70, para obtener una eficiente calidad de complejo ovocito cumulus (Boni, 2012). Mientras otros alcanzaron buenos resultados utilizando presiones entre 20-25 ml agua/min y 12-15 ml agua/min empleando agujas con diámetro de 20G y 19G respectivamente (Denis, 2008).

### **1.5.3.3. Aguja**

Las primeras agujas que se utilizaron median 55cm, eran reusables lo que provocaba la pérdida del filo del bisel después de realizar varias sesiones de OPU. Fue reportado que el uso de estas agujas disminuía la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos, debido a que el agua perdida el filo dificultando la entrada a los folículos y la pérdida estimada por largo paso de los ovocitos a través de los 50 cm del cuerpo de la aguja (Boni, 2012). Después en 1993 Rath desarrolló un método alternativo al utilizar agujas desechables (18 G) las cuales poseían entre sus ventajas que eran un poco más económicas, estériles y adaptables. Sin embargo, se requería de un complejo sistema de guía para poder ser utilizadas (Denis, 2008). En este sistema Bols y sus colaboradores compararon tres diferentes diámetros de agujas, 18,19 y 21 g, en diferentes presiones de vacío obteniendo una mayor recolección de ovocitos con agujas de calibre 18G (Bols et al., 1995). Este tipo de modificación que fue llamado semidesechable, mas después se reportó que alteraba la calidad de los ovocitos recolectados, debido a la toxicidad de los fundentes utilizados y la longitud metálica por donde debía transitar el ovocito (Bols, 2005), en 1999 se Modificó la técnica de OPU, remplazando las agujas de 55 cm. Que eran reusables, muy poco

comercial y perdían el filo después de varias secciones de aspiración. Estas agujas fueron reemplazadas por catéteres de un solo uso (19Gx2) permitiendo su colocación gracias a un mandril de acero de 8mm el cual lleva en su punta la aguja, y un adaptador que permite la unión de una guía de aspiración de 4mm de silicona que pasa por en medio del mandril, y finaliza en el sistema de aspiración del tubo colector de 50 ml (Bols, et *al.*, 1999). Después se realizaron pruebas para corroborar que la silicona no resultaba citotóxica para los ovocitos, obteniendo una mayor tasa de recuperación, por sesiones de OPU que con la aguja antes de utilizadas de 50 cm (Bols et *al.*, 1999).

#### **1.5.3.4. Frecuencias de aspiraciones en la eficiencia de la OPU**

Esta determinado que es obtenido un número de complejos cúmulo-ovocitos (COCs) de mayor calidad cuando se realiza la OPU el día cinco del ciclo estral respecto a cuándo se realiza el día ocho, momento en que está presente un folículo dominante, lo que sugiere que la presencia de este folículo afecta o inhibe el desarrollo del resto de los folículos subordinados (Denis, 2008). Desde hace varios años está comprobó que la repetición en la colección de ovocitos por OPU no interfiere en la actividad reproductiva de la donadora y no causa ningún riesgo para su salud (Kruijjo et *al.*, 1991). Por esto el determinar que intervalo entre sesiones de OPU genera una mejor cantidad y calidad de ovocitos ha creado una controversia a través de los años entre varios autores. En algunos establecimientos comerciales la aspiración de los animales es realizada cada 15 días para facilitar procedimiento del manejo del ganado obteniendo resultados satisfactorios, reportándose la

aspiración de 317 vacas Nelore, cada una de 1-9 veces, con intervalos de 15 días dejando un total de 20848 ovocitos de los cuales 15747 fueron viables equivaliendo un 75.53%. En 1991 Kruijff realizó una investigación donde 10 vacas fueron aspiradas 1 vez por semana. Realizando 4 sesiones, obteniendo tasas de recuperación de 27.4 % (número de ovocitos colectados /el número de folículos puncionados) (Kruijff et al., 1991). Estudios posteriores corroboran esta técnica afirmando que la aspiración de vacas cada 7 días resulta en un buen número en la recolección de ovocitos y en el porcentaje de blastocitos 15-20 % (Imai et al., 2006). Se ha observado que la aspiración una vez por semana, ofrece un mayor número de ovocitos por sesión recolectados más sin embargo estos son de una menor calidad (Galli et al., 2001), en comparación con los obtenidos en las aspiraciones de 2 veces por semana. La frecuencia de aspiración de dos veces por semana ofrece los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de COCs recolectados (Denis, 2008), en un menor tiempo siendo estas sesiones comúnmente realizadas en lunes y jueves (Galli et al., 2001). Esto puede asumirse que con el aumento en la frecuencia de OPU a intervalos de 3-4 días (dos veces por semana), el folículo dominante es aspirado durante cada sesión y de este modo se estimula el crecimiento de una nueva onda folicular formada solamente por pequeños folículos en crecimiento (Denis, 2008). A diferencia de las aspiraciones de una vez por semana donde existe la presencia de un Folículo dominante que provoca la degeneración y atresia de los subordinados (Galli et al., 2001). Estudios corroboran esto reportándose en vacas de leche que el aumento en el número de sesiones al inicio de la lactancia genera un incremento de folículos recolectados (Denis, 2008).

### 1.5.3.5. Influencia del tipo de donadora en la eficiencia de la OPU

Esta técnica se utiliza en donadoras que se pueden encontrar en diferentes estados productivos (secas o en ordeño) y/o reproductivos (novillas o vacas gestantes). También se ha implementada en vacas con problemas de fertilidad, que ya tiene un buen número de inseminaciones, y en vacas gestantes en el primer tercio de gestación. En un experimento en el que se utilizaron vacas Holstein con un mal record reproductivo se obtuvieron resultados eficientes en la producción de embriones *in vitro* con una media de 36 +/- 16.5 ovocitos por sesión con un 20% de blastocistos. (Imai et al., 2006). En otra investigación donde se evaluó la cantidad de ovocitos colectados (3.1 contra 6.1) y la cantidad de blastocistos obtenidos por sesión (0.5 y 1.5, respectivamente) al utilizar novillas de la raza Holstein Friesian de baja fertilidad comparada con novillas saludables de la misma raza demostraron que existe un menor aprovechamiento en la producción de embriones *in vitro* de las donadoras con problemas de infertilidad más sin embargo es posible la obtención de ovocitos viables por medio de OPU (Denis, 2008). Algo importante es la selección que se ha dado a través de los años buscando siempre los animales más altos productores que reditúen económicamente al productor. Dejando de un lado lo encontrado en un interesante estudio realizado en el 2008 donde se hizo una comparación en la producción de embriones por ovocitos de vacas seleccionadas en base a su alto performance y se encontró que no es tan eficiente comparada con la producción de embriones por ovocitos de una vaca ordinaria, dejando en claro que es necesario el implementar mayor número de investigaciones que nos generen una mayor probabilidad de características heredables que aumenten la fertilidad de

animales altos productores sin disminuir su eficiencia para aplicar nuevos métodos de selección que nos ayuden a combatir este problema (Machatkova et al., 2008).

#### **1.5.3.5.1 Edad de la donadora**

La técnica tiene la cualidad de poder seleccionar donadoras desde los 6 meses de edad, logrando ser aspiradas vacas gestantes con un promedio de 3 meses y vacas en puerperio con más de 15 días de paridas (Meiyu et al., 2013). Siendo a la única excepción los animales con más de 90 días de gestación, animales con severos problemas de hipoplasia ovárica, o animales con muy pocos días post-parto (Galli et al., 2001). La utilización de OPU en animales muy jóvenes está limitada por el reducido tamaño de la pelvis, pero en dependencia del desarrollo del tracto genital y del tipo de transductor utilizado se han reportado trabajos en novillas entre 6 y 8 meses en la raza Holstein Friesian (Bols et al., 1999). Otros trabajos han reportado que algunos ovocitos procedentes de terneras de 3 meses pueden ser competentes en el desarrollo in vitro, sin embargo, se hace mención a que un mayor número de embriones se producen con hembras de 10 y 12 meses de edad (Bernal et al., 2011). Mas se ha observado un número significativamente mayor de blastocistos cuando se utilizan donantes de ovocitos mayores de tres años respecto a las menores (46.7 contra 42.0 % respectivamente) (Denis, 2008). Lo mismo se encontró en un estudio realizado en cuba con ganado de carne utilizando vacas siboney, observado que independientemente de su estado reproductivo (Gestantes o vacías) los resultados en la calidad y cantidad de ovocitos fueron superiores en comparación con vaquillas de la misma raza (Denis, 2008).

Contradictoriamente un estudio del 2014 reportó al comparar folículos obtenidos de la aspiración de ovarios de rastro procedentes de vacas y vaquillas *bos Indicus* y se llegó a la conclusión de que no existe ninguna diferencia significativa en la calidad de la obtención de ccos de ambos (Chagas et al., 2014).

Se reportó que existe una disminución progresiva en la actividad ovárica en vacas geriátricas más sin embargo no se perdía la capacidad para producir gametos (Katska y Smorag, 1984).

#### **1.5.3.5.1. Donadoras gestantes**

En vacas gestantes se recomienda realizar la OPU entre el segundo y tercer mes de gestación, ya que en el primer mes resulta riesgoso lisar el cuerpo lúteo joven y comprometer la anidación del embrión. Pasados los tres meses de gestación los ovarios son inaccesibles por esta vía (Denis, 2008). La aspiración de vacas gestantes se ha reportado con un incremento en el número de folículos medianos y grandes en hembras gestantes comparado con hembras cíclicas (Domínguez, 1995). Es necesario ampliar la investigación para determinar concretamente que efecto puede tener el aspirar vacas gestantes en la calidad y cantidad de los ovocitos, actualmente se han realizado estudios en ovarios de rastro donde se describió que la presencia de progesterona a la hora de realizar la aspiración de folículos no ofreció una mayor cantidad ccos. Pero se observó que folículos pequeños entre 3 de 6 mm tenían una mayor calidad de ccos en ellos a comparación del resto de los folículos que tenían un diámetro más grande, (Chagas et al., 2014).

Más es necesario el realizar un mayor número de estudios que ayuden a comprender mejor los resultados de aspirar vacas gestantes.

#### **1.5.3.6. Influencia de la raza en la eficiencia de la OPU**

La importancia y eficiencia en los programas comerciales de OPU-PIVE son muy bien sabidos, más sin embargo no está del todo claro las posibles diferencias que se pueden encontrar entre razas a la hora de llevar a cabo esta tecnología (Baruselli et al., 2012). Es sabido que comparando con el *Bos taurus*, el *Bos indicus* tiene una mayor cantidad de ovocitos debido a un mayor número de folículos pequeños en el ovario (Potenza et al., 2011), mayor cantidad de ovocitos viables, mayores probabilidades de el desarrollo a blastocito y una menor tasa de fragmentaciones nucleares en blastocitos procedentes de PIVE. El mayor número de folículos antrales procedentes del ganado *Bos indicus* (Baruselli et al., 2012) y el mayor número de ondas foliculares a comparación del *Bos taurus* (Viana et al., 2000) tiene una relación directa sobre el número de ovocitos disponibles para FIV (Baruselli et al., 2012). El ganado *Bos taurus* tiene una mayor número de folículos mayores de 5mm comparándolo con el *Bos indicus* (Segerson et al., 1984) En el ganado *Bos indicus* la raza Nelore es el factor clave en Brasil por el cual este país se mantiene en el número 1 en la producción de embriones (Thinier, 2006). A pesar de la gran importancia que tiene la producción de embriones a nivel mundial, muchos aspectos de la producción de embriones un vitro en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* aún no es muy bien comprendida. en algunos estudios son descritas las vacas Nelore como una de las que se obtiene una mayor cantidad de ovocitos

viales por sesión de OPU (Potensa et al., 2011). Teniendo por lo general una mayor cantidad de folículos más pequeños en el ovario que los *Bos taurus*, reportes en la literatura mencionan que el rango por sesión de OPU en Nelore va de 18 a 25 ovocitos por vaca (Watanabe et al., 1999). En *Bos taurus* por cada 8-19 ovocitos obtenidos se encuentra una media de 2 embriones transferibles y en Nelore del total de ccos obtenidos por OPU se espera un total de 20- 35 % de ellos lleguen a ser un blastocisto viable para ser transferido (Chagas et al., 2014) siendo esto un tema de investigación pues aun las bases fisiológicas de él porque el ganado Nelore tiene un mayor número de folículos no están bien establecida (Potensa et al., 2011), reportando que talvez esta peculiaridad se puede deber a una producción específica de LH únicamente observada en esta raza (Monteiro et al., 2009),

La obtención de ovocitos provenientes de vacas Holstein fue de mejor calidad que los de rojas danesas y vacas blancas. En un experimento realizado con vacas lactantes en condiciones de pastoreo tropical, se observó que las vacas Aberdeen Angus tienen una mayor producción en el número de ovocitos teniendo mejores resultados en PIVE que las vacas Holstein (Baruselli et al., 2012).

#### **1.5.3.7. Influencia de la nutrición de la donadora en la eficiencia de la OPU**

Es bien sabido que el estado metabólico y nutricional puede interferir en los patrones de desarrollo folicular, secreción de hormonas reproductivas y en la calidad del ovocito en el ganado (Baruselli et al., 2012).

Los periodos de desbalance negativo de energía son asociados a la disminución de la fertilidad en vacas. Existen numerosos estudios que demuestran que la principal causa de esta sub-fertilidad cuando se tiene un desbalance energético negativo, es la disminución en la calidad del ovocito (Baruselli et al., 2012).

En programas comerciales de OPU-PIVE son utilizadas vacas no lactantes, o con lactaciones tardías, tratando que la mayoría de ellas no se encuentre en algún desbalance energético negativo (Baruselli et al., 2012). Algunos estudios en donde se presenta la aspiración de vacas en subnutrición, muestran que este factor no tiene un efecto negativo en la morfología de los ovocitos, pero, no obstante, se evidenció una disminución significativa en el número de blastocistos producidos *in vitro* y el incremento proporcional encontrado entre la calidad de los ovocitos en la medida en que se incrementaba la condición corporal (Denis, 2008). Teniendo en cuenta que los cambios metabólicos detectados en el suero de vacas altas productoras de leche después del parto, están presentes también en el licor folicular de los folículos dominantes, las posibilidades de desarrollo del ovocito presente en él pueden verse limitadas (Denis, 2008) influenciadas por, la hiperinsulinaemia, resistencia periférica a la insulina, incremento de la glucosa e IGF 1 (Baruselli et al., 2012).

El exceso en la cantidad de energía ingerida por parte de las donadoras es expresado en una baja producción de embriones *in vitro*, especialmente en vacas con una condición corporal muy elevada (Baruselli et al., 2012).

En un estudio que se llevó a cabo en la universidad de sao paulo en el 2011 en vacas Gir no lactantes fueron evaluados los efectos adversos que tiene las dietas altamente ricas en energía sobre la obtención y calidad de ovocitos. Las vacas fueron alimentadas con el 170% de los niveles de mantenimiento diario por 100 días. Reportando una disminución en los porcentajes de blastocitos, por aproximadamente 60 días después del último día que fueron alimentadas las donadoras con la ración altamente calórica. Encontrando picos de insulina y glucosa plasmática lo que sugiere el posible incremento periférico de la resistencia insulínica. Los ovocitos recolectados en comparación con el grupo que era alimentado con 100% de sus requerimientos diarios, tenía una disminución en IGF 1, IGF2, HSP70 (Baruselli et al., 2012).

#### **1.5.3.8. Efectos del estrés calórico en la eficiencia de la aspiración folicular**

El estrés calórico compromete la calidad de los ovocitos embriones y cuerpos lúteos de las vacas de leche (De Rensis et al.,2017). Durante el periodo de reclutamiento folicular, el estrés calórico afecta el ovocito directamente e indirectamente, elevando la temperatura de los ovarios, y generando cambios en la fisiología folicular que dañan la calidad del ovocito, sin embargo, el mecanismo por el cual es afectado el ovocito aún no está descrito rotundamente (Baruselli et al., 2012).

Estudios demuestran que vacas sometidas a estrés calórico necesitan de 2 a tres ciclos estrales para restaurar las oleadas foliculares y calidad de los ovocitos.

Sin embargo, está comprobado que los efectos del estrés calórico afectan la producción de blastocitos reportándose este problema hasta por periodos de más de 105 días después de ser expuesta la donadora a un estrés calórico (Baruselli et al., 2012).

En el verano disminuye el porcentaje de ovocitos que llegan al estadio celular de blastocitos después de la FIV comparado con los obtenidos en invierno (Baruselli et al., 2012).

En un estudio donde se aspiraron vacas altas productoras Holstein y se hizo una comparación con las vaquillas de la misma raza se encontró que la viabilidad y el número de ovocitos recolectados era muy similar en ambos durante el invierno, observando que en verano la calidad y cantidad de ovocitos era menor en las vacas (Baruselli et al., 2012).

Dos estudio retrospectivos usando un gran número de vacas donadoras Holstein en Brasil, demuestra que el estrés calórico tiene un efecto negativo en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* (Baruselli et al., 2012).

El uso de la transferencia de embriones es considerado una estrategia para minimizar los efectos negativos del estrés calórico en la reproducción bovina. En muchos estudios se ha observado resultados más favorables con transferencia de embriones en vacas sometidas a estrés calórico en comparación con la IA. Probablemente estos estudios hagan énfasis de que el mayor efecto negativo del estrés calórico en la reproducción se encuentra relacionado con el deterioro de la calidad de los ovocitos, disminuyendo las tasas de fertilización y aumentando el

número de reabsorciones embrionarias en las primeras semanas (Baruselli et *al.*, 2012).

## 2. MATERIALES Y METODOS

Se analizaron los registros de 2587 animales en lo individual de la aspiración de ovocitos por medio de la técnica de aspiración eco guiada (OPU, por sus siglas en ingles; *ovum pick-up*) durante el periodo de junio del 2016 a marzo del 2017. Los ovocitos fueron recolectados por el Centro de Embriones *In vitro* Brazil México S.A. de C.V. ubicado en el municipio de Torreón, Coahuila. El ganado al que le fueron aspirados los ovocitos proviene de ocho establos comerciales en la producción de leche y por lo tanto corresponden para la producción comercial de embriones *in vitro*. Las variables estudiadas, fueron: número total de ovocitos recuperados y número total de ovocitos viables para maduración; como factores a considerar: tipo de animal aspirado (vaquilla o vaca) el estatus del animal (vaca lactante abierta, vaca lactante preñada, vaquilla abierta y vaquilla gestante) y el día de aspiración, con lo cual se generó una nueva variable denominada índice de temperatura y humedad (ITH).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se observa diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas. En la tabla, no se muestra diferencia importante, sin embargo, Imai et al. (2006), en un experimento en el que se utilizaron vacas Holstein con un mal comportamiento reproductivo observaron diferencias significativas. Obteniendo una media de 36 +/- 16.5 ovocitos por sesión de OPU, con un 20% de blastocistos. En el presente trabajo se obtuvo una diferencia en ovocitos de 24.7 por sesión de OPU, con respecto a lo encontrado por Imai et al., (2006). Las variaciones, representadas por su coeficiente de variación son 45 y 75%, para el estudio de Imai et al., (2006) y el presente estudio, respectivamente. Esto sugiere, que la variación puede ser originada por los diferentes hatos estudiados, donde se tienen manejos distintos. Por otro lado, Chagas et al., (2014) encontró con animales *Bos taurus* entre 8-19 ovocitos por sesión, este promedio de los autores, solo muestra una diferencia de 2.21 ovocitos, con respecto al presente trabajo, considerándose similares sobre todo que está en otra altitud. También Ratto et al. (2011) en un estudio donde se comparó la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos entre Holstein y Angus, obtuvo una media para Holstein de 10 ovocitos por sesión, comparado con los 11.29 en el presente en la misma raza Holstein.

Por el lado, en las vaquillas, se observa que no hay diferencia con respecto a las vacas (Tabla 1), pero en un trabajo de Bernal et al., (2011) mencionan que en hembras de 10 y 12 meses de edad, existe un mayor número de embriones. Trabajo contradictorio al de Chagas et al., (2014), donde al comparar folículos obtenidos de la aspiración de ovarios de rastro procedentes de vacas y vaquillas *Bos indicus*,

mostró que no existe ninguna diferencia significativa en la calidad de los ovocitos obtenidos, similar a lo del presente trabajo, aunque con diferentes técnicas de obtencion.

Tabla 1.- Diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas raza Holstein por medio de OPU.

	<b>VACAS</b>		<b>VAQUILLAS</b>	
	<b>Totales</b>	<b>Viables</b>	<b>Totales</b>	<b>Viables</b>
<b>Media</b>	11.29	5.69	11.02	5.80
<b>D.E.</b>	8.56	6.15	7.72	5.17
<b>OPU</b>	1468	1468	1118	1118

En la tabla 2, se encuentra el origen de donde se llevaron a cabo las OPU), y se observa una diferencia de 3.1 ovocitos entre la menor y la más alta. Diferencia comparable a la de Chagas et al., (2014). Sin embargo, en el estudio realizado por Ratto et al., (2011), se encuentra por debajo a lo obtenido en el presente, en 7 de los hatos trabajados, siendo solo un 23 % de los hatos estudiados en el presente que se encuentran igual o por debajo de lo obtenido por Ratto et al., (2011). Lo que nos confirma que el origen, que podría ser el manejo, la alimentación y el tipo de instalaciones, en cada uno de los hatos pude ser el resultado de las variaciones encontradas.

La alimentación juega un papel muy importante en vacas lactantes, es bien sabido que la aspiración de vacas que son expuestas a grandes demandas de

energía genera una disminución en la calidad de los ovocitos (Baruselli et al., 2012). Teniendo en cuenta que los cambios metabólicos detectados en el suero de vacas altas productoras de leche después del parto, están presentes también en el líquido folicular de los folículos dominantes, disminuyendo las posibilidades de desarrollo del ovocito presente en ese ovario (Denis, 2008), a lo que podría atribuirse también esa variabilidad entre el origen de ovocitos.

Tabla 2.- Diferencias entre los ovocitos obtenidos en vacas y vaquillas raza Holstein procedentes de 8 distintos orígenes por medio de OPU.

<b>ORÍGENES</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>31</b>
<b>Media</b>	12.6	11.6	9.5	12.8	10.1	12.2	11.5	11.1
<b>D.S. +</b>	8.2	9.2	6	9.9	6.5	7.7	8.3	8.8
<b>OPU</b>	51	556	300	49	294	287	482	568
<b>%C.V.</b>	65	79	63	77	64	63	72	79

La tabla 3, muestra una comparación del número de ovocitos de vacas y vaquillas gestantes, novillas y vacas vacías; se observa que en vacas, la cantidad de ovocitos recolectados de animales gestantes es mayor a los adquiridos en vacas vacías, esta diferencia es de 1.6 ovocitos. Mientras que las vaquillas vacías, se recolectaron 2.35 ovocitos más que en las gestantes, sobre la media de ovocitos por donadora. Sin embargo, los animales que entraron en el análisis estadístico de vaquillas vacías son solo 19, en comparación de las 1099 de vaquillas holstein gestantes, por lo que sería prudente el realizar un análisis, donde se tenga un mayor número de vaquillas vacías.

En los resultados obtenidos por Ratto et *al.*, (2011), se observó un promedio de 10 ovocitos por sesión en vacas; y no existían diferencias entre vacas gestantes y vacas vacías en ovocitos y embriones totales, en el presente estudio, la cantidad de ovocitos y calidad es mayor a la encontrada por este autor en vacas gestantes.

Tabla 3.- Comparación del número de ovocitos de vacas y vaquillas gestantes, novillas y vacas vacías de raza Holstein por medio de OPU.

TIPO	GRUPO	MEDIDA	OVOCITOS TOTALES	OVOCITOS VIABLES	
VACAS	TOTAL	Media	11.29	5.69	
		D.S.	8.56	6.15	
		OPU	1468	1468	
	PREÑADAS	Media	11.02	5.8	
		D.S.	7.76	5.17	
		OPU	1306	1306	
	VACIAS	Media	9.38	4.59	
		D.S.	6.24	4.08	
		OPU	162	162	
	VAQUILLAS	TOTAL	Media	11.02	5.8
			D.S.	7.76	5.17
			OPU	1118	1118
PREÑADAS		Media	11.02	5.8	
		D.S.	7.76	5.17	
		OPU	1099	1099	
VACIAS		Media	13.37	7.26	
		D.S.	6.06	4.59	
		OPU	19	19	

Takuma et *al.*, (2010) al realizar un experimento con vacas vacías y gestantes describieron que existe una mayor producción de blastocistos viables a la hora de obtener la producción *in vitro* de embriones, ovocitos que procedían de donadoras gestantes.

Una serie de estudios han sido desarrollados durante el 2014 con ovarios de rastro, donde se describió que la presencia de progesterona a la hora de realizar la aspiración de folículos no ofreció una mayor cantidad ovocitos (Chagas et al., 2014). Pueden existir otros factores ajenos a la progesterona que pueden generar o no un resultado favorable al realizar OPU en animales preñados, por lo que es necesario el realizar un mayor número de estudios que ayuden a comprender mejor los resultados de aspirar donadoras gestantes.

Cuando se genera la variable ITH se observa un promedio de 66.29+/- 6.66 para esta variable (tabla 4) , y la recolección total de ovocitos fue de 11.2 +/- 8.2. con un porcentaje de viabilidad del 51.33% para su maduración. En un estudio realizado en el 2007 se considerado que la variable de ITH, en los días de recolección mayor a 72, continuo por un periodo de 35 días, se clasifica como estrés calórico grave. (Garcia-Ispuerto et al., 2007). Con base a lo anterior, se puede decir que, las colectas en el presente trabajo se realizaron en lo que el autor anterior considera temperatura de confort. Aunque en la tabla 4, también se muestra diferencias a favor de ITH menores.

Tabla 4 .- Comparacion del numero de ovocitos obtenidos de raza Holstein por medio de OPU, a distintos rangos de ITH.

RANGO	ITH			
	MEDIA ITH 66.29	50-60	60.1-70	70.1<
<b>MEDIA OVOCITOS TOTALES</b>	11.2	11.72	11.22	10.77
<b>D.S</b>	8.2	8.96	8.28	7.54
<b>MEDIA OVOCITOS VIABLES</b>	5.75	6.73	5.96	4.94
<b>OPU</b>	2587	661	977	949

Una serie de estudios manifiestan que existe una reducción del desarrollo folicular durante las épocas de calor, como consecuencia a la disminución de secreción de inhibina provocando el aumento anormal de las concentraciones plasmáticas de FSH, alterando el proceso de reclutamiento de los folículos dominantes (De Rensis et al., 2017). Esto trae como consecuencia un incremento en el número de vacas con folículos anovulatorios, quistes ováricos, ovulaciones dobles que provocan una modificación de las oleadas foliculares por la incongruencia de la secreción de la FSH y de la cantidad de ovocitos mayores a 5 mm serán superior, lo que influye que la tasa de colección a la hora de realizar la OPU sea menor (Segerson et al., 1984). Al considera lo anterior, las distribución de las colectas en el presente trabajo, van de 51 a 76.46 de ITH. Al agrupar ITH en los siguientes intervalos; 50-60, 60.1-70 y 70.1< , se observa una diferencia significativa (>0.05%) entre el primer y último grupo y en sus porcentajes de viabilidad (57.41%-45.8%, respectivamente).

En dos estudios retrospectivo en Brasil (Baruselli et al., 2012), usando un gran número de vacas donadoras Holstein, se obtuvieron datos muy similares a los encontrados en el presente trabajo, concluyendo que el estrés calórico tiene un efecto negativo en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

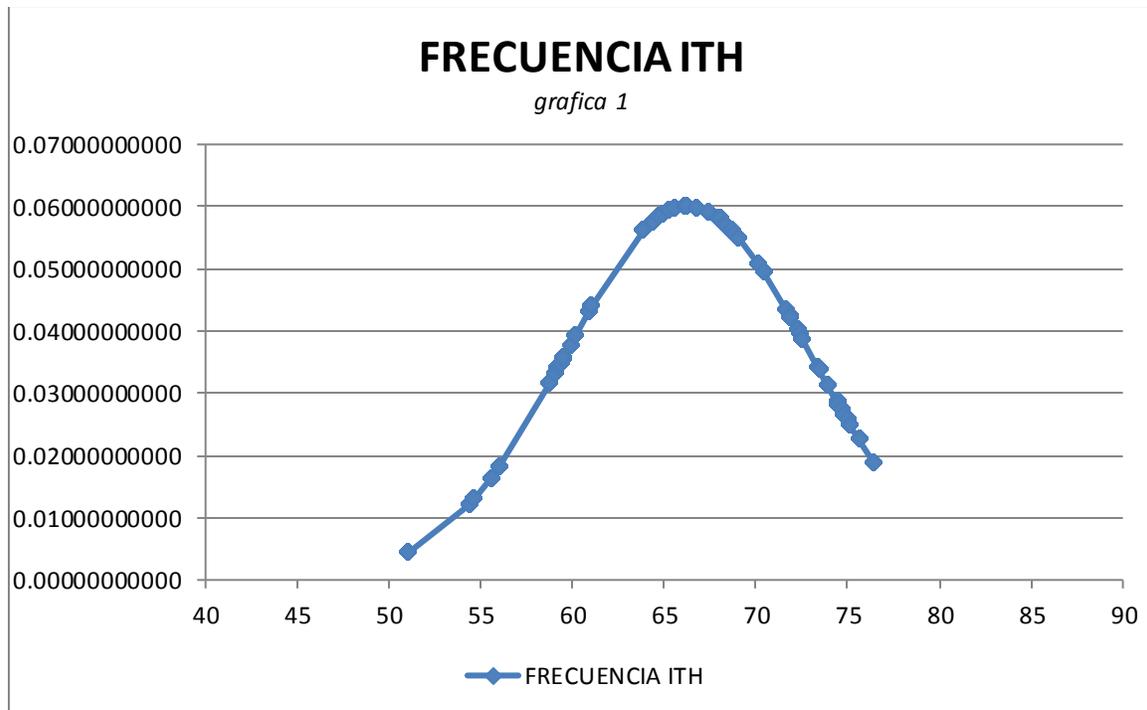
Por otro lado, esta demostrado que vacas sometidas a estrés calórico necesitan de 2 a tres ciclos estrales para restaurar las oleadas foliculares y calidad de los ovocitos. Baruselli et al., (2012) menciona que está comprobado que los efectos del estrés calórico afectan la producción de blastocitos, este problema va

hasta por periodos de más de 105 días después de ser expuesta la donadora a un estrés calórico prolongado.

El realizar un mayor número de estudios en los cuales sea monitoreado la temperatura y humedad relativa del animal durante algunos meses antes a la aspiración para observar el comportamiento de la colecta sería de gran ayuda al considerar la producción comercial de embriones. La obtención y calidad de ovocitos, en ganado lechero, se ve comprometida en temporadas de calor mostrando que se puede obtener una mejor recolección y mayor calidad si las donadoras si ITH se encuentran por debajo de 70 o en una media de 66.2 según Ronchi et *al.*, (2001).

Tabla.- 5 Ovocitos totales obtenidos por OPU

FACTORES	HATO	VACAS		VAQUILLAS			ITH	
		G/L	V/L	Gestante	Vacía	50-60	60.1-70	70.1<
<b>Media</b>	11.4	11.02	9.38	11.02	13.37	11.72	11.22	10.77
<b>±D.S.</b>	8.1	7.76	9.38	7.76	6.06	8.96	8.28	7.54
<b>Media viables</b>	5.8	5.8	4.59	5.8	7.26	6.73	5.96	4.94
<b>OPU</b>	2587	1307	162	1099	19	661	977	949



Grafica1.- Frecuencia de ITH a la hora de realizar la obtención ovocitos de raza Holstein por medio de OPU.

#### 4. CONCLUSIONES

1.- En el presente trabajo se mostró una variabilidad en las colectas de acuerdo a su origen, por lo que existe una serie de factores que pueden modificar la cantidad y calidad de ovocitos recolectados en cada sesión de OPU.

2.- El promedio de colectas de ovocitos por OPU es de  $11.29 \pm 8.56$  y  $11.02 \pm 7.76$  para vacas y vaquillas, respectivamente.

3.- No hay diferencia significativa entre vacas y vaquillas en cuanto a la colecta de ovocitos, pero si existe diferencia cuando se analiza los grupos de las vacas gestante y las vacas vacías, favoreciendo a las vacas gestantes en 1.64 ovocitos mas por sesión de OPU.

4.- El realizar un mayor número de estudios en los cuales sea monitoreado la temperatura y humedad relativa del animal durante algunos meses antes a la aspiración para observar el comportamiento de la colecta seria de gran ayuda al considerar la producción comercial de embriones.

5.- Se comprobó que la obtención y calidad de ovocitos, en ganado lechero, se ve comprometida en temporadas de calor mostrando que se puede obtener una mejor recolección y mayor calidad si las donadoras se encuentran por debajo de un ITH de 70 o en una media de 66.2.

## 5. LITERATURA CONSULTADA

- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ginther, O. J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* Vol 94. pp 177-188.
- Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L.U., Vieira, L.M., Mendanha, M. F., Ga B. 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in domestic animals.* Vol 47. pp 134-141.
- Battisti, D. S., Naylor, R. L. 2009. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science.* Vol 323. pp 240-244.
- Beede, D. K., Collier, R. J. 1985. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during termal stress. *J. anim. Sci.* Vol 62. pp 543-554.
- Bernal, U. S., Gonella, D. A. Valbuena, D., Mendoza, R., Molina, J., Chacón, L. 2011. Effect of age and coasting period on oocytes quality and their in vitro development from prepubertal cattle *Rev. MVZ Córdoba.* Vol 16. Num 2. pp 2499-2506.
- Bols, P. E., Vandenheede, J. M., Van Soom, A., Kruif, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology.* Vol 43. pp 677-687.
- Bols, J. M., M., Vandenheede, M., Van Soom, A., Kruif, A. 1999. Transvaginal ovum pick-up (opu) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology.* Vol 43. Pp 677-687

- Bols, P. E. J., Ysebaert, M. T., Lein, A., de Kruif, A. 1999. Pregnancies from prepubertal heifers following repeated oocyte collection and IVF between 6 to 12 months of age. *Theriogenology*. Vol 51. pp 298.
- Boni, R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim reprod*. Vol 9. Num 3. pp 362-369.
- Chagas, V. M., Vidal, M. E., Martins, J. H., Aguiar, H., Barros, C., Chaves, R. M., Torres-Júnior, J. 2014. Factores anatomofisiológicos que afectan a la calidad oocitaria en bovinos. *Pesq. Vet. Bras*. Vol 34. Pp 34-38.
- Córdova, I. A., Gustavo, R. C., Xolalpa, C. V. L., Córdova, J. M. S, Córdova, J. C. A. 2011. Biotecnologías de reproducción animal con posibilidad de aplicación para optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales. una revision. *Revista complutense de Ciencias Veterinarias*. Vol 5. Num 2. pp 1-10.
- De Rensis, F., Lopez-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Morini, G., Scaramuzzi, R. J. 2017. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology*. Vol 91. pp 145-153.
- Del Valle, M. C., Álvarez, A., García, L. A. 1996. Viabilidad y perspectivas de desarrollo en el nuevo reordenamiento mundial. El sistema leche y lácteos en México. Pual y IIEc-UNAM. pp. 275-287.
- Denis, R. 2008. Aspiración folicular in vivo (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencia y tecnología ganadera*. Vol 2 Num 2. pp 57-70.

- Dikmen, S., Hansen, P. J. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment?. *Journal of dairy science*. Vol 92. pp 109-116.
- Donadeu, F.X.; Ginther, O.J. 2002. Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod*. Vol 66. Pp 1111-1118.
- Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., Hemmen, A.P. 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* Vol 143. Num 3. pp 1076-1084.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. 2010. *Anatomía veterinaria*. 4ta. Edición. El manual moderno SA de CV. Pp 698-713.
- Erickson, B. H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*. Vol 25. pp 800-805.
- Espey, L. L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* Vol 50. Num 2. pp 233-238.
- Evans, A. C. O., Adams, G. P., Rawlings, N. C. 1994 Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol 102. pp 463-470.
- Friedman, E., Voet H., Reznikov, D., Wolfenson, D., Roth, Z. 2014. Hormonal treatment before and after artificial insemination differential improves fertility in

subpopulations of dairy cows during the summer and autumn. *J Dairy Sci.* Vol 97. pp 7465-7475.

Galina, C. 2012. reproducción de los animales domesticos. 3 era edición. Editorial Limusa SA de CV. Pp27-582.

Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology.* Vol 55. pp 1341-1357.

García-Ispuerto I., Lopez-Gatius F., Bech-Sabat G., Santolaria P., Yaniz J.L., Nogareda C., De rensis F., Lopez-Bejar M. 2007. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology.* Vol 67. pp 1379-1385.

Gerard, N., Delpuech, T., Oxvig, C., Overgaard, M.T., Monget, P. 2004. Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPPA) and association with dominant but not subordinated follicles. *J Endocrinol* Vol 182. Num 3. pp 457-466.

Gigli, I., RUSSO, A., AGÜERO, A. 2006. consideraciopnes sobre la dinamica ovárica en equino, bovino y camelidos sudamericanos. *Invet.* Vol 8. num 1. pp 183-204.

Giraldo, G.J.J. 2007. Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista lasallista de investigación.* Vol 4. Num 1. pp 51-57.

Hafez, E.S.E., Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, SA de CV. pp 13-29.

Hansen, J. P. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology.* Vol 65. pp 119-125.

- Hansen, P., Block, J. 2004. Towards an embryocentric world; the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. In: *Reproduction Fertility and Development*. Vol. 16. pp 1-14.
- Hernández, B., Miguel A. 2010. Estudio morfológico de órganos genitales tubulares de vacas Nguni (Landim) en Mozambique - Morphological study of tubular genital tract of Nguni (Landim) cows in Mozambique. *Revista electronica de veterinaria*. Vol 11. num 12. pp 1-10.
- Igono, M. O., Johnson, H. D., Steevens, B. J., Hainen, W. A., Shanklin, M. D. 1988. Effect of season on milk temperature, milk growth hormone, prolactin, and somatic cell counts of lactating cattle. *Inter J Biomet*. Vol 32 pp 194-200.
- Karadjole, M., I. Getz, M. Samardžija, N. Maćešić, M. Matković Z. Makek, T. Karadjole, G. Bačić, T. Dobranić, M. Poletto. 2010. The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. *Vet. Arhiv*. Vol 80. pp 445-454.
- Katska, L., Smorag, Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci*. Vol 7. pp 451-460.
- Kruip, T. A., Pieterse, M. C., Van Beneden, T. H., Vos, P. L., Wurth, Y. A., Taverne, . A. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential lternative to superovulation. *Vet Rec*. Vol 128. pp 208-210.

- Lebedeva, I. Y., Singina, G. N., Volkova, N. A., Vejlsted, M., Zinovieva, N. A., Schmidt, M. 2014. Prolactin affects bovine oocytes through direct and cumulus-mediated pathways. *Theriogenology*. Vol 82. pp 1154–1164.
- Imai, K., Tacawa, M., Yoshioka, H., Matoba, S., Narita, M., Inaba, Y., Aikawa, Y., Ohtake M., Kobayashi S. 2006. *Journal of reproduction and development*. Vol 52. pp s19-s29.
- Lopes, A. S., Martinussen, T., Greve, T., Callensen, H. 2006. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod Domest Anim*. Vol 41. pp 196-203.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De-La-Sota, R. L., Thatcher, W.W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*. Vol 70. pp 3615-3626.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., Tomanek, M. (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, 61, 329–335.
- Mapletoft, R. J., Hasler, J. F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, Vol 24. No1. pp 393-403.
- Meiyu, Q., Yuchang, Y., Hong, M., Jiabo, W., Xiaochuan, Z., Li L., Xiaodong, T., Lili, Z., Shengli, Z., Fang, S. 2013. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *J Biomim Biomater Tissue Eng*. Vol 18. pp 1-3.
- Monteiro, F. M., Melo, D. S., Ferreira, M. M. G., Carvalho, L. M., Sartoreli, E. S., Ederhardt, B. G., Nogueira, G. P., Barros, C. M. 2009. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*),

after induced estrus or after ovarian superestimulation. *Anim Reprod Sci.* Vol 110. pp 128–38

O'Callaghan, D.O., Boland M.P. 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci.* Vol 68. pp 299-314.

Odermatt, P., Cruz, M. S. J. 1997. Ventajas comparativas en la producción de leche en México. pp 955-961.

Pontesa, J. H. F., Melo, F. A., Basso, A. C., Ferreiraa, C. R., Sanchesa, B. V., Rubinc, K.C. P., Seneda M M. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology.* vol 75. pp1640–1646.

Rattoa, M. H., Peraltac, G., Mogollonb, P., Strobelb, J., Correab. 2011. Transvaginal ultrasound-guide cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef and lacting dairy cattle on pasture-based managementconditions. *Animal reproduction science.* Vol 129. pp 1-6.

Ronchi, B., Stradaoli, G., Verini Supplizi, A., Bernabuci, U., Lacetera, N., Accorsi, P. A. 2001. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17beta, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livest Prod Sci.* Vol 68. pp 231-241.

Roth, Z., Meidan R., Braw-Tal, R., Wolfenson, D. 2001. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil Fert.* Vol 120. pp 83-90.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

2009. La producción nacional de leche genera 200 mil empleos permanentes:

SAGARPA. México. D.F, Núm. 318/09. [http:](http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/lists/enero%202009/attachments/375/b318.pdf)

[//www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/lists/enero%202009/attachments/3](http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/lists/enero%202009/attachments/375/b318.pdf)

[75/b318.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/lists/enero%202009/attachments/375/b318.pdf) Consultado el 16 mayo de 2017.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Rural, Pesca y Alimentación). 2016.

Boletín de leche abril-junio 2016.

[http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/B\\_de\\_Leche\\_abril-junio\\_2016%20.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/B_de_Leche_abril-junio_2016%20.pdf).

Consultado: 16 de mayo del 2017

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

2000. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino en

México.

[http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situ](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/20/sitlech99.pdf)

[acin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/20/sitlech99.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/20/sitlech99.pdf). Consultado: 16

mayo del 2017.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

2016. Panorama de la lechería en México.

[http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche\\_Septiembre2016.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Septiembre2016.pdf).

Consultado; 16 de mayo del 2017.

Segerson, E. C., Hansen, T. R., Libby, D. W., Randel, R. D., Getz, W. R. 1984. Ovarian

and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. J Anim Sci. Vol

59. pp 1026–1046.

- Seidel, G. E., Seidel, S. M. 2005. Training manual for embrion transfer in cattle. Fao animal production and healt paper. Colorado. United States of America.
- Serfín. 1995. La industria de productos lácteos, en Anuario Sectorial, México. pp. 25-27.
- Stroud, B. 2011. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS Newsletter
- Thibier, M. 2006. Transfers of both in vivo-derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. IETS Embryo Transfer Newsletter. Vol 24. pp11–9.
- Velázquez, M. M., Hernánde, S. J. R. 2008. Evaluación de la eficiencia productiva y reproductiva de vaquillas holstein friesland importadas a la Comarca Lagunera, México. Revista Chapingo serie zonas áridas. Vol 7. pp 91-105.
- Viana, J. H. M., Ferreira, A. M., Sá W F., Camargo, L. S. A. 2000 Follicular dynamics in zebu cattle. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Vol 35. pp 2501–2509.
- Watanabe, M. R., Watanabe, Y. F., Franceschini, P. H., Dayan, A., Lobo, RB. 1999. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and in vitro embryo production. Theriogenology. vol 51. pp 438 (Abstract).