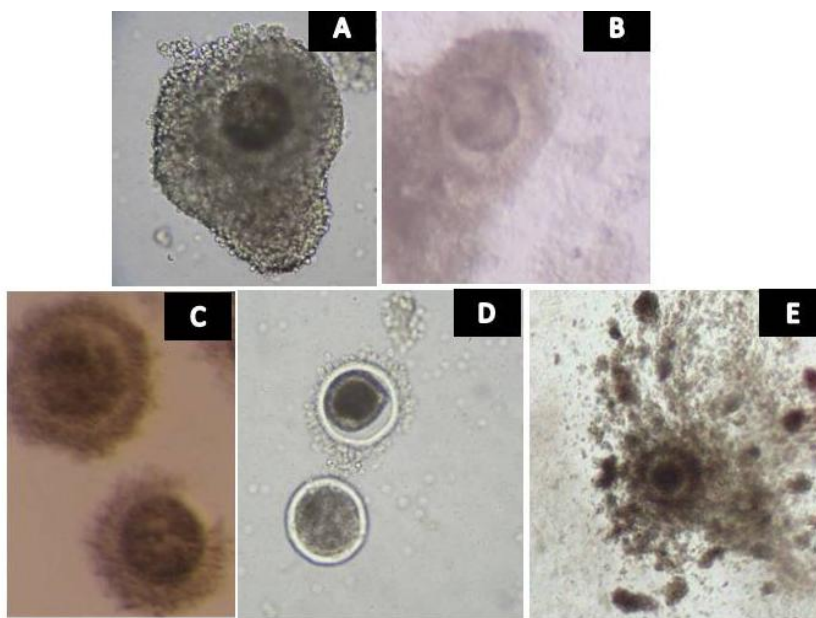


TESIS DOCTORAL

“OPTIMIZACION DEL METODO DE RECUPERACION DE
OVOCITOS PARA LA FECUNDACION *IN VITRO*”



Luis Arturo Rodríguez Zamora
Lugo, 2013



Dña. Mónica Barrio López, Profesora Contratada Interina, D. Pedro García Herradón, Profesor Titular y D. Juan José Becerra González, Profesor Contratado Doctor, pertenecientes al Departamento de Patología Animal,

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “Optimización del Método de recuperación de ovocitos para la fecundación *in vitro*” de la que es autor el licenciado en veterinaria D. Luis Arturo Rodríguez Zamora ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo nuestra dirección y, en opinión de los abajo firmantes, este trabajo reúne las condiciones legales precisas para optar al Título de Doctor en Veterinaria

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en **Lugo al 01 de febrero del 2013.**

Fdo. Pedro J. García Herradón

Fdo. Juan J. Becerra González

Fdo. Mónica Barrio López



*AGRADECIMIENTOS
Y
DEDICATORIA*

Porque “nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado” (M. Gandhi), así “los logros de una organización son los resultados del esfuerzo combinado de cada individuo” (Vince Lombardi) esta humilde Tesis ha sido posible gracias a la dedicación constante del equipo docente de Obstetricia y Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria –USC, quienes han puesto en mi persona la confianza necesaria para desarrollar este trabajo de investigación. Por ello quiero destacar mi sincero agradecimiento:

- Al Dr. Pedro García Herradón, por ser la puerta de entrada a esta magnífica experiencia, y pese a su alta responsabilidad ha mantenido una sabia dirección de la tesis.
- Al Dr. Luis Quintela Arias por su amistad y su apoyo incondicional en muchas materias especialmente con la estadística.
- Al Dr. Juan Becerra Gonzales, porque su especial sentido del humor y su firmeza en la dirección me ha animado seguir adelante en la redacción tesis de una manera sistemática y organizada.
- Especial agradecimiento a la Dra Mónica Barrio López, por haber estado pie a pie en todas las etapas de la tesis, y me ha permitido cristalizarla.
- Al Dr. Juan Caizos Cagiao, por su orientación y conducción precisa con los trabajos de investigación

A todo el personal que labora en el matadero NOVAFRIGSA-COREN, quienes han permitido tomar las muestras necesarias para el desarrollo de la tesis. Aquí también agradecer a cuerpo OFICIAL DE MÉDICOS VETERINARIOS DEL SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL, quienes cortésmente me han otorgado la información relevante para la tesis.

A las personas que directa o indirectamente hacen que funcione el proyecto de Erasmus Mundus External Cooperation Window para el lote 18 (EMUNDUS18), coordinado por la Universidad de Santiago de Compostela, sin su financiamiento y orientación nada hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, socia del programa Erasmus -EMUNDUS18-, gracias a la cual ha sido posible postular al programa y haber sido beneficiario de intercambio.

A los amigos de la Asociación Socio Cultural Perú-Lugo, con quienes hemos compartido gratos momentos y un afectuoso cariño.

A todos mis amigos de intercambio, los Erasmus de Europa, los de Emundus, los de AECI de España, los de la Alianza Estratégica del Perú, SENESCYT de Ecuador, Ciencias Sin Fronteras del Brasil, y los otros programas y/o acuerdos Nacionales e Internacionales, así mismo aquell@s que hacen denodados esfuerzos por autofinanciarse. A cada uno de ell@s, porque siendo de lugares tan distantes hemos logrado comprendernos y hacer una bonita amistad en un lugar tan maravilloso de Europa llamado LUGO.

A mi Padre y a mis hermanos Miriam y Kike, y sus respectivas familias.

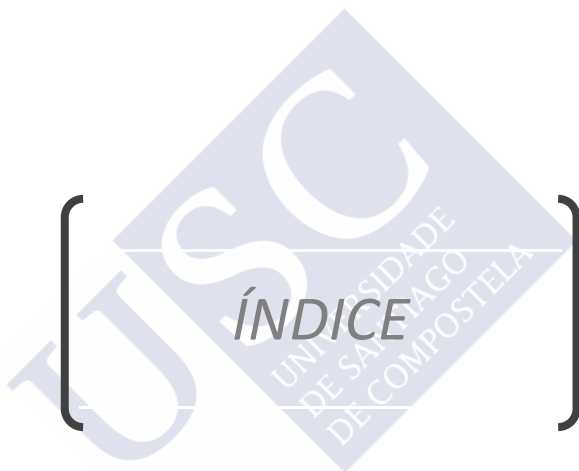
Por último y sin duda uno de los más decisivos para mantenerme menos preocupado agradezco a mis suegros Don Alejandro y Doña Lucía y su familia en Ayacucho-Perú.

Dedico este trabajo a mi esposa Sulma porque su amor me lo ha demostrado en hechos, y con mucha sensatez y dulzura ha logrado llevar adelante este abandono temporal de mi hogar.

A mis hijos Karely y Marcelo mi motor y motivo más importante en mi vida para emprender grandes retos.

Y a Catita, mi Madre, quien me ilumina desde el Cielo.





ÍNDICE

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	xix
Índice de figuras	xxi
Abreviaturas	xxiii
Resumen-Resumo-Abstract.....	xxvii
INTRODUCCIÓN	41
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	47
I.- DESARROLLO DEL FOLÍCULO Y DEL OVOCITO	47
1.1 Desarrollo prenatal. Orígenes	47
1.2. Desarrollo postnatal. Etapa prepuberal y puberal	51
II.- ULTRAESTRUCTURA, MADURACIÓN Y REGULACIÓN DEL OVOCITO.....	51
2.1. Ultraestructura	51
2.2. Maduración y regulación del ovocito: nuclear, citoplasmática y molecular ...	53
III. LA PUBERTAD.....	56
3.1. Etapa prepuberal - puberal	56
3.2. Mecanismos de regulación.....	57
IV. MADUREZ SEXUAL.....	58
4.1. Regulación endócrina y fases del ciclo estral	58
4.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral	61
V. PRINCIPALES INDICADORES DE CALIDAD DE UN OVOCITO.....	65
5.1. Las células del cúmulo del ovocito	65
5.2. El citoplasma del ovocito.....	69
5.3. El Tamaño del ovocito	71
5.4. El tamaño folicular.....	72
VI. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION y CALIDAD DE LOS OVOCITOS.....	73
6.1. Técnica de recolección de ovocitos	73

6.2. Aptitud productiva.....	78
6.3. Fase del ciclo estral.....	79
6.4. Peso de los ovarios	80
6.5. Edad de la donante	81
OBJETIVOS	85
MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
I. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS OVARIOS	89
II. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES DE OVARIOS	89
2.1. Aptitud productiva.....	90
2.2. Fase del Ciclo estral	91
2.3. Edad	91
III. TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS	93
3.1. Técnica de Aspiración:	93
3.2. Técnica de Slicing:.....	93
IV. CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS.....	94
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	96
Experimento 1. Influencia de la aptitud productiva y la técnica de recolección en la recuperación de ovocitos bovinos.....	96
Experimento 2. Influencia del peso del ovario, la aptitud productiva y la fase del ciclo estral en la recuperación de ovocitos bovinos.....	97
Experimento 3. Influencia de la edad, fase del ciclo estral y peso de los ovarios en la recuperación de ovocitos bovinos.....	98
Experimento 4. Relación del diámetro del ovocito con la edad de los donantes de ovarios procedentes de matadero.....	99
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	100

RESULTADOS.....	103
Experimento 1. Influencia de la aptitud productiva y la técnica de recolección en la recuperación de ovocitos bovinos.....	103
Experimento 2. Influencia del peso del ovario, la aptitud productiva y la fase del ciclo estral en la recuperación de ovocitos bovinos.....	106
Experimento 3. Influencia de la edad, fase del ciclo estral y peso de los ovarios en la recuperación de ovocitos bovinos.....	108
Experimento 4. Relación del diámetro del ovocito con la edad de las donantes de ovarios procedentes de matadero.....	111
DISCUSIÓN.....	115
I. LA TÉCNICA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS.....	116
II. LA APTITUD PRODUCTIVA.....	118
III. EL PESO DE LOS OVARIOS.....	119
IV. LA FASE DEL CICLO ESTRAL.....	120
V. LA EDAD.....	121
VI. EL DIÁMETRO DEL OVOCITO.....	122
CONCLUSIONES.....	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

Índice de tablas

REVISION BIBLIOGRAFICA

Tabla 1. Resultados de la cantidad y calidad de ovocitos bovinos utilizando técnicas de aspiración y slicing según diversos autores.....	75
--	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 1.....	96
Tabla 3. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 2.....	97
Tabla 4. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 3.....	98
Tabla 5. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 4.....	99

RESULTADOS

Tabla 6. Producción de ovocitos bovinos por categorías según la aptitud productiva y la técnica utilizada para su recolección.....	104
Tabla 7. Resumen de las características de recuperación de ovocitos según técnica utilizada.....	106
Tabla 8. Producción de ovocitos recuperados según aptitud productiva y fase del ciclo estral en bovinos.....	108
Tabla 9. Producción de ovocitos recuperados de bovino de carne sacrificados en matadero según edad de donantes.....	109
Tabla 10. Producción de ovocitos recuperados de ganado de carne según edad y fase del ciclo estral.....	110
Tabla 11. Diámetro (μm) de las distintas categorías de ovocitos bovinos de carne según la edad.....	111

Índice de figuras

REVISION BIBLIOGRAFICA

Figura 1. Descripción esquemática de las fases del ciclo estral, eventos hormonales LH, FSH y P4; y los modelos de crecimiento de folículos ováricos en bovinos.	64
---	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2. Reconocimiento de la aptitud productiva y recolección de ovarios en el matadero.....	90
Figura 3. Resumen de las diferentes etapas de los experimentos.....	92
Figura 4. Técnica de aspiración para recolección de ovocitos.....	93
Figura 5. Técnica de slicing para recolección de ovocitos.....	94
Figura 6. Esquema de la categorización de ovocitos bovinos mediante observación en el estereoscopio.....	95
Figura 7. Medida del diámetro (μm) de las distintas categorías de ovocitos (A, B, C, D y E).....	99

RESULTADOS

Figura 8. Diferencias en la distribución porcentual de las categorías de ovocitos bovinos recuperados en matadero según técnica utilizada.....	105
Figura 9. Diferencias en la relación del peso del ovario (par) con el número de ovocitos recuperados según categorías superior o inferior ($P < 0,01$).	107
Figura 10. Diferencias en la distribución porcentual de las categorías de ovocitos bovinos según edad de donantes ($P < 0,05$).	110

Abreviaturas

A

ADN: ácido desoxiribonucleico
AFC: número de folículos antrales (Antral Follicle Count)
AMH: hormona antimülleriana
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosomal
ATP: adenosintrifosfato

B

BEN: balance energético negativo
BHB: beta hidroxibutirato
BSA: albúmina sérica bovina

C

Ca⁺²: ión calcio
COC: Complejo cúmulo-ovocito (Cumulus-Oocyte Complex)
CCs: células del cúmulo
CIV: cultivo *in vitro*
CL: cuerpo lúteo
CMGs: células de la pared de la granulosa

D-E

D0: día cero
DO: días abiertos (days open)
E1: endotelina-1
EAA: aminoácidos esenciales
ECM: expansión de la matriz extracelular
EGF: factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor).
EGF-R: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER: receptores de estradiol
Exp: experimento

F

FasL: Fas ligando
FD: folículo dominante
FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico 2 (Fibroblast Growth Factor 2)
Fig: figura
FIV: fecundación *in vitro*
FSH: hormona folículo estimulante

G

GDF9: factor de diferenciación del crecimiento
9
GH: hormona del crecimiento
Glu: glucosa
GnRH: hormona estimulante de gonadotropinas
GSH: glutatión forma reducida
GV: vesícula germinal
GVBD: ruptura de la vesícula germinal (Germinal Vesicle Breakdown)

H

hCG: gonadotropina coriónica humana
HHG: hipotálamo-hipófisis-gónadas
HSP70: proteína 70

I

IA: inseminación artificial
ICSI: inyección espermática intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)
IETS: Sociedad internacional de transferencia de embriones (International Embryo Transfer Society)
IFN γ : Interferón gamma
IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (insulin-like growth factor-I)
IGF-I-R: receptor del IGF

L

LH: hormona luteinizante
LH-R: receptor de la hormona luteinizante
LOS: síndrome de exceso de volumen fetal (Large Offspring Syndrom)

M

MAPK: proteína quinasa mitógena activada (mitogen activated protein kinases)
ME: microscopía electrónica
MI: metafase I
MII: metafase II
MIV: maduración *in vitro*

N

NaCl: cloruro de sodio
NAD: nicotinamida adenosin dinucleotido
NADP: nicotinamida adenosin dinucleotido en forma oxidada
NADPH: nicotinamida adenosin dinucleotido en forma reducida
NEFA: ácidos grasos no esterificados
NT: transferencia nuclear

O

O₂: oxígeno
OMI: factor inhibidor de la meiosis
OPU: aspiración transvaginal ecoguiada (Ovum Pick Up)
OSFs: factores de crecimiento del ovocito

P

P₄: progesterona
PB: cuerpo polar (Polar Body)
PBS: solución salina fosfatada (Phosphate Buffered Saline)
PGE₂: prostaglandina E2
PGF_{2α} : prostaglandina F dos alfa
PIV: producción *in vitro*
PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C
PNM: pronúcleo masculino
PPP: vía de las pentosas fosfato (Pentose Phosphate Pathway)
pRb: proteína retinoblástica (retinoblastoma protein)

R-S

ROS: moléculas reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SER: retículo endoplásmico liso
SSF: solución salina fisiológica

T

Tab: Tabla
TAO: aspiración por transiluminación ovárica.
TCM-199: medio de cultivo 199 (Tissue Culture Medium 199)
TGF: factor transformante del crecimiento
TGF-P: miembros de la superfamilia de TGF
TNFα: factor de necrosis tumoral alpha

U-V-Z

UI: unidades internacionales
VEGF A: factor de crecimiento vascular endotelial A (vascular endothelial growth factors)
VEGP: factores de crecimiento endotelio vascular (vascular endothelium growth factor)
VG: vesícula germinativa
ZP: zona pelúcida

The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'. The watermark is centered on the page and partially overlaps the text.

RESUMEN

RESUMO

ABSTRACT



Resumen-Resumo-Abstract

Título: OPTIMIZACION DEL METODO DE RECUPERACION DE OVOCITOS PARA LA FECUNDACION *IN VITRO*

La producción de embriones *in vitro* es una de las biotecnologías con mayor potencial aplicativo en la producción bovina. Sin embargo, este proceso sólo permite obtener el 30–40% de blastocistos de los ovocitos utilizados, lo que demuestra ser poco eficiente para su empleo a escala comercial. Dentro de los múltiples factores causales, la cantidad y calidad de los ovocitos empleados representa uno de los principales elementos a tener en cuenta. Por ello, en el intento de optimizar el método de recuperación de ovocitos de ovarios procedentes de animales sacrificados en el matadero para la fecundación *in vitro*, se consideró que factores como la técnica de recuperación de ovocitos, la aptitud productiva, la fase del ciclo estral, la edad y el peso de los ovarios pueden influir en la cantidad y calidad de ovocitos. Para tal fin, hemos utilizado cuatro ensayos.

El objetivo del primer trabajo fue determinar la eficiencia en la obtención de ovocitos a partir de ovarios procedentes de hembras bovinas sacrificadas en matadero, según su aptitud productiva y en función de la técnica utilizada. Se recogieron los ovarios de un matadero de la provincia de Lugo durante los meses diciembre 2010 hasta febrero 2011. Los ovarios fueron divididos en dos grupos: Grupo I (n=180), ovarios procedentes de animales de aptitud cárnica y Grupo II (n=180), ovarios procedentes de animales de aptitud lechera. Cada grupo de ovarios se volvió a dividir al azar en dos grupos, en los que se aplicó una técnica diferente de recuperación de ovocitos (slicing o aspiración). La clasificación de los ovocitos recolectados se realizó en función del número y compactación de las células del cúmulo, así como del grado de homogeneidad y color del citoplasma, estableciendo cinco categorías (A, B, C, D y E). Se recuperaron una media de $6,4 \pm 2,4$ y $11,2 \pm 4,3$ ovocitos mediante las técnicas de aspiración y slicing,

respectivamente ($P < 0,05$). Así también, el mayor número de ovocitos de calidad superior fue recuperado por la técnica de slicing (63%) que por la de aspiración (47%). A pesar de que el procedimiento de slicing parecía ser más lento, esta técnica aumentaba la eficiencia del proceso, ya que se obtenía un mayor número de ovocitos de calidad superior por unidad de tiempo. Por otro lado, la aptitud productiva de los animales no presentó ninguna influencia sobre la recuperación de ovocitos, ni en la cantidad ni en la calidad.

Después de haber comprobado que la técnica de slicing resultaba ser la más adecuada para la recuperación de ovocitos en número y calidad, se diseñó el ensayo 2 para determinar la posible influencia del peso de los ovarios, de la aptitud productiva y de la fase del ciclo estral sobre la recolección de ovocitos. Para lo que, se recuperaron 105 pares de ovarios durante los meses de febrero y marzo 2011, en un matadero local de la provincia de Lugo. Los pares de ovarios se separaron según la aptitud productiva del animal (carne o leche), y posteriormente en función de la fase del ciclo estral (lútea o folicular). Los ovocitos fueron obtenidos por la técnica de slicing y clasificados en las cinco categorías ya mencionadas.

En esta experiencia se observó que el peso ovárico influía en todos los parámetros evaluados, por lo que se incluyó en el modelo como cofactor para eliminar efectos confusores. Los resultados de este estudio indicaron que la fase del ciclo estral no afectaba al número ni la calidad de ovocitos recuperados. Así mismo, la aptitud productiva tampoco ejerció influencia alguna en la producción de ovocitos, ni su interacción con las fases del ciclo estral.

El ensayo 3 fue desarrollado para conocer la influencia de la edad y de la fase del ciclo estral de los animales sobre la recuperación de ovocitos, para lo cual se utilizaron los datos proporcionados por el Servicio Veterinario Oficial del matadero, agrupándose a los donantes en dos grupos: de 7-12 meses (novillas) y ≥ 24 meses (adultas)). Este

estudio fue realizado exclusivamente en animales de razas cárnicas, ya que, en el matadero en el que se realizó el estudio no se sacrificaban hembras jóvenes de aptitud láctea. Para este ensayo fueron pesados 109 pares de ovarios, y mediante la técnica de slicing se recuperaron 3100 ovocitos, para luego ser clasificados en las distintas categorías. El número total de ovocitos recuperados fue mayor en novillas que en adultas con 29,3 vs 25,0 respectivamente, sin embargo no se apreciaron diferencias si sólo considerábamos los ovocitos de categoría superior. La fase del ciclo estral y sus interacciones no influyeron en el número y la calidad de los ovocitos recuperados.

El objetivo del ensayo 4 fue relacionar el diámetro del ovocito con la edad de las donantes de ovarios. La recogida de ovarios fue realizada sistemáticamente una vez por semana durante los meses de marzo y abril 2012. Se recolectaron ovarios con el mismo procedimiento del tercer ensayo. Una vez clasificado los ovocitos se escogieron al azar 20 unidades para novillas y 30 para adultas y, a continuación, se midió el diámetro mediante un microscopio provisto de ocular graduado. En todas las categorías (A, B, C, D y E) el diámetro de los ovocitos en vacas adultas era superior a los de novillas, siendo en promedio 139,1 μ m y 129,5 μ m respectivamente.

A modo de resumen global de los cuatro ensayos, a la hora de elegir ovarios procedentes del matadero sería más eficiente: elegir aquellos de mayores dimensiones (peso), puesto que se obtienen mayores rendimientos en cantidad y calidad de ovocitos. No es necesario tener en cuenta ni la fase del ciclo estral ni la aptitud productiva de las donantes puesto que no influyen en la recuperación de ovocitos. Por otro lado sería recomendable realizar la técnica slicing ya que resultó ser más eficiente que la técnica de aspiración.

A priori debemos considerar que se pueden emplear hembras jóvenes sacrificadas en matadero como donantes de ovocitos ya que no parece influir en el rendimiento del proceso. Además, a pesar de que el diámetro de los ovocitos recuperados en las

hembras jóvenes es inferior al de las vacas adultas, su tamaño es superior a las cifras consideradas como límite para asegurar su competencia. Sin embargo, y a falta de estudios más profundos, parece viable emplear hembras jóvenes en la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: recuperación ovocitos bovinos, aptitud productiva, fase ciclo estral, peso ovárico, diámetro ovocitario.



Resumo

OPTIMIZACIÓN DO MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS PARA A FECUNDACIÓN *IN VITRO*

A produción de embrións *in vitro* é unha das biotecnoloxías con maior potencial de aplicación na produción bovina. Non obstante, este proceso só permite obter o 30-40% de blastocistos dos ovocitos empregados, o que demostra ser pouco eficiente para a súa utilización a escala comercial. Dentro dos múltiples factores causais, a cantidade e calidade dos ovocitos empregados representa un dos principais elementos a ter en conta. Por iso, no intento de optimizar o método de recuperación de ovocitos de ovarios procedente de animais sacrificados no matadoiro para a fecundación *in vitro* considerouse que factores como a técnica de recuperación de ovocitos, a aptitude produtiva, a fase do ciclo estral, a idade e o peso dos ovarios poden influír na cantidade e calidade dos ovocitos. Para tal fin, deseñáronse catro ensaios.

O obxectivo do primeiro traballo foi determinar a eficiencia na obtención de ovocitos a partires de ovarios procedentes de femias bovinas sacrificadas no matadoiro, segundo a súa aptitude produtiva e en función da técnica empregada. Recolléronse os ovarios dun matadoiro da provincia de Lugo durante os meses de decembro 2010 ata febreiro de 2011. Os ovarios foron divididos ó azar en dous grupos: Grupo I (n=18) ovarios procedentes de animais de aptitude cárnica e Grupo II (n=18), ovarios procedentes de animais de aptitude leiteira. Cada grupo de ovarios volveuse dividir ó azar en dous grupos, nos que se aplicou unha técnica diferente de recuperación dos ovocitos (slicing ou aspiración). A clasificación dos ovocitos recollidos realizouse en función do número e compactación das células do cúmulo, así como do grao de homoxeneidade e color do citoplasma, establecéndose cinco categorías (A, B, C, D, E). Recuperáronse unha media de $6,4 \pm 2,4$ y $11,2 \pm 4,3$ ovocitos mediante as técnicas de aspiración e slicing, respectivamente ($P < 0,05$). Así tamén, o maior número de ovocitos de calidade superior

foi recuperado pola técnica de slicing (47%) que por a de aspiración (64%). A pesares de que o procedemento de slicing parecía ser máis lento, esta técnica aumentaba a eficiencia do proceso, xa que se obtiña un maior número de ovocitos de calidade superior por unidade de tempo.

Por outra banda, a aptitude produtiva dos animais non presentou ningunha influencia sobre a recuperación de ovocitos, nin na cantidade nin na calidade.

Despois de ter comprobado que a técnica de slicing resultaba ser a máis axeitada para a recuperación de ovocitos en número e calidade, deseñouse o ensaio 2 para determinar a posible influencia do peso dos ovarios, da aptitude produtiva e da fase do ciclo estral sobre a recolleita de ovocitos. Para o que, recuperáronse 105 pares de ovarios durante os meses de febreiro e marzo 2011, nun matadoiro local da provincia de Lugo. Os pares de ovarios foron separados segundo a aptitude produtiva do animal (carne ou leite), e posteriormente en función da fase do ciclo estral (lútea ou folicular). Os ovocitos foron obtidos pola técnica de slicing e clasificados nas cinco categorías mencionadas no primeiro ensaio.

Nesta experiencia observouse que o peso ovárico influía en todos os parámetros avaliados, polo que se incluíu no modelo como cofactor para eliminar os efectos confusores. Os resultados deste estudo indicaron que a fase do ciclo estral non afectaba nin ó número nin a calidade dos ovocitos recuperados. Así mesmo, a aptitude produtiva tampouco exerceu influencia algunha na produción de ovocitos, nin a súa interacción coas fases do ciclo estral.

O ensaio 3 foi desenvolvido para coñecer a influencia da idade e das fases do ciclo estral dos animais sobre a recuperación dos ovocitos, para o que se empregaron os datos proporcionados polos Servizos Veterinarios oficiais do matadoiro, agrupándose as donantes en dous grupos (de 7-12 meses (xovencas) y ≥ 24 meses (adultas)). Este estudo foi desenvolvido exclusivamente en animais de razas cárnicas, xa que, no

matadoiro no que se realizou o estudo non se sacrificaban femias novas de aptitude láctea. Para este ensaio foron pesados 109 pares de ovarios e mediante a técnica de slicing recuperáronse 3100 ovocitos, para posteriormente ser clasificados nas distintas categorías. O número total de ovocitos recuperados foi maior nas xovencas que nas adultas con 29,3 vs 25,0 respectivamente, non obstante non se apreciaron diferenzas cando só considerábam os ovocitos de calidade superior. A fase do ciclo estral e as súas interaccións non influíron no número e na calidade dos ovocitos recuperados.

O obxectivo do ensaio 4 foi relacionar o diámetro do ovocito coa idade das donantes de ovarios. A recollida de ovarios foi realizada sistematicamente unha vez por semana durante os meses de marzo e abril 2012. Recolléronse os ovarios co mesmo procedemento do terceiro ensaio. Unha vez clasificados os ovocitos, escolléronse ó azar 10 unidades de cada categoría e mediuse o diámetro mediante un microscopio provisto dun ocular graduado. En todas as categorías (A, B, C, D, E) o diámetro dos ovocitos en vacas adultas era superior ós das xovencas, sendo de media 139,1 μ m y 129,5 μ m respectivamente.

A modo de resumen global dos catro ensaios, á hora de escoller ovarios procedentes do matadoiro sería máis eficiente: escoller aqueles de maiores dimensións (peso), xa que se obteñen maiores rendementos en cantidade e calidade de ovocitos. Non é necesario ter en conta nin a fase do ciclo estral nin a aptitude produtiva das donantes, xa que non influen na recuperación dos ovocitos. Por outra banda, sería recomendable realizar a técnica de slicing xa que resultou máis eficiente que a técnica de aspiración.

A priori debemos considerar que se poden empregar femias novas sacrificadas no matadoiro como donantes de ovocitos xa que non parece influír no rendimento do proceso. Ademais, a pesares de que o diámetro dos ovocitos recuperados das femias novas é inferior ó das vacas adultas, o seu tamaño é superior ás cifras consideradas coma límite para asegurar a súa competencia. Porén, e a falta de estudos máis

profundos, parece viable empregar femias novas na produción *in vitro* de embrións bovinos.

Palabras clave: recuperación ovocitos bovino, aptitude produtiva, fase ciclo estral, peso do ovario, diámetro ovocitario.



ABSTRACT**OPTIMIZATION OF THE METHOD OF OOCYTE RETRIEVAL FOR *IN VITRO* FECUNDATION**

The *in vitro* embryo production (IEP) is one of the most promising biotechnologies in cattle. However, this process allows for only 30-40% of blastocysts from oocytes, which proves not to be very efficient for use on a commercial scale. Among the multiple causal factors, the quantity and quality of oocytes employees represents one of the key elements to consider. Therefore, in an attempt to optimize the recovery method of ovarian oocytes from animals slaughtered at the abattoir for IVF, we considered factors such as oocyte retrieval technique, productive aptitude, phase of the estrous cycle, the donor age and ovaries weight may influence the quantity and quality of oocytes. We used four trials to this purpose.

The aim of the first study was to determine the number and quality of recovered oocytes from bovine ovaries obtained at a northwest of Spain's slaughterhouse according to its productive aptitude and depending on the technique of oocytes collection. Ovaries were collected during December 2010 to February 2011. They were randomly divided into two groups upon its productive aptitude: Group I, 180 ovaries from beef cattle, and Group II, 180 ovaries from dairy. Each group of ovaries was again divided according to technique of oocyte collection (slicing or aspiration) to be used. Classification of collected oocytes was based upon the number and compactness of their cumulus cells, and the uniformity and color of cytoplasm: A, B, C, D and E (A and B as superior and C, D and E as inferior quality). Slicing yielded significantly ($P < 0,05$) more total oocytes/ovary 11.2 ± 4.3 than by aspiration 6.4 ± 2.4 . In the same way, superior quality oocytes were recovered by slicing technique than aspiration (63% vs 47% respectively). Although the slicing procedure seemed to be slower, this technique increased the efficiency of the process because it was obtained a greater number of higher quality oocytes per unit time. The productive aptitude of the animals had no influence on the recovery of oocytes.

After checking that the slicing technique proved to be the most suitable for the recovery of oocytes, test 2 was designed to determine the possible influence of the weight of the ovaries, the productive aptitude and the phase of estrous cycle on oocyte retrieval. We studied in 105 pairs of ovaries recovered during the months of February and March 2011. They were separated according to the productive aptitude (meat or milk), and then by the moment of the estrous cycle (luteal or follicular). Oocytes were

obtained by the technique of slicing and classified in five categories mentioned above. In this experiment, it was observed that the ovarian weight influenced all parameters evaluated, so it was included in the model as a cofactor to eliminate confounding effects. The results of this study indicated that the phase of the estrous cycle did not affect the number or quality of oocytes retrieved, neither their interactions with productive aptitude.

Test 3 was developed to determine the influence of donor age and stage of the estrous cycle of animals on oocyte retrieval. We used data provided by the Official Veterinary Service slaughterhouse and donors were grouped into two: 7-12 months (heifers) and ≥ 24 months (adults). This study was conducted exclusively in beef breed animals. From 109 pairs of ovaries were recovered 3100 oocytes using slicing technique, later they were classified into 5 categories (the same from above essays). The total number of oocytes obtained was higher in heifers than in adults with 29.3 vs 25.0 respectively, but there was no difference if we considered only superior quality. The estrus cycle and its interactions did not influence the number and quality of oocytes recollected.

The objective of Test 4 was to relate the diameter of the oocyte with the age of the donors of ovaries. Collection of ovaries was performed systematically once a week during the months of March and April 2012. Ovaries were collected with the same method of the third test. Once classified the oocytes were randomly selected 10 units of each class and diameter was measured using a microscope with graduated eyepiece. In all categories (A, B, C, D and E) the diameter of oocytes in adult cows was higher than those of heifers, averaging 139.1 μ m and 129.5 μ m respectively.

As an overall summary of the four trials, when choosing from the abattoir ovaries would be more efficient: choose those of larger dimensions (weight) since higher yields are obtained in quantity and quality of oocytes. There is no need to consider the stage of the estrous cycle or productive capacity of the donor since there were no influences on oocyte retrieval. On the other hand, it would be advisable to perform the slicing technique because it was more efficient than the aspiration technique.

A priori we should consider that it can be employed heifers as oocyte donors since they did not appears to influence in the process of performance. Furthermore, although the diameter of oocytes recovered in young females is lower than adult cows, its size is greater than the minimum considered as a limit to ensure competition. However, in the

absence of further studies, employing young females seems to be viable for *in vitro* production of bovine embryos.

Keywords: bovine oocyte retrieval, productive aptitude, estrous cycle phase, ovarian weight, oocyte diameter.



A large, light blue watermark of the USC logo is centered on the page. The logo consists of a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' around its perimeter.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El éxito de los programas de fecundación *in vitro* (FIV) se fundamenta en la calidad y cantidad de los ovocitos empleados (Wang *et al.*, 2009). Es por ello que el ovocito, y su proceso de crecimiento y maduración, son estudiados de forma recurrente para mejorar la eficacia de la producción de embriones mediante este procedimiento (Merton *et al.*, 2003). Sin embargo, no podemos olvidar que para la aplicación comercial de esta técnica no sólo es importante obtener un número elevado de embriones, sino también mejorar la eficiencia reduciendo los costes de producción (Pfeifer *et al.*, 2008).

Debe tenerse en cuenta que la calidad del ovocito condicionará la supervivencia embrionaria, el establecimiento y el mantenimiento de la preñez, el desarrollo fetal, y hasta la aparición de enfermedades en el animal adulto.

Es ampliamente aceptado que la capacidad de desarrollo se adquiere durante la foliculogénesis (mientras el ovocito crece) y durante el periodo de maduración del mismo (Krisner, 2004). Por ello, para la producción de embriones *in vitro* (PIV), la predicción del potencial de desarrollo (en la recolección) del ovocito es crucial para realizar una eficaz selección del mismo (Merton *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, se ha considerado que la morfología del cúmulo constituye el método más lógico para clasificar la competencia de los ovocitos, debido a que las células del cumulo componen un complejo metabólico con funciones muy importantes

para el ovocito (Sirard y Blondin, 1996). Las células del cúmulo (CCs) forman una asociación íntima con el ovocito. Éstas poseen proyecciones citoplasmáticas transzonales altamente especializadas que penetran a través de la zona pelúcida formando las uniones gap en sus puntos de unión con el ovocito (Gilchrist *et al.*, 2008). A esta estructura especial se le conoce como complejos cúmulo ovocito (COCs).

Es bien conocido que las CCs nutren al ovocito hasta las últimas fases de su desarrollo (Krisher, 2004). Estos complejos están involucrados en la formación de la zona pelúcida, crítica para el desarrollo de un ovocito capacitado para la ovulación (Krisher, 2004), y otras funciones importantes (Li *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2003). Por lo tanto, la comunicación entre el ovocito y las células de cúmulo que lo rodean es vital para el desarrollo de un ovocito competente (Krisher, 2004).

La eficiencia del método de recolección y la clasificación de los ovocitos constituyen un prerrequisito importante para la producción de embriones *in vitro*. Se han descrito varios métodos de recolección de ovocitos a partir de ovarios recogidos en matadero, tales como la aspiración del contenido folicular, la disección de folículos y el slicing (Gordon, 2003). Debe tenerse en cuenta que la técnica empleada para obtener ovocitos de calidad debería ser simple, rápida, económica, que permita la mayor recuperación de COCs posible, y sobre todo debería tener una repetibilidad aceptable.

Sin embargo, no se puede olvidar que la calidad de los ovocitos se adquiere de una forma progresiva durante el crecimiento folicular en el ovario. Por ello, muchos trabajos sugieren que tanto la cantidad como la calidad y el potencial de desarrollo de los ovocitos están influenciados por varios factores biológicos y/o físicos, algunos internos y otros externos. Algunos de estos factores son el diámetro del ovocito, el tamaño folicular (Krisher, 2004), el nivel de atresia (Leibfried y First, 1979), el día del ciclo estral (Machatkova *et al.*, 1996), el procedimiento de colección, la selección del ovocitos (Merton *et al.*, 2003), etc.

También algunos estudios aprecian diferencias en la producción de ovocitos según la raza o aptitud productiva del animal. Lamentablemente, el estudio de la posible conexión entre los factores externos y la cantidad/calidad de los ovocitos recuperados no siempre es sencillo cuando se trata de embriones bovinos producidos a partir de ovarios de matadero, en donde se desconocen los datos de las hembras donantes.

La edad de las hembras donantes de ovocitos también podría influir en la capacidad y en la eficiencia de la PIV de embriones. Por un lado, existe gran interés en la utilización de animales jóvenes como fuente de ovocitos ya que así se acorta el intervalo generacional y se acelera la velocidad del progreso genético. Pero también,

esta técnica tiene aplicaciones interesantes en los animales viejos, tanto en la conservación de recursos genéticos, como en reproducción asistida de hembras con valor genético, productivo o de especies en peligro de extinción (Armstrong, 2001).





*REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.- DESARROLLO DEL FOLÍCULO Y DEL OVOCITO

Los ovocitos formados durante la vida embrionaria son almacenados en el ovario, el cual tiene por función principal la de regular la utilización progresiva del stock de estas células, asegurando que el crecimiento de los folículos se produzca en forma cíclica a lo largo de toda la vida reproductiva de la hembra y procurando garantizar que su ruptura y la liberación del ovocito se lleve a cabo cuando la oportunidad de ser fecundado sea la mayor posible.

La mayor parte de las hembras de mamíferos nacen con una alta variabilidad en el número de folículos y de ovocitos en el ovario que disminuyen rápidamente al aumentar la edad y nunca son repuestos. La cantidad de folículos y ovocitos que nos podemos encontrar en una hembra bovina es altamente variable a través de todo el periodo de su vida reproductiva (Ireland *et al.*, 2011).

1.1 Desarrollo prenatal. Orígenes

El desarrollo de los folículos y los ovocitos en los mamíferos comienza durante la etapa fetal (Erickson, 1966a). La dotación completa de ovocitos presente en el animal adulto tiene su origen en un tipo especial de células denominadas células germinales primordiales (CGPs), que derivan de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo. Las CGPs se originan en concreto en el epitelio del saco vitelino y desde allí migran hasta las crestas gonadales del mesonefros. Este esbozo o crestas gonadales, a medida que el embrión se desarrolla, conformarán los futuros ovarios del animal (Byskov y Nielsen, 2003).

Una vez completada la diferenciación del ovario las CGPs se dividen por mitosis muy activamente, quedando conectadas por puentes intercelulares y reciben el nombre de ovogonias (Picton *et al.*, 1998). Éstas replican su ADN e inician la meiosis y

sus cromosomas atraviesan las etapas de leptotene, zigotene y paquitene hasta llegar a la etapa de diplotene de la profase de la primera división meiótica (profase I, metafase I, anafase I, telofase I). En este momento la meiosis se detiene y las ovogonias se transforman en ovocitos primarios (Hardisty, 1978; Tokarz, 1978). Durante esta etapa los ovocitos muestran una sensibilidad extrema, por lo que una gran parte de los mismos degenera (Van Den Hurk y Zhao, 2005).

El número de ovocitos así formados durante el desarrollo fetal o neonatal constituye el número máximo disponible de la hembra a lo largo de toda su vida reproductiva (Skinner, 2005). Desde que la hembra nace hasta que alcanza la pubertad todos sus ovocitos van a ser ovocitos primarios. En esta etapa hay crecimiento folicular independiente de gonadotropinas pero no hay cambio en el estadio de meiosis del ovocito.

El inicio de la meiosis coincide con el comienzo de la foliculogénesis. Cuando el ovocito está recién diferenciado se asocia con un grupo de células del estroma que pasan a denominarse células foliculares (Van den Hurk *et al.*, 1998) dando lugar a los folículos primordiales. Estas células somáticas precursoras de las células de la granulosa (CGs) son de origen mesotelial y/o mesonéfrico (Van den Hurk *et al.*, 1995) y ya disponen de la capacidad de secretar esteroides con capacidad de jugar un rol parácrino/autocrino importante en la formación y/o función de las cuerdas ovígeras, como también el desarrollo de la red ovárica vascular (Juengel *et al.*, 2002).

Los folículos inician el crecimiento como respuesta a estímulos intrínsecos de naturaleza desconocida (Eppig, 2001). La activación de los folículos primordiales se caracteriza por un cambio en la morfología de las células de la granulosa, se transforman de aplanadas a cúbicas y su estructura externa sufre una reorganización, de manera que se conectan con la superficie del ovocito a través de microvellosidades (Brower y Schultz, 1982). Estos cambios determinan la transformación de los folículos primordiales en primarios.

Las células de la granulosa comienzan a multiplicarse y el ovocito a crecer de forma sincrónica y proporcional. El intercambio de señales entre el ovocito y las células que lo rodean resulta esencial durante el crecimiento y la diferenciación de ambos. De modo que el ovocito es responsable del crecimiento folicular así como de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que éstas últimas resultan indispensables para el crecimiento, la diferenciación y maduración del ovocito (Matzuk *et al.*, 2002).

Hablaremos de folículo secundario o preantral cuando del ovocito está rodeado por dos o más capas de células de la granulosa (Driancourt, 1991). Durante esta etapa,

el ovocito acumula vitelo y otra serie de componentes en su citoplasma. Pero además, se forman también dos estructuras características del folículo: la teca interna y la zona pelúcida. Algunas células conjuntivas del estroma se organizan alrededor de la membrana basal del folículo comenzando a dibujar la teca interna. Además, diferentes proteínas secretadas por el ovocito se disponen entre éste y la capa más interna de células de la granulosa, formando la zona pelúcida (Driancourt *et al.*, 1991; Van den Hurk *et al.*, 1998). La zona pelúcida es una cubierta extracelular que rodeará a los ovocitos en crecimiento, a los ovocitos ovulados y a los embriones durante sus primeras etapas de desarrollo. Esta estructura proviene de la coalescencia de diversas sustancias secretadas por el ovocito y por las células foliculares que lo rodean (Dunbar *et al.*, 1994). La zona pelúcida tendrá funciones muy diferentes entre las que destacan, la fijación de los espermatozoides de manera específica de especie, el bloqueo de la polispermia, evitar la dispersión de los blastómeros surgidos durante la segmentación, facilitar el transporte a través del oviducto y proteger al embrión durante las primeras etapas del desarrollo (Epifano y Dean, 1994; Wassarman y Albertini, 1994).

A medida que avanza el desarrollo folicular comienzan a surgir pequeñas vesículas entre las células de la granulosa que más tarde confluyen entre sí formando una cavidad única denominada antro, coincidiendo con una activa multiplicación de las células de la teca. En este momento, el folículo pasa a recibir la denominación de folículo antral.

Los folículos antrales tienen una estructura histológica muy característica: la teca externa, la teca interna, la granulosa (separada de la teca por la membrana basal) y el antro folicular. En el interior encontramos un ovocito rodeado de varias capas de células que reciben la denominación de cúmulo. La capa más interna del cúmulo lleva el nombre de corona radiada.

Los folículos antrales son clasificados en diferentes categorías en función de su tamaño: pequeños, medianos, grandes y preovulatorios; los dos últimos reciben también la denominación de folículo de Graaf. Las primeras etapas del desarrollo folicular están sometidas a control intrínseco y, por lo tanto, son independientes de la regulación endocrina. No obstante, las etapas posteriores de la evolución folicular no dependen solamente del control intrínseco, sino que están principalmente reguladas por las gonadotropinas hipofisarias (Wassarman y Albertini, 1994).

Una vez que el ovocito completa su crecimiento, al finalizar la etapa de folículo primario, adquiere la capacidad de completar la primera división de la meiosis. No obstante, dicha capacidad y su posterior evolución hasta completar la maduración sólo se expresarán plenamente cuando se encuentra en el ambiente folicular (Jalabert *et*

al., 1991; Canipari, 2000). Por lo tanto el folículo constituye un elemento esencial para la maduración del ovocito.

Se conoce la existencia de una intensa comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa durante toda la foliculogénesis. La comunicación se establece a través de una serie de prolongaciones citoplásmicas de las células de la granulosa que, atravesando la zona pelúcida, establecen uniones gap heterólogas con la superficie del ovocito (Hyttel *et al.*, 1997), de tal forma que estos tipos celulares constituyen un sincitio electrofisiológico. En otras palabras, el ovocito madura a través de su capacidad de inducir la multiplicación de las células de la granulosa, su diferenciación y la regulación de su actividad (Rothchild, 2003).

Por su parte, el fluido folicular constituye el ambiente bioquímico que rodea al ovocito durante su crecimiento y diferenciación (Edwards, 1974; McNatty, 1978; Eppig *et al.*, 2000; Hunter, 2000). El fluido folicular tiene una gran variedad de funciones: bloqueo de la meiosis (Edwards, 1974; McNatty, 1978), protección frente a la proteólisis, extrusión durante la ovulación (Espey, 1994), estimulación de la motilidad y de la reacción acrosómica (Dell'Aquila *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), así como ejercer un efecto amortiguador frente a condiciones adversas (Gosden *et al.*, 1988; Nestler *et al.*, 2007). El antro folicular es un compartimento avascular, separado del estroma ovárico por la pared folicular que constituye la barrera "hemato-folicular" (Bagavandoss *et al.*, 1983).

El fluido folicular es un trasudado procedente del plasma, pero además, contiene diversos componentes específicos originados de la actividad secretora y metabólica de las células foliculares (Gerard *et al.*, 2002) y su composición varía de manera sustancial a lo largo de distintas etapas de crecimiento folicular. El fluido contiene una gran variedad de sustancias: electrolitos, proteínas, enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas proteicas y esteroides, sustratos energéticos y otros factores de naturaleza aún desconocida.

Hay que tener en cuenta que la mayor parte de los folículos formados están destinados a sufrir una degeneración espontánea, conocida como atresia folicular. Éste es un proceso apoptótico, controlado hormonalmente (Kaipia y Hsueh, 1997), que conduce a la disminución gradual de la reserva de ovocitos desde la vida fetal y que se prolonga hasta la senescencia sexual (Hirschfield, 1991). Es decir, la población de folículos presentes en el ovario tienen dos evoluciones posibles: muerte y degeneración a través de la atresia folicular o desarrollo completo hasta ovulación, la cual se realiza a partir de la pubertad.

1.2. Desarrollo postnatal. Etapa prepuberal y puberal

Las hembras están caracterizadas por una extrema variación en el número de las células germinales, que van desde cero (esterilidad) a miles de ellas (Erickson, 1966b). Esta enorme variación se mantiene a lo largo del desarrollo posterior del ovocito y a lo largo de la vida del animal (Erickson, 1966b; Ireland *et al.*, 2008).

Erickson (1966b) describió en la especie bovina, que los folículos primordiales permanecen estables (133 000 folículos de promedio) hasta el cuarto año de vida y que gradualmente disminuían hasta cero a los 15-20 años de edad. Por su parte, los folículos antrales alcanzan un número máximo a los 6 meses de edad (promedio de 63 folículos), disminuyendo cerca de la pubertad, manteniéndose constantes hasta 10-14 años de edad y a partir de ese momento disminuyen progresivamente.

II.- ULTRAESTRUCTURA, MADURACIÓN Y REGULACIÓN DEL OVOCITO

2.1. Ultraestructura

El ovocito experimenta notables cambios ultraestructurales durante su fase de crecimiento. Esta fase de crecimiento incluye una serie de cambios de organelas e inclusiones, así como un periodo de transcripción del ovocito, que son necesarios para que esta célula logre la capacidad de reanudar la meiosis y el correspondiente desarrollo. Durante esta fase el diámetro interior del gameto aumenta desde las 30 μm en el folículo primordial a más de 120 μm en el folículo terciario (Hyttel *et al.*, 1997; Otoi *et al.*, 1997).

Por su parte, en el citoplasma del ovocito un número de organelas e inclusiones como el complejo de golgi, retículo endoplásmico liso (SER), gotas de lípidos y delimitadas vesículas de membrana, se están desarrollando gradualmente y sometiéndose a una dislocación periférica. Aparecen ciertas estructuras específicas de los ovocitos en el folículo secundario como gránulos corticales y de la zona pelúcida. También, hacia el final del crecimiento ovocitario aparece la cresta mitocondrial (Hyttel *et al.*, 1997). De esta manera, es obvio pensar que el diámetro del ovocito va aumentando en relación al incremento del número y tamaño de las organelas y las inclusiones de su citoplasma.

La capacidad meiótica y de desarrollo del ovocito sólo será posible después de un periodo de transcripción para la síntesis de proteínas, para que puedan ser utilizadas dentro del ovocito o para exportarlas fuera de la célula (Fair *et al.*, 1996; Hyttel *et al.*,

1997). El nucléolo constituye el lugar de transcripción del ARNr y consecuentemente la síntesis de subunidades ribosomales. La transcripción del ovocito incluyendo la función nucleolar (síntesis de ARNr) es activada en el folículo secundario y es mantenida hasta que el ovocito alcance alrededor de 110 μm de diámetro en un folículo terciario de 3 mm. En un diámetro de 100 a 110 μm el ovocito, gradualmente, logra la capacidad de llevar a cabo la maduración meiótica y mantener el desarrollo embrionario.

En el folículo dominante el ovocito experimenta más modificaciones estructurales y realiza una total capacidad de desarrollo mediante un proceso llamado "capacitación". La maduración final del ovocito hasta metafase II después de la estimulación por la LH al folículo ovulatorio es el final del proceso previo y equipa al ovocito con un comportamiento cromosomal haploide y al aparato celular biológico especializado para la fecundación y el desarrollo temprano del embrión (Hyttel *et al.*, 1997).

Los ovocitos adquieren las capacidades de desarrollo en forma secuencial durante el crecimiento folicular (Telford *et al.*, 1990). Así, a lo largo del desarrollo del ovocito, las células foliculares proporcionan el apoyo fundamental para proveerle de nutrientes y factores de crecimiento que aseguran su progresión a través de la prolongada fase de crecimiento. En compensación, los ovocitos promueven activamente el desarrollo y diferenciación de las células foliculares (Picton *et al.*, 1998).

En el folículo primordial y primario la comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa están aparentemente mediadas mediante vías endocitóticas como lo señalado por abundantes fosas y vesículas revestidas que presenta el ovocito (Fair *et al.*, 1997). Esta mutua cooperación, permite al ovocito alcanzar la capacidad meiótica (habilidad de llevar a cabo una maduración meiótica completa) en los inicios del estado antral del folículo en crecimiento (Telford *et al.*, 1990). Finalmente, el reinicio de la meiosis en ovocitos maduros produce gametos haploides capaces de apoyar el desarrollo embrionario temprano (Picton *et al.*, 1998).

En el ciclo ovárico normal de hembras post púberes, la competencia total del ovocito es adquirida durante la fase final de crecimiento del folículo preovulatorio bajo la influencia de una onda de hormonas gonadotrópicas hipofisarias (FSH y LH), provocadas por las señales de retroalimentación positiva del folículo maduro que actúa sobre el eje hipotálamo-hipófisis. Además de provocar la reanudación y finalización de la meiosis, la onda induce el aumento de las etapas finales de maduración citoplásmica de ovocitos (capacitación) necesarias para el pleno desarrollo del huevo ovulado, completamente maduro (Armstrong, 2001).

2.2. Maduración y regulación del ovocito: nuclear, citoplasmática y molecular

La maduración del ovocito está comprendida entre el primer y el segundo bloqueo meiótico (Albarracín, 2005). Cuando nace una hembra sus ovocitos están bloqueados en la fase G2 de la profase de la primera división meiótica (Wassarman y Albertini, 1994), mientras que para que sea fecundada tiene que reiniciar y completar la meiosis. Entonces, la maduración se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular y ovocitario, y se encuentra asociada a una serie de cambios nucleares, citoplasmáticos (Pavlok *et al.*, 1992; Eppig, 1996) y moleculares (Sirard *et al.*, 2006) que permiten al ovocito ser ovulado y fecundado. Cuando esto sucede, la fecundación induce la reactivación del ovocito que provocará la salida del segundo bloqueo meiótico (Albarracín, 2005; Sirard *et al.*, 2006).

En la vaca se ha observado que la capacidad meiótica está relacionada con el tamaño folicular (Lonergan *et al.*, 1994; Fair *et al.*, 1995). El tamaño medio de los folículos que contienen un ovocito con capacidad para experimentar la maduración nuclear oscila entre 2 y 3 mm, mientras que los que contienen ovocitos que han completado la maduración citoplásmica se sitúa alrededor de los 6 mm. Aunque también se ha comprobado que ambas capacidades (nuclear y citoplásmica) se van incrementando en la medida que lo hace el diámetro folicular (Leibfried y First, 1979). Por el contrario, aquellos folículos inferiores a 2 mm o los ovocitos corticales no adquieren totalmente la capacidad meiótica. De hecho algunos ovocitos son capaces de realizar una meiosis parcial llegando hasta metafase I, pero pocos son capaces de llegar a metafase II y, menos aún, de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto (Arlotto *et al.*, 1996).

Por lo tanto, la maduración del ovocito comporta los siguientes acontecimientos clave: la maduración nuclear (reactivación de la meiosis hasta alcanzar la metafase II), la maduración citoplásmica (adquisición de la capacidad de ser fecundado y desarrollarse hasta blastocisto), y la maduración molecular (Sirard *et al.*, 2006). A continuación veamos cada uno de ellos.

Los principales cambios nucleares incluyen la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) (Edwards, 1965; Richard y Sirard, 1996a), condensación cromosómica y progresión a metafase I (MI), extrusión del primer corpúsculo polar y bloqueo en la metafase de la segunda división meiótica (MII).

Debe tenerse en cuenta que *in vivo* el reinicio de la meiosis está provocado por el pico preovulatorio de LH. Sin embargo, *in vitro* el reinicio de la meiosis y la maduración tienen lugar de manera espontánea después de retirar físicamente al ovocito del folículo (Moor, 1988; Fulka *et al.*, 1998).

La observación del primer corpúsculo polar constituye la señal de maduración nuclear del ovocito o reinicio de la meiosis. Ésta puede ser visualizada mediante microscopio por la extrusión del primer corpúsculo polar o con colorantes específicos para teñir la metafase. Se cree que el reinicio de la meiosis es consecuencia de la ausencia de algún inhibidor folicular (Richard y Sirard, 1996b).

En vacuno, los ovocitos adquieren la capacidad de llegar a metafase cuando alcanzan su tamaño máximo en el folículo en crecimiento y justo antes de la formación del antro (Fair *et al.*, 1995). En algunas especies, la capacidad de llegar a MI se adquiere antes de la capacidad de llegar a metafase II (Hampl y Eppig, 1995), pero en la vaca, las dos parecen adquirirse al mismo tiempo, sin embargo, la escasez del activador del ciclo celular puede provocar su detención en metafase I (Sirard *et al.*, 1998), lo que sugiere que las dos capacidades requieren moléculas distintas.

La maduración citoplásmica del ovocito se caracteriza por una serie de cambios funcionales que juegan un papel importante en la fecundación y los estadios siguientes de desarrollo embrionario preimplantacional (Albertini *et al.*, 2003), entre los que podemos destacar los siguientes:

- remodelación de la cromatina y del citoesqueleto del ovocito en estados críticos de la foliculogénesis cuando los gametos y las células somáticas se comunican por mecanismos paracrinos y de unión (Albertini *et al.*, 2003).
- acumulo de reservas lipídicas constituidas por triglicéridos y fosfolípidos. Los primeros actúan como reserva de energía para la maduración del ovocito y su respectiva fecundación (Ferguson y Leese, 1999), y durante el desarrollo embrionario antes de la implantación (Ferguson y Leese, 2006). Por su parte, los fosfolípidos son componentes de las membranas celulares, por lo que su demanda se incrementa durante los sucesivos ciclos celulares que sufren los blastómeros a lo largo de la segmentación (Pratt y George, 1989).
- adquisición de la capacidad de desarrollar una reacción cortical efectiva inmediatamente después de la fecundación (McEvoy, 1999).
- adquisición de la capacidad para liberar Ca^{++} , señal intracelular empleada tras la fusión con el espermatozoide para estimular el final de la meiosis y el inicio de la embriogénesis (Carroll *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 2000).
- acumulación de diferentes componentes necesarios para el desarrollo embrionario, fundamentalmente ARNm y proteínas (Picton *et al.*, 1998). Estas sustancias son indispensables para dirigir la maduración del ovocito, la

fecundación y el desarrollo embrionario temprano, siendo necesarias, incluso, hasta la etapa de blastocisto (De Sousa *et al.*, 1998).

Durante la maduración citoplasmática existe una reorganización de las organelas (Hyttel *et al.*, 1986), comienza la síntesis de proteínas específicas (Sirard y Blondin, 1996; Wu *et al.*, 1996) y se produce un incremento de la actividad de las quinasas, iniciándose complejas cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas que involucran a numerosas quinasas. Se cree que estas cascadas de fosforilación activan moléculas reguladoras nucleares y ovoplasmáticas. Todos estos aspectos determinan que la maduración citoplasmática del ovocito no pueda ser observada por técnicas sencillas, pero que pueda ser indirectamente evaluada valorando la capacidad del ovocito para ser fecundado y desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto (Albarracín, 2005).

La maduración molecular se considera un tercer tipo de maduración ovocitaria caracterizada por un proceso de acumulación de moléculas específicas, en su mayoría no identificadas, que capacitan al ovocito para eventos post-fecundación. De la mayoría de ovocitos que llevan a cabo una normal maduración nuclear y citoplásmica tan sólo un subconjunto de ellos se desarrollará hasta la fase de blastocisto. La diferencia entre la capacidad de desarrollo del ovocito capacitado de otro no capacitado está relacionada con la fase de diferenciación del folículo original y estas diferencias no son siempre visibles en el ovocito a nivel ultraestructural. En la actualidad, la hipótesis más aceptada es que los ARNm específicos y posiblemente algunas proteínas son producidos y añadidos a las reservas del ovocito en los últimos días antes de la ovulación, por lo que, estos únicos “capacitadores” otorgarían al ovario la última palabra en los resultados de la ovulación alterando la capacidad de desarrollo del gameto producido (Sirard *et al.*, 2006).

Instrucciones especiales que provienen del medio folicular y que son acumuladas en el ovocito, son esenciales para promover una apropiada cascada molecular para la activación genómica embrionaria y de desarrollo hacia la fase de blastocisto. En vista de que no ha sido identificada ninguna discrepancia clara asociada a los primeros dos tipos de maduración ovocitaria para responsabilizar las capacidades de desarrollo, se cree que la maduración molecular representa la asociación más cercana con la capacidad intrínseca de un ovocito para alcanzar el estado de blastocisto y probablemente influya en su desarrollo posterior (Sirard *et al.*, 2006).

A modo de resumen, podemos mencionar que desde que nace la hembra tiene sus ovarios funcionales. El crecimiento folicular surge en la etapa postnatal a las 2-3 semanas de edad, es decir existe foliculogénesis pero los folículos crecen hasta un determinado momento y llegando este punto (8 mm) dejan de crecer, se atresian, y

otros folículos empiezan a crecer. Durante la etapa prepuberal el crecimiento folicular no es completo y la cantidad de estrógenos es baja. En esta etapa, el centro tónico hipotalámico es muy sensible a los pocos estrógenos gonadales que actúan sobre él mediante retroalimentación negativa generando una escasa producción de GnRH y por lo tanto de LH.

III. LA PUBERTAD

La pubertad es un evento de singular importancia en la vida reproductiva de una hembra bovina. Viene a ser el periodo reproductivo caracterizado como la culminación de una serie de eventos cuyo resultado es la primera ovulación acompañada de signos de celo y una función lútea normal (Moran *et al.*, 1989). Por lo tanto, tiene importantes implicaciones zootécnicas y económicas, debido a que define el periodo productivo del animal con consecuencias inmediatas en la eficiencia reproductiva de la granja.

3.1. Etapa prepuberal - puberal

La pubertad es el resultado de la interacción dinámica entre factores genéticos y estímulos medioambientales, que conducen a alcanzar la capacidad reproductiva. Así, se producen cambios bastante complejos en la secreción hormonal desde la etapa prepuberal a la etapa puberal, muchos de estos, aún desconocidos (Meza-Herrera *et al.*, 2009). Antes de la pubertad la secreción de GnRH es baja y a medida que se aproxima esta etapa, la amplitud de los pulsos se incrementa. Por lo tanto, las concentraciones de hormonas gonadotrópicas, FSH y LH, se incrementan gradualmente durante la pubertad, estimulando el crecimiento y la maduración de los folículos, así como la producción de estrógenos por los ovarios (Huffman *et al.*, 1987; Apter, 1997; Terasawa, 2005).

En vacunos y ovinos, la pubertad está frecuentemente precedida por varios ciclos estrales de corta duración que pueden, o no, estar acompañados de ovulación y celo del animal (Kinder *et al.*, 1987; Foster y Jackson, 1994). Esto suele dar lugar a periodos de elevación de la progesterona de duración variable (Berardinelli *et al.*, 1979; Berardinelli *et al.*, 1980), a eso se le denomina etapa prepuberal y suele estar asociada con irregularidades de la conducta sexual (García y Limia, 1998).

Para considerar la etapa puberal es necesario que se produzca la regresión de la estructura lútea inicial, y con ello la disminución de la progesterona, lo que provoca en una serie de cambios hormonales indicadores de la fase folicular. Esta fase va precedida de un aumento de LH y estradiol, y culmina en un segundo aumento más

alto de LH (Day y Anderson, 1998) denominado pico de LH. Desde un punto de vista endócrino, la plena capacidad funcional del eje hipotálamo – hipófisis – ovarios se alcanza en el momento que el animal alcanza el pico LH (Day y Anderson, 1998). Aunque este periodo implique que pueda tener una gestación no coincide con que la hembra esté adecuadamente preparada para la reproducción, ya que podría verse afectado el crecimiento corporal del animal (Faure y Morales, 2003).

La edad a la primera cubrición y la edad a la concepción constituyen los principales determinantes de la productividad de la hembra. Por lo que, la edad a la pubertad es el factor más importante que condiciona el primer periodo reproductivo de la hembra (Day y Anderson, 1998). Si bien es cierto que, económicamente interesa que la hembra sea capaz de soportar el mayor número de gestaciones, también lo es que exista un equilibrio entre las necesidades de crecimiento y las necesidades de su propio feto en desarrollo, de tal manera que, el organismo tendría que decidir a dónde irían los nutrientes que ingiere, inclinándose su preferencia por cubrir las necesidades del feto.

3.2. Mecanismos de regulación

El tránsito de la fase prepuberal a la puberal incluye cambios significativos en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) (Meza-Herrera *et al.*, 2009) determinado por señales que provienen del estado metabólico del animal (García y Limia, 1998). Para que este eje logre funcionar como un sistema, necesita que cada uno de sus componentes alcance la capacidad de funcionar antes de la pubertad. Esto indica que, el hipotálamo mediante la liberación apropiada de GnRH estimule a la hipófisis la síntesis y secreción adecuada de gonadotropinas, LH y FSH, en forma de ondas pulsátiles o preovulatorias, capaces de estimular a los ovarios quienes secretarán estradiol en niveles suficientes como para inducir la liberación de picos de LH y, de esta forma, provocar la ovulación (Day y Anderson, 1998).

El retraso en la aparición de la pubertad suele ocurrir por factores como la subnutrición (Schillo *et al.*, 1992), fotoperiodo inhibitorio (Foster *et al.*, 1985) o condiciones metabólicas adversas, los cuales restringen el efecto de retroalimentación negativa del estradiol y consecuentemente disminuyen la secreción de niveles de LH. Por lo que, una pubertad retardada en el tiempo puede deberse a cualquier demora en el aumento de la secreción de LH (Foster *et al.*, 1985; Schillo *et al.*, 1992).

En rumiantes existe un incremento en la actividad gonadotrópica en la etapa temprana, posterior al nacimiento, la cual genera un incremento en el desarrollo de folículos antrales en el ovario. Parece que existen dos periodos distintos de mayor desarrollo en los órganos reproductivos, desde la semana 2 a la 14 y nuevamente de la 34 a la 60 semana de edad o justo antes de la pubertad (Rawlings *et al.*, 2003). La

primera ovulación en novillas está precedida de un incremento gradual de la secreción pulsátil LH, que provoca un mayor desarrollo del folículo antral y producción de estradiol.

Una hembra prepúber se distingue a nivel reproductivo de una hembra adulta, entre otras cosas, en el momento que tiene lugar un crecimiento folicular completo. En las novillas el sistema endócrino reproductivo es capaz de funcionar a los 6 a 7 meses de edad pero existe una amplia variabilidad. Así, algunos estudios mostraron que las novillas mostraban ciclos repetidos de fase lútea entre los 6,5 a los 9 meses y luego regresaban a anestro (Wehrman *et al.*, 1996). Al parecer en estas novillas el eje endócrino reproductivo fue capaz de superar la inhibición del estradiol, lo cual condujo a la aparición de ciclos estrales precoces. Lo que sí queda claro es que, la maduración del sistema endócrino puede estar completa a los 6–7 m de edad pero su función está restringida por la retroalimentación negativa del estradiol hasta los 11 a 14 m, momento a partir del cual se anula la inhibición y empiezan los ciclos estrales (Day y Anderson, 1998).

IV. MADUREZ SEXUAL

En términos generales, la vaca es poliéstrica continúa con ciclos que duran de 18 a 24 días. El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (GnRH), la hipófisis anterior (FSH, LH), los ovarios (progesterona, estradiol, inhibinas) y el útero (prostaglandinas $F_{2\alpha}$, PGF). Estas hormonas y otros factores estimuladores e inhibidores intrafoliculares (Roche, 1996) interactúan mediante distintos mecanismos para gobernar el ciclo estral bovino, la foliculogénesis y la rotación de folículos dominantes.

Cada ciclo estral está constituido por dos fases: una fase lútea, con una duración de 14 a 18 días y una fase folicular de 4 a 6 días. La fase lútea es el periodo que sigue a la ovulación cuando el cuerpo lúteo está formado (frecuentemente repartido en dos periodos denominados como metaestro y diestro). Por su parte, la fase folicular abarca el periodo desde la desaparición del cuerpo lúteo (luteólisis) hasta que se produce la ovulación (frecuentemente separados en periodos denominados como proestro y estro), durante esta fase sucede la maduración y la ovulación del folículo dominante ovulatorio (Forde *et al.*, 2011).

4.1. Regulación endócrina y fases del ciclo estral

La GnRH regula la acción de las gonadotropinas LH y FSH, necesarias para la función reproductiva, (Weck *et al.*, 1998). La GnRH es un decapeptido cuyo control

sobre el ciclo estral está mediado a través de su acción sobre la hipófisis anterior (Conn, 1994). Su liberación se produce en pulsos intermitentes con frecuencias y amplitudes variadas según el estado fisiológico del animal. Después del transporte de la GnRH desde el hipotálamo hacia la hipófisis, a través del sistema sanguíneo porta hipofisiario (Moenter *et al.*, 1992), la GnRH se liga a su receptor proteico acoplado a la proteína-G en la superficie de las células gonadotropas (Kakar, 1997). Esta unión libera calcio intracelular, lo que provoca la activación de la fosfolipasa C, dando lugar a aumentos de la proteína quinasa C (PKC) y a la proteína quinasa mitógena activada (MAPK). De esta forma el proceso culmina con la liberación de la FSH y la LH desde los compartimentos de almacén del citoplasma (Weck *et al.*, 1998). Durante el ciclo estral la FSH sólo es almacenada en los gránulos secretores del citoplasma por periodos cortos, mientras que la LH lo hace por periodos largos (Farnworth, 1995).

Durante la fase folicular existe un ambiente basal de progesterona debido a la regresión del cuerpo lúteo (CL). El aumento de concentraciones de estradiol, provenientes de la rápida proliferación del folículo dominante (FD) preovulatorio, concomitante con la disminución de las concentraciones de progesterona, provoca picos de GnRH que inducen al animal a manifestar el comportamiento de celo (Frandsen *et al.*, 2003). El pico preovulatorio de GnRH estimula una secreción coincidente de LH y FSH (Sunderland *et al.*, 1994). Sólo cuando la concentración de progesterona sérica sea basal y los pulsos de LH ocurran cada 40–70 min durante 2-3 días se producirá la ovulación del FD (Roche, 1996). La mayoría de estudios muestran que la ovulación ocurre a las 25 y 33 h después del inicio del celo y entre las 22 a 27 h después del pico de LH. Sin embargo, otros autores han demostrado un retraso en la ovulación de 38,5 h después del inicio del celo y de 29,4 h del pico de LH (Saumande y Humblot, 2005).

La parte inicial de la fase lútea es conocida como metaestro y dura de 3-4 días. Esta fase se caracteriza por la formación del cuerpo lúteo (CL) a partir del cuerpo hemorrágico. Después de la ovulación, la concentración de progesterona empieza a incrementarse debido a la formación del CL mediante un proceso llamado luteinización, en el cual las células de granulosa y de la teca interna del folículo ovulado y luteinizado producen progesterona (Auletta y Flint, 1988; Niswender *et al.*, 2000). Esta hormona es importante para establecer y mantener la gestación, regular la longitud del ciclo estral, o controlar el momento de ovulación (Smith *et al.*, 1994; Quintal-Franco *et al.*, 1999; Forde *et al.*, 2011).

La luteinización involucra la transición de un folículo preovulatorio hacia un cuerpo lúteo altamente vascular capaz de secretar grandes cantidades de progesterona (Smith *et al.*, 1994). Las células de la granulosa se diferencian hacia células luteales grandes mientras que las células de la teca a células luteales pequeñas (O'Shea *et al.*, 1986).

Durante el ciclo estral bovino las células luteales pequeñas incrementan en número pero no en tamaño, mientras que las células luteales grandes sucede lo contrario, esto es, incrementan en tamaño y no en número (O'Shea *et al.*, 1989), por lo que la mayor tasa de progesterona proviene de las células grandes (Alila *et al.*, 1988). Por otro lado, las células luteales pequeñas estimulan la angiogénesis (Grazul-Bilska *et al.*, 1991), mientras que las grandes responden mejor a la acción luteolítica de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Wiltbank *et al.*, 1990).

Un componente esencial para el desarrollo del CL constituye la captación de suministro sanguíneo mediante un nuevo lecho microcirculatorio que implica la ruptura de la membrana basal folicular, migración de las células endoteliales, proliferación de las mismas y desarrollo de la luz capilar. Este proceso está regulado por la interacción de sustancias angiogénicas y antiangiogénicas, como el factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF A) y el factor básico de crecimiento fibroblástico (FGF-2) (Smith *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 2000; Schams y Berisha, 2004).

Durante la fase de diestro, la concentración de progesterona permanece elevada mientras que ondas sucesivas de desarrollo folicular continúan gracias a la liberación de FSH desde la hipófisis anterior. Sin embargo, estos folículos dominantes que crecen durante la fase lútea del ciclo estral no ovulan. La progesterona que domina la fase lútea del ciclo estral, mediante retroalimentación negativa, sólo permite la secreción de los pulsos LH de mayor amplitud pero de menor frecuencia, los cuales son inadecuados para la ovulación del folículo dominante (Rahe *et al.*, 1980; Walters *et al.*, 1984).

Al finalizar el periodo de diestro ocurre la luteólisis. La concentración de progesterona disminuye debido a la regresión o lisis del CL en respuesta a la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Peterson *et al.*, 1975) desde las células endometriales uterinas (Milvae *et al.*, 1996).

La luteólisis consiste en la inhibición de la esteroidogénesis y la inducción de la apoptosis, mediante el desencadenamiento de cascadas de señalización como el influjo de calcio y activación de endonucleasas (Niswender *et al.*, 2000), para lo cual se involucran hormonas como la prolactina; citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral alpha ($\text{TNF}\alpha$), el Interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) y el Fas ligando (FasL); especies reactivas de oxígeno (ROS), endotelina-1(E1) y la proteína 70 (HSP70) de choque térmico (Olivera A *et al.*, 2009)

4.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral

Un pilar fundamental para entender la dinámica folicular es el hecho de que el par de ovarios actúan como una sola unidad ya que la influencia del desarrollo folicular vía sistémica endocrina involucra a todas las partes del ovario y el útero, las gonadotropinas y sus receptores. En la actualidad es ampliamente aceptado que durante el ciclo estral existen, normalmente, dos o tres oleadas de crecimiento folicular, con formación de folículos dominantes y subordinados que pasan a través de las diferentes fases de crecimiento, estática y de regresión, cada una de las cuales tienen características morfológicas y bioquímicas distintas (Adams *et al.*, 2008).

El crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas se produce en forma de dos a cuatro ondas por ciclo estral, siendo las más comunes las de dos a tres ondas (Savio *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1988) (Fig. 1). Cada oleada de crecimiento involucra el reclutamiento o emergencia de un grupo de folículos, la selección del folículo dominante y la dominancia del mismo, seguido de la atresia de los folículos o de la ovulación del folículo dominante (Fortune, 1994; Forde *et al.*, 2011). El folículo dominante recién ovulado coincide con la fase folicular del ciclo estral durante la cual sucede la maduración final del ovocito. Estas ondas de crecimiento folicular son inicialmente establecidas durante el periodo temprano pre puberal y suceden a través de todo el ciclo de vida (Forde *et al.*, 2011).

Aunque todavía no se ha encontrado una influencia genética ni de la edad sobre el número de oleadas, se considera que la mayor parte de las vacas lecheras lactantes tienden a presentar dos ondas foliculares por ciclo (Taylor y Rajamahendran, 1991; Townson *et al.*, 2002), al igual que las novillas de aptitud cárnica. Sin embargo, las novillas de aptitud láctea suelen presentar con mayor frecuencia tres oleadas de crecimiento folicular por ciclo estral (Savio *et al.*, 1988; Ginther *et al.*, 1989). Una repercusión a tener en cuenta es que las hembras con dos oleadas foliculares por ciclo suelen tener ciclos más cortos y ovulan folículos más grandes. Además ciertos autores apuntan que estas hembras presentan una mayor probabilidad de envejecimiento de los ovocitos, lo que podría afectar a su fertilidad (Townson *et al.*, 2002).

La etapa de reclutamiento o emergencia de la oleada tiene una duración de 2 a 3 días y se caracteriza por el crecimiento simultáneo de un promedio de 24 (8-41) folículos sensibles a las gonadotropinas, cuyo diámetro inicial es de 4-6 mm (Ginther *et al.*, 1996; Evans, 2003). Cuando una cohorte de folículos son detectados por ecografía se constituye como el primer día de la onda folicular, la cual se produce en los días 2 y 11 del ciclo estral en animales con dos ondas, y en los días 2, 9 y 16 para aquellos con tres ondas (Sirois y Fortune, 1988). Toda emergencia folicular siempre se encuentra precedida de incrementos temporales de FSH (Adams *et al.*, 1992; Sunderland *et al.*,

1994), hormona imprescindible para su crecimiento (Ginther *et al.*, 2002) que le permite ejercer funciones de promoción del crecimiento celular y de proliferación folicular (Robker y Richards, 1998; Howles, 2000).

Ambas hormonas FSH y LH resultan sumamente necesarias para la maduración del folículo ovárico y la producción de esteroides, y en consecuencia la fecundación del ovocito (Howles, 2000). En esta etapa de reclutamiento el efecto principal del aumento de FSH es promover el crecimiento folicular mediante el incremento de la expresión de la enzima citocromo aromataasa en las células de la granulosa, permitiendo la conversión de andrógenos a estrógenos (Ferreira *et al.*, 2002), mientras que la LH promueve la producción de andrógenos desde colesterol y pregnenolona por estimulación de la actividad de la 17 α -hidroxilasa de las células de la teca. Estos andrógenos se esparcen hacia la granulosa donde son convertidos a estrógenos mediante la actividad de la enzima aromataasa (Erickson *et al.*, 1985), provocando así que los folículos secreten estradiol, cuya provisión siempre es importante para una exitosa fecundación y la implantación dentro del tracto reproductivo de la hembra (Howles, 2000),

Existen una serie de compuestos locales que pueden modular el reclutamiento. Entre ellos podemos mencionar: (1) el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), estimulado por la somatotropina (ST). Este factor está involucrado en el inicio del crecimiento folicular aumentando el número de folículos reclutados por onda, así mismo promueve la esteroidogénesis y el crecimiento de células ováricas (Lucy, 2000); (2) La folistatina que limita el reclutamiento, (3) el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que promueve la proliferación de la granulosa (Driancourt, 1991); (4) el factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9), esencial para el desarrollo folicular desde el estadio primordial a primario, no descartándose otras funciones posteriores, (5) la familia del factor transformante del crecimiento (TGF) con su rol inhibitorio en el desarrollo y progreso de los folículos (McGee y Hsueh, 2000; Knight y Glistler, 2006; Rosairo *et al.*, 2008).

La desviación folicular constituye un evento importante en la selección del folículo dominante (FD), mediante el cual el folículo más grande establece su supremacía antes de que el folículo que le sigue en tamaño –subordinado- pueda alcanzar diámetros y competencias similares (FD \geq 8 mm). Normalmente, existe una dependencia de estos folículos a la FSH. Sin embargo, cuando la FSH empieza a descender desde su pico (hasta la emergencia de una nueva oleada), solo el FD es capaz de utilizar bajas concentraciones de FSH. Esta capacidad es adquirida porque la desviación viene acompañada de un aumento temporal de LH, lo que estimula la producción de estradiol e IGF-I, responsables de la respuesta positiva del FD a las bajas cantidades de

FSH. Mientras tanto, los folículos subordinados no han alcanzado esta capacidad, estableciéndose así la desviación folicular (Ginther *et al.*, 2001).

Por consiguiente, los folículos subordinados dejan de crecer (Ginther *et al.*, 1996). Además, se ha comprobado que el fluido folicular del folículo dominante tiene ciertos compuestos capaces de inhibir el crecimiento de folículos vecinos actuando directamente sobre su actividad aromatasas. Entre los candidatos a dicho efecto se incluye a la inhibina (Knight y Glistler, 2006).

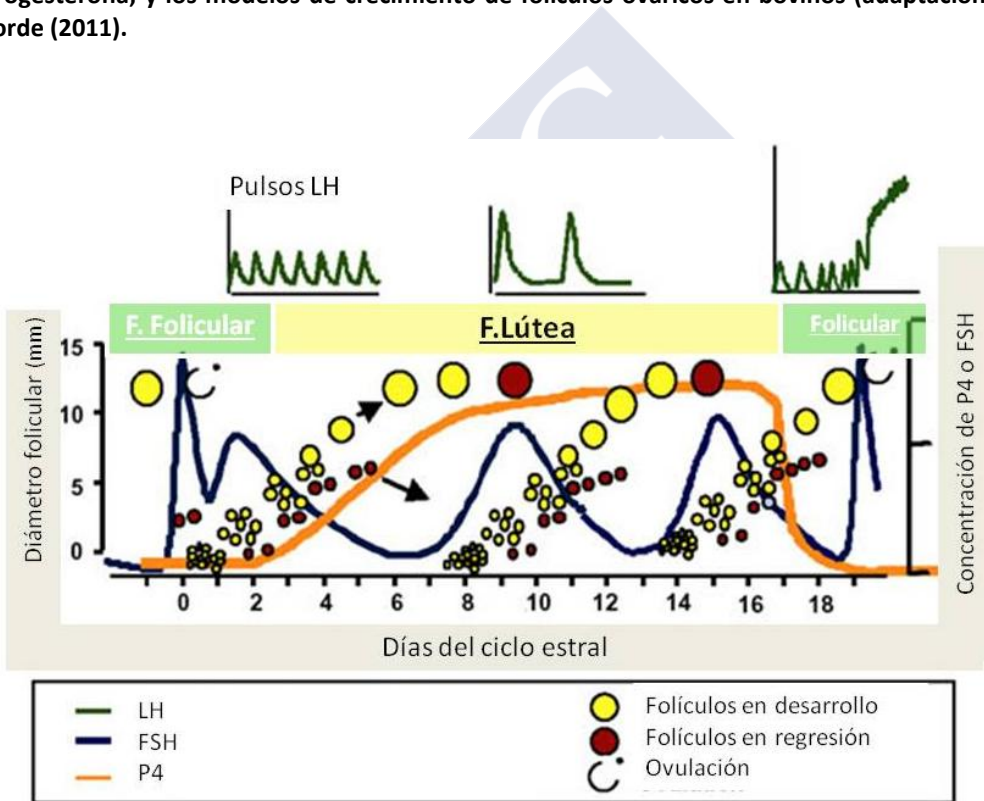
El folículo dominante seleccionado crece en respuesta al incremento de receptores LH en la granulosa, y de cara a la disminución de la FSH (Ginther *et al.*, 2000). Independientemente del estado del ciclo estral, durante el cual se desarrollan los folículos, el cambio de la dependencia en las células de la granulosa de FSH a la LH mediante la presencia de receptores LH (LH-R) constituye una base importante para el establecimiento de la dominancia folicular (Xu *et al.*, 1995). Cuando el folículo crece, los LH-R de la teca aumentan y son adquiridos por la granulosa de aquel folículo que se selecciona y llega a ser folículo dominante (Xu *et al.*, 1995; Ginther *et al.*, 2001), por lo que la granulosa de estos folículos poseen mayor número de receptores de LH que los que le siguen (Evans y Fortune, 1997). Por lo tanto, el folículo dominante continúa su crecimiento y la producción de estradiol a pesar de un ambiente basal de FSH hasta adquirir la capacidad ovulatoria con un diámetro a partir de los 10 mm (Sartori *et al.*, 2001).

La dominancia folicular constituye la etapa final de la dinámica folicular. Esta etapa está caracterizada por un continuo crecimiento del folículo dominante, altas concentraciones de estradiol en el fluido folicular, altos niveles de ARNm de los receptores gonadotrópicos y enzimas esteroideogénicas, la atresia de los folículos subordinados y la completa inhibición del reclutamiento de nuevos folículos (Fortune *et al.*, 2001). Según numerosas evidencias, la LH es la hormona clave para el crecimiento final del folículo dominante (Gong *et al.*, 1996; Fortune *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2003; Forde *et al.*, 2011). Algunos factores locales que refuerzan esta dominancia folicular son los factores de crecimiento tipo insulina (IGFs), y los factores de crecimiento endotelio vascular (VEGF). El primero tiene como función principal actuar en forma sinérgica con las gonadotropinas para promover el crecimiento y la diferenciación de los folículos (Giudice, 1992; Adashi, 1998; Fortune *et al.*, 2001), y los VEGF promueven la angiogénesis y por tanto el aumento de riego sanguíneo del folículo dominante, maximizando la acción de las gonadotropinas (Driancourt, 2001).

El destino final del folículo dominante será la atresia o la ovulación, dependiendo de la funcionalidad del cuerpo lúteo y de los niveles de LH (Lucy, 2007). Un folículo dominante que no está expuesto a niveles de LH sólo sobrevivirá por un corto periodo

antes de convertirse en atrésico (Valdez *et al.*, 2005). Mientras que la presencia de LH convierte a las células del folículo dominante en células quiescentes resistentes a la apoptosis (Quirk *et al.*, 2004). De otro lado, el folículo dominante únicamente completará su desarrollo y ovulará cuando coincida con la regresión del cuerpo lúteo, situación que determina un descenso de los niveles de progesterona, altos niveles de estradiol, y un incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. Esto permite procesos complejos de ovulación y luteinización (Sunderland *et al.*, 1994; Lucy, 2007; Forde *et al.*, 2011).

Figura 1. Descripción esquemática de las fases del ciclo estral, eventos hormonales LH, FSH y progesterona; y los modelos de crecimiento de folículos ováricos en bovinos (adaptación de Forde (2011).



V. PRINCIPALES INDICADORES DE CALIDAD DE UN OVOCITO

La calidad del ovocito afecta al éxito del desarrollo temprano del embrión, al establecimiento y mantenimiento de la preñez, al desarrollo fetal y puede llegar a condicionar las enfermedades del individuo adulto (Merton *et al.*, 2003). La calidad intrínseca de los ovocitos viene a ser el factor clave que determina su desarrollo hacia blastocisto (Sirard y Blondin, 1996; Rizos *et al.*, 2002). Como ya mencionamos en capítulos anteriores, la calidad, o la capacidad de desarrollo, se adquiere durante la foliculogénesis mientras el ovocito crece y madura.

Las características morfológicas del ovocito son importantes para determinar su calidad (Leibfried y First, 1979; Younis *et al.*, 1989) ya que de ello dependerá que se pueda reiniciar la meiosis (Moor, 1988; De los Reyes *et al.*, 1999) y, por ende, desarrollar un buen blastocisto (siempre y cuando la inseminación sea eficiente). El potencial de desarrollo del ovocito recogido ya está decidido antes de la maduración *in vitro* y se puede apreciar en su apariencia morfológica (Nagano *et al.*, 2006). Por lo tanto, la selección según la apariencia morfológica y la determinación del estado meiótico de ovocitos inmaduros recogidos por las diferentes técnicas, constituyen indicadores útiles para mejorar los procedimientos de maduración y fecundación *in vitro* (Younis *et al.*, 1989).

El ovocito bovino establece y mantiene su propio microambiente (Eppig *et al.*, 1997; Gilchrist *et al.*, 2004). Está bien reconocido el papel director que tiene el ovocito en promover el desarrollo folicular y en la diferenciación de las células de la granulosa. El ovocito secreta factores de crecimiento que actúan en forma paracrina en las células de la granulosa vecinas, las cuales a su vez regulan el desarrollo del ovocito y dirige el crecimiento folicular (Gilchrist *et al.*, 2004).

5.1. Las células del cúmulo del ovocito

Cuando se forma el antro folicular, las células de la granulosa que rodean al ovocito empiezan a diferenciarse en células del cúmulo (CCs) o en células de la pared de la granulosa (CMGs). Las CCs son dependientes de la presencia del ovocito y de los factores que este secreta (Li *et al.*, 2000), de tal manera que esta interacción ovocito-cúmulo previene su luteinización al promover su crecimiento, regula la esteroidogénesis sintetizando la inhibina y suprimiendo la expresión de receptores para LH (LH-R) (Gilchrist *et al.*, 2004). Mientras tanto, las células de la pared de la granulosa, que no tienen contacto directo con el ovocito, se tornan en células altamente esteroidogénicas pero de lento crecimiento (Gilchrist *et al.*, 2004). Todo este microambiente especializado alrededor del ovocito le confiere la maduración citoplásmica completa y, a la vez, el ovocito desarrolla la capacidad de meiosis (Li *et al.*,

2000), cabe mencionar que la ausencia del ovocito ocasiona que las CCs se transformen en células tipo CMGs (Li *et al.*, 2000).

Las CCs realizan funciones distintas que las células de la pared de la granulosa (CMGs). Así, las células del cúmulo juegan un rol esencial en el crecimiento y desarrollo normal del ovocito gracias a su alta capacidad proliferativa, también se mucifican y son expulsadas con el ovocito en la ovulación. Por su parte las CMGs tienen principalmente funciones de soporte del crecimiento del folículo y un papel endócrino de alta capacidad esteroidogénica (a diferencia de las CCs) por la que terminan diferenciándose en células luteales luego de la ovulación (Li *et al.*, 2000).

La morfología del cúmulo parece constituir un método de selección apropiado para discriminar la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Sirard y Blondin, 1996; Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Las células del cúmulo son subpoblaciones de células de la granulosa que rodean al ovocito por lo que es denominado *cumulus oophorus* (Tanghe *et al.*, 2002), que ejercen funciones biológicas de vital importancia para el ovocito, algunas de ellas exponemos a continuación:

- **Antes de la ovulación,**

- Las células del cúmulo nutren al ovocito y lo mantiene conectado al medio externo (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012), permitiendo su crecimiento y su desarrollo (Li *et al.*, 2000). Asimismo mantienen al ovocito bajo arresto meiotico (Tanghe *et al.*, 2002). Sin embargo, en su momento participarán en la inducción del reinicio meiótico del ovocito hacia metafase II y apoyarán la maduración citoplásmica (Tanghe *et al.*, 2002; Dadashpour Davachi *et al.*, 2012) modulando el efecto de las hormonas y factores de crecimiento (Li *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2003). Éste es un requisito indispensable para llevar a cabo la fecundación y el desarrollo embrionario consecuente (Tatemoto *et al.*, 2000).

- En la misma línea, las CCs tienen un papel importante en la protección de los ovocitos contra el estrés oxidativo inducido por la apoptosis, mediada por el aumento del contenido glutatión reducido (GSH) en ovocitos (Tatemoto *et al.*, 2000).

- Participan en la formación de la zona pelúcida;

- **Durante la ovulación,** conducen al ovocito por el oviducto (Mahi-Brown y Yanagimachi, 1983), sintetizando la matriz compuesta de

proteínas y ácido hialurónico importante en el transporte oviductal (Krisher, 2004).

- **Justo después de la ovulación**, participan en mecanismos complejos de control de acceso del espermatozoide al ovocito (Tesařík *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1995; Tanghe *et al.*, 2002).

In vitro, las células del cúmulo son esenciales durante las primeras horas de maduración de los ovocitos (Merton *et al.*, 2003), por lo que su eliminación antes de la maduración *in vitro* es perjudicial para el proceso (Fukui y Sakuma, 1980).

El ovocito se intercomunica con las células del cúmulo gracias a la existencia de las uniones gap, de vital importancia estructural y funcional para el ovocito (Anderson y Albertini, 1976; Sela-Abramovich *et al.*, 2006; Dadashpour Davachi *et al.*, 2012) y el ovario en general (Grazul-Bilska *et al.*, 1997). Así, las células del cumulo y su ovocito, a quien rodea, constituyen un complejo denominado *complejo cúmulo ovocito* (CCO) (Huang *et al.*, 1997), que se encuentran metabólicamente acoplados mediante uniones gap, por la cual permiten una fácil transferencia de pequeños metabolitos (Moor *et al.*, 1980; Larsen y Wert, 1988; Tatemoto *et al.*, 2000) y moléculas reguladoras (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Los productos proteicos de la familia genética conexin sirven como bloques de construcción para las uniones gap, entre ellas la conexin-43, la más abundante en el ovario (Grazul-Bilska *et al.*, 1997).

Un hecho a tener en cuenta es que el grosor de las capas del cúmulo varía en relación al tamaño folicular (Sirard y Blondin, 1996). Además, a mayor número de capas del cúmulo, mayores son las oportunidades de desarrollo (Loneragan y Fair, 2008). Por lo tanto, el número de capas de células del cúmulo parece influir en el proceso de maduración del ovocito (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Así, ovocitos con múltiples capas de cúmulo tuvieron mayores tasas de maduración nuclear, fecundación y desarrollo que ovocitos desnudos y con sólo la corona radiada (Xu *et al.*, 1986; Shioya *et al.*, 1988; Yang y Lu, 1990; Loneragan *et al.*, 1994; Stojkovic *et al.*, 2001).

Por todo lo anteriormente expuesto la predicción del potencial de desarrollo (en la recolección) del complejo cúmulo ovocito (COC) es crucial para una efectiva selección del ovocito (Merton *et al.*, 2003). Por ello, toda mejora en la técnica de recolección de COC debería permitir seleccionar ovocitos de mayor calidad y en mayor número al principio del proceso de producción *in vitro* de embriones, lo que economizará los procedimientos, y mejorará su eficiencia (Gordon, 2004; Loneragan y Fair, 2008).

Algunos ovocitos muestran la apariencia de CCs expandidos. El aumento de niveles LH produce reinicio de la meiosis en el ovocito, las células del cumulo empiezan a

producir ácido hialurónico, que se deposita en los espacios intercelulares y son estabilizadas por proteínas accesorias, fenómeno que se conoce como expansión del cúmulo (Ball *et al.*, 1982; Tanghe *et al.*, 2002).

Los esquemas de clasificación de ovocitos bovinos están basados en una observación visual de rasgos morfológicos. Uno de los primeros reportes fue descrito por Leibfried y First, (1979), a partir del cual se han descrito muchos esquemas de clasificación basados en el número y compactación de las células del cúmulo, el grado de homogeneidad y el color del citoplasma (Suss y Madison, 1983; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987; De Loos *et al.*, 1989; Younis *et al.*, 1989; Lonergan *et al.*, 1991; Carolan *et al.*, 1992; Stojkovic *et al.*, 2001; Gordon, 2003; Shirazi *et al.*, 2005).

Debido a que existen múltiples maneras de categorización de los COCs, así como expresiones de sus resultados (Hamano y Kuwayama, 1993; Carolan *et al.*, 1994; Hernández-Fernández *et al.*, 2010) la mayoría de estas modalidades de categorización son subjetivas, dependen del técnico y de cada laboratorio, motivo por el cual se producen variaciones notables entre ellos (Gordon, 2003).

Los estudios realizados en Irlanda relacionaron con claridad la morfología del ovocito y la producción de embriones después de la MIV/FIV (Lonergan, 1990). Así, observaron una mejoría en la tasa de división y en la producción de embriones en función del número de capas de células del cúmulo. De forma similar ha sido descrito también en ovino (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012).

Por su parte, estudios realizados en Canadá (Hazeleger *et al.*, 1995) describieron criterios morfológicos y niveles de progesterona del fluido folicular para la selección de complejos cúmulo-ovocito con un alto potencial de desarrollo embrionario. De las nueve categorías propuestas, las tres primeras producían las tasas más altas de embriones. Estas categorías superiores contabilizaban el 47% de la población de ovocitos examinados.

Algunos autores han categorizado los ovocitos en 4 grupos (Salamone *et al.*, 1999) basados en la presencia y morfología de su células del cúmulo que lo rodea: (1) de 4 o más capas de células del cúmulo compactas, (2) una a tres capas de células del cúmulo, (3) células del cúmulo expandidas, u (4) ovocitos desnudos (sin células del cúmulo). Esta clasificación les sirvió para determinar los factores que afecta al COC y la capacidad del desarrollo del ovocito.

5.2. El citoplasma del ovocito

La apariencia del citoplasma refleja la capacidad de desarrollo *in vitro* del ovocito (Leibfried y First, 1979; Nagano *et al.*, 2006). Así, algunos investigadores han centrado la investigación en evaluar la relación entre la apariencia citoplasmática del ovocito y su capacidad para maduración *in vitro*, fecundación y desarrollo posterior (Younis *et al.*, 1989; Nagano *et al.*, 1999; Nagano *et al.*, 2006).

El citoplasma del ovocito cumple funciones importantes para el desarrollo del mismo, así se confirma la presencia de un número de organelas e inclusiones intracitoplasmáticas como el complejo de golgi, retículo endoplásmico liso (SER), gotas de lípidos y delimitadas vesículas de membrana. Estructuras específicas en los ovocitos tales como gránulos corticales y la zona pelúcida aparecen en el folículo secundario y hacia el final del crecimiento ovocitario aparece la mitocondria encapsulada en bovinos (Fair *et al.*, 1996; Hyttel *et al.*, 1997)

Las mitocondrias tienen un importante papel en el citoplasma ovocitario debido a que pueden proveer de ATP para la fecundación y el desarrollo del embrión antes de la implantación (Torner *et al.*, 2004), y también actúan como almacén de calcio y de factores proapoptóticos. Durante la maduración del ovocito las mitocondrias se caracterizan por presentar diferentes cambios en el modelo de distribución (de ser homogéneo a heterogéneo), lo cual está correlacionado con la apoptosis del cúmulo (Wang *et al.*, 2009).

Los ovocitos de baja calidad tienen disfunciones relacionadas con la edad (Armstrong, 2001), la cual incluye una descenso del potencial de membrana mitocondrial, incremento de daños del ADN mitocondrial (ADNm), aneuploidias cromosómicas, incidencia de apoptosis, y cambios en la expresión del gen mitocondrial. Todas estas disfunciones podrían ocasionar un retraso en el desarrollo y detención de la preimplantación de los futuros embriones. Se ha sugerido que estos cambios mitocondriales pueden surgir de excesivos compuestos reactivos de oxígeno (ROS) asociados estrechamente con la producción de energía oxidativa y la sobrecarga de calcio, lo cual puede amenazar la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (poros protéicos de la permeabilidad de la membrana mitocondrial formado bajo ciertas condiciones patológicas) y la consecuente apoptosis, de ahí que la calidad del ovocito puede ser optimizada con la mejora de la función física de las mitocondrias del citoplasma (Wang *et al.*, 2009).

Los ovocitos inmaduros puede tener varias tonalidades de color que van desde gris opaco, gris oscuro y negro, y puede contar, o no, con puntos picnóticos. Por lo que la caracterización de los ovocitos ha sido un punto que cada investigador ha ajustado

según sus experiencias y medios de trabajo, pero con escasa publicación. Al respecto, Nagano *et al.* (2006) manifestaron que ovocitos opacos indican baja densidad de organelas en su citoplasma, el color negro indica acumulación de lípidos y el color gris se corresponde con gotas de lípidos distribuidas en la periferia o en el citoplasma. Asimismo, mediante microscopía electrónica encontraron que las gotas de lípidos estaban relacionadas con las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. En resumen, concluyeron que los citoplasmas de ovocitos de color gris tienen buen potencial de desarrollo, mientras que los de color opaco presentan pobre potencial. Por su parte, un citoplasma del ovocito ennegrecido indica vejez y bajo potencial de desarrollo.

Clasificación según las células del cúmulo y el citoplasma del ovocito

En capítulos anteriores hemos observado que existe un vínculo muy estrecho entre las células del cúmulo y el ovocito, por lo que para la selección es conveniente considerarlos de forma conjunta (Hosoe y Shioya, 1997).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que aún no están claros los criterios de selección de ovocitos de mejor calidad para la maduración *in vitro* que combinen la morfología de las CCs y el citoplasma del ovocito (Nagai, 2001). Algunos investigadores consideran que los ovocitos bovinos rodeados por un cúmulo compuesto por células oscuras y ligeramente expandidas, tienen mayor capacidad de desarrollarse hasta blastocisto que los rodeados de un cúmulo homogéneo, compacto y brillante (Wurth y Kruij, 1992). En esta misma línea, Blondin y Sirard (1995) afirman que los ovocitos tienen mayor competencia cuando las capas más externas del cúmulo están iniciando su expansión, que cuando su cúmulo es muy compacto o muy expandido. Pero en definitiva, los resultados sugieren que los ovocitos desnudos y aquellos que sólo cuentan con corona radiada muestran menor capacidad de desarrollo (Nagano *et al.*, 2006).

Además de las células del cúmulo, la morfología del propio ovocito es muy importante a la hora de seleccionarlos para la producción *in vitro* (Loneragan, 1990). Mientras que algunos investigadores recomiendan un citoplasma homogéneo (Leibfried y First, 1979; De Loos *et al.*, 1989), otros sugieren todo lo contrario (Fukuda y Enari, 1993; Blondin y Sirard, 1995; Nagano *et al.*, 1999). La heterogeneidad parece deberse a una distribución normal de gránulos corticales en citoplasma y se le atribuye mayor capacidad de fecundación *in vitro* debido a una reducida polispermia (Nagano *et al.*, 1999).

En Japón (Kawasaki *et al.*, 1999), examinaron la morfología del ovocito recolectado de folículos de 2-6mm de diámetro y los clasificaron en 5 grupos: (i) ovocitos con

citoplasma del ovocito homogéneo y rodeado por cúmulo compacto y completo, (ii) ovocitos con citoplasma heterogéneo y rodeado por una capa de cúmulo completo, (iii) ovocitos rodeados por cúmulo expandido, irregular y completo, con células granulosas en una matriz gelatinosa, (iv) ovocitos sin capa de células del cúmulo, (v) ovocitos no categorizados en los grupos anteriores. Las tasas de maduración y fecundación de ovocitos con citoplasma heterogéneo fueron superiores que los homogéneos. Los ovocitos con citoplasma heterogéneo mostraron dispersión de gránulos del citoplasma durante la maduración. De otro lado, aquellos con cúmulo expandido o sin cúmulo tenían menores tasas de maduración y de fecundación.

Como ya se ha mencionado, los ovocitos con citoplasma heterogéneo tienen mayores tasas de FIV debido a la menor incidencia de polispermia (Nagano *et al.*, 1999). Mediante exámenes con microscopía electrónica (ME) estos autores mostraban que estos ovocitos poseen gránulos corticales alineados más cerca a la membrana plasmática (membrana vitelina); de otro lado, ovocitos con citoplasma homogéneo mostraban algunos pequeños clusters de gránulos corticales después de la maduración *in vitro*.

Posteriormente en el 2006, también con ME determinaron que el potencial de desarrollo de ovocitos recolectados de folículos pequeños (2-8mm) ya está decidido antes de la MIV, lo que se ve reflejado en la apariencia morfológica del ovocito. De esta forma, un citoplasma del ovocito gris oscuro indica un acumulo de lípidos y buen potencial de desarrollo, mientras que un citoplasma transparente indica presencia de organelas de baja densidad y pobre potencial de desarrollo. Así también, un citoplasma negro indica envejecimiento y bajo potencial de desarrollo (Nagano *et al.*, 2006). Este trabajo propone que aquellos ovocitos que hayan entrado en fase de seudomaduración tienen buen potencial de desarrollo para llegar a la fase de blastocisto *in vitro*; sin embargo, la capacidad de desarrollo final sigue en estudio.

Basados en estos estudios y teniendo en cuenta diferentes consideraciones como el tiempo y la genética de los animales, cada laboratorio tiene su propio criterio de selección de ovocitos, pero los métodos descritos por Loos *et al.*, (1989) y Lonergan *et al.*, (1990) son los más comúnmente utilizados.

5.3. El Tamaño del ovocito

En la misma línea de utilización de indicadores de la calidad de los ovocitos mediante métodos no invasivos, algunos autores indican una clara relación entre el diámetro del ovocito y su capacidad de desarrollo (Fair *et al.*, 1995; Arlotto *et al.*, 1996). Debe tenerse en cuenta que durante el desarrollo del ovocito suceden un gran número de cambios ultraestructurales y moleculares, que están ligados a la capacidad

de desarrollo del gameto (Hyttel *et al.*, 1997). Así, el crecimiento del ovocito experimenta variaciones en su diámetro que van desde 30 μm en el folículo primordial a más de 120 μm en el folículo terciario (Fair *et al.*, 1995, 1996).

La adquisición de la competencia para reanudar la meiosis se realiza cuando el ovocito presenta un diámetro de, al menos, 100 μm (Hyttel *et al.*, 1997); mientras que para que los ovocitos tengan la plena competencia para completar la maduración meiótica a MII se realiza a partir de 110 μm (Hyttel *et al.*, 1997) o a partir de 115 μm de diámetro (Nagano *et al.*, 2006), desde la cual le permitirá soportar el desarrollo embrionario. Por lo tanto, la medida del diámetro ovocitario puede ser una herramienta práctica para seleccionar ovocitos competentes y de considerable importancia cuando se trata de colectar a partir del pool de folículos preantrales (Hyttel *et al.*, 1997; Nagano *et al.*, 2006).

5.4. El tamaño folicular

El tamaño folicular constituye un factor que afecta el desarrollo del ovocito *in vitro* (Hagemann *et al.*, 1999). Muchos estudios utilizando ovarios recogidos al azar en matadero (Lonergan *et al.*, 1994; Blondin y Sirard, 1995) o de vacas superovuladas (Pavlok *et al.*, 1992; Blondin *et al.*, 2002) muestran que, en general, ovocitos de folículos grandes tiene mayor capacidad de desarrollo *in vitro* para llegar a la fase de blastocisto. Sin embargo, debido a las dos o tres ondas foliculares que se forman durante el ciclo estral, el diámetro folicular no necesariamente indica si el folículo está creciendo o se atresia (Hagemann *et al.*, 1999).

Se asume que la historia del folículo determina el futuro del ovocito (Hendriksen *et al.*, 2000) la cual está asociada con su diámetro. La capacidad de desarrollo de los ovocitos está relacionada con el crecimiento folicular, de manera que los ovocitos procedentes de folículos con un diámetro $<2\text{mm}$ presentan dificultades para llevar a cabo la meiosis y también tienen poca capacidad de evolucionar hasta blastocistos (Pavlok *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994; Fair *et al.*, 1995; Hagemann *et al.*, 1999). En algunos de estos estudios se puso de manifiesto que dichos ovocitos no habían completado aún su crecimiento y la síntesis de ARNm.

Con un tamaño folicular superior a 3 mm, los ovocitos tienen adquirida una capacidad meiótica intrínseca para desarrollarse hacia embrión después de la maduración-fecundación-cultivo *in vitro* (Hendriksen *et al.*, 2000), lo cual se correspondería con un ovocito de un diámetro de 110 μm (Fair *et al.*, 1995), pero requieren de una etapa de “premaduración” para expresar su capacidad. *In vivo* esta premaduración sucede durante el desarrollo preovulatorio en el momento del pico LH.

En folículos de 3 a 7mm se mantiene la proporción de ovocitos competentes (Hendriksen *et al.*, 2000). Mientras que a partir de los 8mm esta proporción se incrementa ya sea en vacas no tratadas y en las superestimuladas con gonadotropinas, sin embargo esta capacidad del ovocito es menor cuando son madurados *in vitro* que aquellos madurados *in vivo*. Del mismo modo, Blondin y Sirard (1995) no observaron diferencias significativas entre la competencia de los ovocitos derivados de folículos de 3–5mm con los de 6–8mm. Por todo ello se infiere que el rango de diámetro folicular de 3–8 mm es el más recomendable para la obtención de ovocitos para emplear en fecundación *in vitro*.

VI. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION y CALIDAD DE LOS OVOCITOS

Toda vez que la producción de los ovocitos se desarrolla a lo largo de la vida del animal, cualquier factor que interviene sobre la misma puede tener una repercusión más o menos marcada sobre la producción y la calidad de los ovocitos. La reproducción del animal es un proceso de alta demanda nutricional para llevar a cabo sus funciones normales, entonces, todo cambio ya sea externo o interno, normal o patológico, puede afectar directa o indirectamente la producción de ovocitos (Pfeifer *et al.*, 2008).

Desde un punto de vista práctico, los ovocitos utilizados para la producción *in vitro* de embriones bovinos no solo han de ser “competentes”, sino que deben estar en número adecuado que permita realizarlo con eficiencia (Merton *et al.*, 2003).

Existen muchos factores que pueden afectar la capacidad de producción y desarrollo del ovocito bovino ya sea *in vivo* o *in vitro* (Hagemann *et al.*, 1999). Sin embargo, aún no se ha llegado a entender cómo muchos de estos factores actúan o interactúan en sus efectos específicos en el ovocito. A continuación expondremos algunos de los factores que afectan la producción y calidad de los ovocitos.

6.1. Técnica de recolección de ovocitos

Cuando se habla de eficiencia de la producción de embriones bovinos *in vitro* a escala comercial es crucial tener en cuenta el procedimiento y la técnica de recuperación de ovocitos empleada. Por lo que, para lograr un progreso real, las investigaciones se están conduciendo hacia el origen de un ovocito competente. Por ello se están investigando tanto técnicas invasivas como no invasivas para recolectar estas estructuras de forma eficiente (Merton *et al.*, 2003). Del mismo modo, la tasa de recuperación de ovocitos dependiente de la técnica utilizada son muy variadas (Bols *et*

al., 2007; Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Por ello, para tener éxito en la PIV no solo precisa tener en cuenta los factores intrínsecos del ovocito, sino también factores extrínsecos como la técnica de recuperación (Hendriksen *et al.*, 2000).

Cuando se utilizan ovarios procedentes de matadero, las técnicas más empleadas en la recuperación de ovocitos son la aspiración del contenido folicular (Leibfried y First, 1979), el slicing (Carolan *et al.*, 1992; Gordon, 2003) y la punción folicular (Das *et al.*, 1996), a partir de las cuales se han combinado o desarrollado algunas variaciones. Otras técnica indirectas, es decir primero la obtención del folículo y luego el ovocito son la disección folicular mecánica y la digestión enzimática.

La aspiración folicular constituye el método más comúnmente utilizado en los laboratorios de investigación. Este método consiste en aspirar el líquido de los folículos visibles ubicados en la superficie del ovario mediante una aguja adherida a una jeringa (Leibfried y First, 1979; Xu y Greve, 1988; Das *et al.*, 1996) o a una bomba de vacío (Hashimoto *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000).

El principal inconveniente de esta técnica es que la presión de aspiración puede dañar físicamente las células del cumulo, reduciendo la calidad del complejo cúmulos ovocito (Hamano y Kuwayama, 1993). Otro problema de esta técnica es el escaso rendimiento ya que sólo se recupera entre el 50-60% de los folículos aspirados (1984). Sin embargo, la aspiración tiene la ventaja de la rapidez con la que se obtienen los ovocitos (Das *et al.*, 1996; Gordon, 2003), exponiendo a los COC por menos tiempo a las condiciones extrafoliculares (Quintana *et al.*, 2012). Estos factores son importantes si se persigue la producción de grandes cantidades de ovocitos.

Un estudio encaminado a mejorar la técnica de aspiración (Fry *et al.*, 1997) propone que el mayor número de ovocitos viables se lograría con una aguja de 17G y una presión de vacío de 55mmHg. Con estas condiciones estos autores lograron una tasa de recuperación del 56 % de los folículos totales y el 70% del de los ovocitos. Además, la presión de vacío no solo afecta la tasa de recuperación de ovocitos sino que también parece afectar a su calidad. En efecto, a medida que se aumenta la presión se incrementa el número total de ovocitos recolectados (hasta alrededor de 50mmHg). Sin embargo, por encima de esa cifra (75 y 100mmHg) se produce una reducción del número de ovocitos viables, debido, probablemente, al despojo de las capas de células que van sufriendo los COCs, los cuales van perdiendo calidad. En resumen, estos autores proponen que las mejores tasas de recuperación de ovocitos se producirían cuando se utilizan presiones de 55mmHg con agujas de 17G y 77mmHg con 20G, superar estos niveles provocaría daños a los ovocitos.

La disección de la corteza del tejido ovárico constituye otra de las técnicas empleadas en la recolección de ovocitos, denominada comúnmente **slicing** (Carolan *et al.*, 1992). Esta disección puede realizarse con una hoja de bisturí (Das *et al.*, 1996) o con microescarpelo oftálmico (Quintana *et al.*, 2012). El slicing ofrece la ventaja de recuperar ovocitos desde dos fuentes: la superficie folicular y de aquellos más profundos ubicados en el estroma cortical del ovario (Das *et al.*, 1996). Sin embargo, su mayor desventaja es el tiempo necesario para ejecutar la técnica (Das *et al.*, 1996), la experiencia que debe tener el técnico y que genera una gran cantidad de residuos que podrían favorecer la contaminación (Arav, 2001).

Esta técnica ha permitido recoger un mayor número de ovocitos en vacas (Hamano y Kuwayama, 1993; Carolan *et al.*, 1994), búfalas (Das *et al.*, 1996; Abdoon y Kandil, 2001), cabras (Martino *et al.*, 1994; Hoque *et al.*, 2011), ovejas (Wani *et al.*, 2000; Shirazi *et al.*, 2005; Petrean *et al.*, 2010) y en yeguas (Erice *et al.*, 1998). Por otra parte, los resultados sobre la obtención de ovocitos de mejor calidad son contradictorios. Mientras que algunos afirman haber encontrado una mayor tasa de recuperación (Hamano y Kuwayama, 1993), otros opinan que su eficiencia fue inferior (Carolan *et al.*, 1994; Hernández-Fernández *et al.*, 2010) (Tab.1).

Tabla 1. Resultados de la cantidad y calidad de ovocitos bovinos recuperados utilizando técnicas de aspiración y slicing según diversos autores.

Autores, año	Raza	Total				
		Ovocitos/ova.		Ovocitos calidad superior/ova.		
		Aspirac.	Slicing	Tipo	Aspiración	Slicing
Suss <i>et al.</i> , (1988a)	Desconocida	11,3	--	CCs compacto	5,3 (47%)	--
Hamano y Kuwayama., 1993	Wagyu	11,5	31,6	A+B	8,4 (73%)	29,6 (94%)
Carolan <i>et al.</i> ,1994	Desconocida	13,9	44,2	A+B	6,8 (49%)	20,2(46%)
Hernandez-Fernandez <i>et al.</i> , 2010	Mestizo	4,6	7,0	Mad.	3,2 (70%)	4,4 (63%)

Nota: Los resultados están expresados en promedio y en porcentaje (%).

En la técnica de **punción folicular** (Das *et al.*, 1996) los ovarios son colocados en una placa petri y fijados con fórceps. Aquellos folículos visibles de 2-6mm son sumergidos en una solución salina normal al 0,9% y pinchados con una aguja de 18G. Mediante una ligera presión sobre el ovario se estimulaba la salida del fluido folicular con su correspondiente ovocito.

La **aspiración con transiluminación ovárica** (TAO) constituye otra técnica para la recuperación de ovocitos (Arav, 2001). Aunque menos conocida, esta técnica consiste en colocarle una fuente de luz halógena en el hilio ovárico previamente extraído, la cual permite reflejar los folículos externos. Mediante esta técnica estos autores han logrado recuperar 7,3 ovocitos/ovario, frente a los 4,9 ovocitos/ovario que obtenían por aspiración.

Publicaciones recientes describen una nueva técnica de recolección de ovocitos denominándola "**ORC**", con la cual obtuvieron mejores tasas de recuperación a partir ovarios de ovejas del matadero (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Los autores no describen el origen de las siglas pero describen que este método consiste en preparar un tubo Falcon modificado (MFT) con cuchillas (1cm × 1cm con 1mm × 1mm de poro cuadrado) que consiste en varias etapas. Las cuchillas metálicas fueron fijadas por calor en la parte inferior de los tubos Falcon de 14mL. Cada ovario es colocado en los MFTs y cubierto con 3mL de un medio de lavado de ovocito preincubado suplementado con heparina y estreptomina, a continuación fue centrifugado y el precipitado fue lavado, clasificado y finalmente llevado a MIV.

La ventaja del ORC radica en que se puede utilizar folículos ubicados en la profundidades de la corteza, en consecuencia se obtienen mayores tasas de recuperación sin deterioro significativo en la capacidad meiótica o en la calidad del ovocito. Adicionalmente se puede ahorrar tiempo para en la colección del ovocito, la maduración y la consecuente producción de embriones (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012).

Resultados del ORC en ovejas comparados con la técnica de aspiración obtuvieron $6,8 \pm 0,3$ ovocito/ovario versus $3,8 \pm 0,1$ respectivamente. Se indica así mismo que la tasa de ovocitos recuperados de mejor calidad, y la tasa de reinicio meiótico corresponden al 77% y 79% respectivamente, mientras que con el mejor método de aspiración utilizado como control (aguja de 20G, 10ml/min) las tasas fueron del 90% y 79% respectivamente (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Por lo tanto, no deja de ser una alternativa pero sus resultados siguen siendo poco significativos con respecto a la mejor técnica de aspiración propuesta.

Entre los protocolos de manipulación de folículos preantrales se encuentran los **medios mecánicos simples** y la **digestión enzimática** descritos en bovino (Figueiredo *et al.*, 1993), búfalas (Gupta *et al.*, 2007), cerdas (Choi *et al.*, 2008) y ratones (Choi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). Estas técnicas generalmente son desarrolladas para evaluar la cantidad total de folículos y la posibilidad de aprovecharlos para obtener ovocitos capacitados.

El primer método consiste en disecar al ovario en varias piezas con un cortador de tejidos. Posteriormente la suspensión será pasada por filtros obteniéndose de esta manera los folículos preantrales.

Por su parte, la técnica de digestión enzimática consiste en añadir una enzima a los fragmentos ováricos contenidos en un medio de suspensión. Esta enzima puede ser colagenasa tipo I y IV (Choi *et al.*, 2008) o tripsina (Gupta *et al.*, 2007). En ganado bovino este método tiene la ventaja de recuperar mayor tasa de folículos preantrales que el mecánico (Figueiredo *et al.*, 1993).

Por otro lado, cuando la recuperación de ovocitos se realiza en animales vivos la técnica más utilizada es la **aspiración transvaginal ecoguiada (OPU)** (Pieterse *et al.*, 1988; Pieterse *et al.*, 1991). Algunos de los factores para el éxito de este procedimiento son regular la presión de aspiración (Ward *et al.*, 2000), el diámetro de las agujas (Fry *et al.*, 1997) y realizarlo durante la fase de crecimiento de la oleada, antes que se establezca la selección (Machatkova *et al.*, 2000). La técnica de OPU tiene como desventajas el alto coste, justificado cuando se trata de animales de alto valor genético (Galli *et al.*, 2001).

Acercas de la presión de aspiración Ward *et al.*, (2000) refiere que mientras la presión aumenta existe una significativa disminución de la tasa de recuperación de ovocitos, bajando del 70 % cuando la presión es de 30-50mmHg hasta 52% cuando 90 mmHg, atribuido al colapso del folículo alrededor de la aguja, impidiendo el flujo y dañando al ovocito. Nótese en este trabajo que los resultados de presiones de aspiración de 30-50mmHg fueron similares a las de aspiración manual de ovarios procedentes del matadero (control) no sólo en cuanto a la recolección total de ovocitos sino también a la recolección de los de grado 1 (ovocitos con múltiples capas de células del cúmulo), tasa de división, blastocistos obtenidos y blastocistos eclosionados.

Las técnicas de aspiración y slicing son las más comúnmente utilizadas para los sistemas de PIV con fines de investigación y mejora genética (Dadashpour Davachi *et al.*, 2012). Además, las experiencias utilizando en estas dos técnicas no muestran diferencias significativas de los ovocitos recuperados a la maduración (Carolan *et al.*, 1994) ni a la fecundación *in vitro* (Hoque *et al.*, 2011).

6.2. Aptitud productiva

Debe tenerse en cuenta que bajo este epígrafe, aptitud productiva, se describen dos aspectos estrechamente relacionados. Por un lado, la especialización de los animales para tener una determinada producción (carne o leche), y por otro, las diferencias de manejo a la que están sometidos los animales en función de su producción.

La intensa selección a la que han sido sometidas las hembras bovinas para producir leche, ha provocado que nos encontremos con un elevado porcentaje de animales con un profundo balance energético negativo (BEN), creándose un conflicto de intereses entre la producción de leche y la eficiencia reproductiva. De hecho, se ha visto que las vacas de razas cárnicas presentan mejor fertilidad que las vacas de razas de producción lechera (Santos *et al.*, 2004).

Varios estudios han demostrado que en vacas lecheras de alta producción, el crecimiento y la maduración del ovocito está adversamente condicionado por los cambios bioquímicos que se producen debidos al BEN (Kendrick *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2008b). Así también, modelos de maduración *in vitro* han sugerido que el BEN puede obstaculizar la fertilidad debido a su efecto sobre la calidad del ovocito y en consecuencia, en la calidad del embrión.

El estado catabólico al que está sometido el animal proviene de adaptaciones metabólicas que realiza la vaca de alta producción, como el BEN, pérdida de peso, apetito reducido, disminuciones en insulina, leptina, IGF-I, y glucosa, y altas en GH, NEFA, cetonas y úrea que afectan la reproducción en general y particularmente sobre el ovocito y el embrión (Leroy *et al.*, 2008a).

Por otro lado, también ha sido descrito que ovocitos recuperados de vacas con elevado mérito genético, independientemente de su valores de producción, presentan una menor producción de blastocistos *in vitro* (Snijders *et al.*, 2000). Un fenómeno similar fue descrito al comparar vacas de aptitud cárnica con lecheras en lactación, encontrándose mayor calidad de embriones en las hembras de aptitud cárnica (Leroy *et al.*, 2005). Todo lo cual nos sugiere un posible efecto de la aptitud en la recuperación de ovocitos, tanto en cantidad como en calidad.

Existe muy poca literatura en la que se relacione la recuperación de ovocitos con la aptitud productiva. En un trabajo reciente (Abraham *et al.*, 2012), se han encontrado diferencias en la recuperación de ovocitos entre razas bovinas europeas y principalmente en blastocistos. El promedio de COC recuperados por aspiración de vacas sacrificadas del matadero fue de 34 para razas cárnicas y 29 para las de aptitud

láctea (Swedish Holstein: 28 and Swedish Red: 29). Este estudio, además, hacía énfasis en que la tasa de blastocistos a día 8 era mayor cuando ovocitos provienen de razas cárnicas que las lecheras.

6.3. Fase del ciclo estral

En el ciclo estral de la vaca la fase lútea presenta una duración de 14 a 18 días. Durante esta fase predomina el cuerpo lúteo en menor o mayor desarrollo. Por su parte, durante la fase folicular, con una duración de 4 a 6 días, se produce la maduración y desarrollo completo del folículo dominante (con regresión progresiva del cuerpo lúteo) y la consecuente ovulación (Forde *et al.*, 2011), con indicios de formación de un cuerpo hemorrágico, a medida que emerge un primer reclutamiento de folículos.

Ciertos investigadores han apuntado la existencia de diferencias en el número de ovocitos recuperados, de ovarios procedentes de matadero, en función de la fase del ciclo estral en la que se encontrase la vaca. Así, observaron una mayor tasa de recuperación cuando los animales se encontraban en fase folicular que cuando se hallaban en luteínica (Leibfried y First, 1979). Estas mismas diferencias han sido también apreciadas en búfalas (Manjunatha *et al.*, 2007).

La presencia de al menos un cuerpo lúteo en los ovarios bovinos procedente del matadero parece reducir el porcentaje de recolección de ovocitos útiles, así lo confirmaron en vacas (Moreno *et al.*, 1992) y en ovejas (Wani *et al.*, 1999). Aunque, este hecho no fue ratificado por Domínguez (1995) donde la presencia del cuerpo lúteo no afectó la cantidad de los folículos en desarrollo.

Además, también se ha descrito una influencia de la fase del ciclo estral sobre el potencial de desarrollo del ovocito para llegar hasta blastocisto (Machatkova *et al.*, 1996; Hagemann *et al.*, 1999; Nagai, 2001).

Profundizando en el tema, algunos investigadores señalaron que la recuperación de ovocitos era más eficaz cuando se realizaba durante las fases de crecimiento folicular, que durante las fases de dominancia (Hagemann *et al.*, 1999; Machatkova *et al.*, 2000). Así, Hagemann *et al.* (1999) definieron que las etapas de inicio del crecimiento folicular en ambas ondas del ciclo estral (día 2 y día 10) se conseguían más ovocitos que durante la etapa de dominancia (día 7 y día 15). Posteriormente, Machatkova *et al.*, (2000) observaron que el mayor rendimiento se lograba al inicio de la primera onda (del día 1 al día 3). Por lo que, la fase de crecimiento de la primera onda folicular, antes de la selección del folículo dominante, es el mejor momento para la recolección de ovocitos, probablemente debido a su mayor visibilidad.

Un estudio posterior para medir la eficacia en la producción de ovocitos y embriones fue diseñado comparando la fase de crecimiento folicular (día 3) con la fase de dominancia folicular (día 7), y la interacción con distintos tamaños foliculares (Machatkova *et al.*, 2004). Este estudio determinó que el número promedio de ovocitos útiles por donante fue similar en ambas fases de desarrollo folicular, pero el número promedio de embriones por donante fue el doble cuando los ovocitos fueron recolectados en la fase de crecimiento que durante la dominancia.

6.4. Peso de los ovarios

Así como en machos existe una alta correlación entre la circunferencia escrotal y la cantidad y calidad seminal (Gipson *et al.*, 1985), positivamente relacionado con la fertilidad en los toros (Garmyn *et al.*, 2011), se puede suponer que en hembras suceda algo semejante. Es decir, el peso o tamaño del ovario pueda determinar la cantidad y calidad de ovocitos.

Por otro lado, en 1996, DUBY *et al.*, determinaron que el peso de los ovarios bovinos tenía una estrecha relación con la edad. Así, observaron cómo el peso de los ovarios se incrementa desde 0,5g a las dos semanas de vida hasta 4g a los 4 meses y 10g en animales en torno a los 12 meses.

Esta relación entre el ovario, sus gametos y la fertilidad de la hembra es un supuesto de muchos años en la biología reproductiva (te Velde y Pearson, 2002). Y es, en esta última década, cuando se ha venido desarrollando estudios relacionados a este tema (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2011) destinados principalmente a la caracterización fenotípica y la selección de los animales en relación a su reserva ovárica.

Existen evidencias indirectas que indican que el número de folículos durante las oleadas foliculares se encuentra condicionado por el tamaño de sus ovarios (Scheffer *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2005). De manera semejante otro estudio describió que la proporción de ovocitos recuperados y el porcentaje del COC de buena calidad disminuía significativamente según el tamaño de los ovarios (Palma *et al.*, 2008). Por todo ello, Ireland *et al.*, (2011) indican que el ganado adulto joven con ovarios más pequeños tienen un menor número de folículos antrales y además una disminución marcada del número total de folículos y ovocitos morfológicamente buenos; situación opuesta cuando se trata de ovarios grandes.

6.5. Edad de la donante

En los primeros capítulos de la presente revisión hemos hablado que existe una variación de la producción de folículos obtenidos con relación a la edad de la hembra bovina.

La utilización de animales jóvenes como fuente de ovocitos constituye un área de mucho interés para la producción de embriones debido a la ventaja que podría resultar acortar el intervalo generacional, con la consecuente aceleración de la tasa de ganancia genética (Lohuis, 1995; Duby *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1998). En virtud a esto, algunos investigadores recomiendan el empleo de ovocitos procedentes de novillas mayores de 11 meses para la producción de embriones *in vitro*, obteniendo resultados similares a los obtenidos en vacas adultas (Yang *et al.*, 1998; Nagai, 2001).

El desarrollo de métodos de aspiración ecoguiada –ovum pick up (OPU)- para la recuperación de ovocitos en terneras, junto con la mejora en los medios de cultivo para PIV, han provocado un aumento en las tasas de desarrollo hacia blastocisto y el nacimiento de terneros vivos, lo que parece indicar que las terneras pre púberes podrían jugar un papel importante en los futuros programas de reproducción animal (Duby *et al.*, 1996). Sin embargo, el trabajo con este grupo de animales tiene también limitaciones. Ciertos estudios han demostrado que cuanto más joven sea la donante de ovocitos, más afectada o comprometida estará la competencia de desarrollo de los mismos (Yang *et al.*, 1998), ya que, en general, los ovocitos donados por hembras jóvenes y los embriones que de ellos derivan, podrían ser menos tolerantes al manejo y a las condiciones de cultivo *in vitro* que los ovocitos de adultos (Armstrong, 2001).

Por otro lado, el empleo de ovocitos provenientes de donantes de edad avanzada puede tener un gran interés, ya que supone aumentar la vida reproductiva de la hembra, así como favorecer la conservación de recursos genéticos (Armstrong, 2001). Sin embargo, la fertilidad de la hembra se reduce a medida que avanza la edad (Armstrong, 2001) y específicamente la calidad del ovocito también disminuye con el paso de los años (Wang *et al.*, 2009).

En la misma línea, Armstrong (2001) determinó que los ovocitos, de ambos grupos de animales (muy jóvenes o los de edad avanzada) pueden presentar alteraciones en la maduración nuclear o citoplásmica, incompetencia o incapacidad de continuar la meiosis, problemas para la penetración y descondensación espermática, incapacidad de formar los pronúcleos y bloqueo deficiente de la polispermia. Por ello son necesarios más estudios dirigidos a identificar las deficiencias en el desarrollo de los ovocitos de hembras jóvenes, así como las anormalidades de éstos en hembras de edad avanzada (Armstrong, 2001).

Por ello en una revisión por Wang *et al.*, (2009) describieron que ovocitos de baja calidad tienen disfunciones relacionadas a la edad de los animales, entre las cuales están incluidas: una disminución del potencial de membrana mitocondrial, incremento de daños del ADN mitocondrial, aneuploidias cromosómicas, incidencia de apoptosis, y cambios en la expresión del gen mitocondrial. Todas estas disfunciones podrían ocasionar un retraso en el desarrollo y alteraciones pre implantación de los embriones. También han sugerido que estos cambios mitocondriales pueden surgir de excesivas moléculas reactivas de oxígeno (ROS) las cuales están asociadas estrechamente con la producción de energía oxidativa y la sobrecarga de calcio, todo ello puede inducir la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial y la consecuente inflamación mitocondrial y por ello la apoptosis.

Otros experimentos determinaron que la edad de la donante influye en la capacidad de sus ovocitos y su eficiencia en la producción de embriones *in vitro* (Armstrong, 2001), pudiéndose comprobar una menor competencia de los ovocitos obtenidos de hembras prepúberes (Revel *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 2008).

En algunos países de Europa donde la producción cárnica involucra el sacrificio de animales jóvenes, la PIV podría estar basada en la recolección de ovarios a partir de terneros en lugar de nodrizas donantes (Gordon, 2003).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue el de optimizar el método de recuperación de ovocitos para su posterior empleo en fecundación *in vitro*. Para ello se hace necesario el análisis de los principales factores que podrían influir en la recuperación y en la calidad de los mismos.

En consecuencia, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- (1) Evaluar la eficiencia de dos técnicas de recuperación de ovocitos (aspiración y slicing) de ovarios bovinos obtenidos de matadero.
- (2) Analizar la posible influencia de la aptitud productiva de las donantes sobre el rendimiento y la calidad de los ovocitos recuperados
- (3) Determinar si el peso de los ovarios condiciona el rendimiento y la calidad de los ovocitos recolectados.
- (4) Valorar la influencia de la fase del ciclo estral en la que se encuentran las donantes en el rendimiento y calidad de los ovocitos recuperados.
- (5) Comprobar la rentabilidad del empleo de hembras muy jóvenes ($\leq 12m$) sacrificadas en matadero como posibles donantes de ovocitos.
- (6) Evaluar el tamaño de los ovocitos recuperados en función de la edad de las donantes como un indicador de la futura competencia de los mismos.



*MATERIAL Y
MÉTODOS*

MATERIAL Y MÉTODOS

I. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS OVARIOS

Los ovarios fueron recogidos en un matadero de la Provincia de Lugo-Galicia, matadero industrial COREN - NOVAFRIGSA, ubicado en Lamablanca (Coeses), situado a 20 min de la capital de Lugo.

Sólo fueron seleccionados para este estudio los ovarios que no presentaban signos de alteraciones patológicas macroscópicas. Una vez recuperados los ovarios en la cadena de sacrificio, fueron transportados inmediatamente al laboratorio de la unidad de Obstetricia y Reproducción, situado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Santiago de Compostela, campus de Lugo. Para su transporte se utilizaron dos recipientes (bolsas con cierre hermético) en los que se separaron los pares de ovarios en función de la aptitud productiva de los animales (cárnica o láctea). Los recipientes contenían una solución salina fisiológica (SSF) al 0,9 % con antibiótico, penicilina estreptomycinina (100 000 UI/L y 125 mg/L, respectivamente). Los pares de ovarios se mantuvieron en todo momento a una temperatura de 30–35 °C hasta su llegada al laboratorio. Una vez allí se procedió a lavarlos tres veces con SSF.

II. CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES DE OVARIOS

Para la clasificación de las hembras donantes, se emplearon los datos recogidos en el Documento de Identificación Bovino. De esta forma se comprobó que la mayor parte de los animales pertenecían a las razas Frisona, Rubia Gallega y el colectivo “cruces”. Debido a la ambigüedad de esta clasificación, se consideró más eficaz dividir a los individuos en función de su aptitud productiva.

Figura 2. Reconocimiento de la aptitud productiva y recolección de ovarios en el matadero.



2.1. Aptitud productiva

A lo largo de todo este trabajo hemos agrupado a las hembras del estudio en función de su aptitud productiva en:

- **Hembras de aptitud Cárnica**, aquellos animales cuyo fin primordial es la producción de terneros/as cuyo destino será el sacrificio. Son animales que no son ordeñados para venta de leche.
- **Hembras de aptitud Lechera**, aquellos animales cuyo fin comercial es la producción de leche.

2.2. Fase del Ciclo estral

A lo largo del estudio se ha valorado la influencia de las fases del ciclo estral, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- **Fase folicular**, ya que es el período de tiempo que va desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación, en este estudio se ha considerado que las hembras se encontraban en esta fase cuando en el par de ovarios se observaba un folículo dominante en ausencia de cuerpo lúteo. Además, para tener la seguridad de que eran hembras cíclicas se buscó la existencia de un cuerpo blanco con el fin de confirmar que éste no fuese el primer ciclo estral postparto.
- La **fase lútea**, tradicionalmente se considera como el período de tiempo que va desde la ovulación a la regresión del cuerpo lúteo. En este trabajo las hembras fueron incluidas en esta categoría cuando los pares de ovarios mostraban al menos un cuerpo lúteo desarrollado.

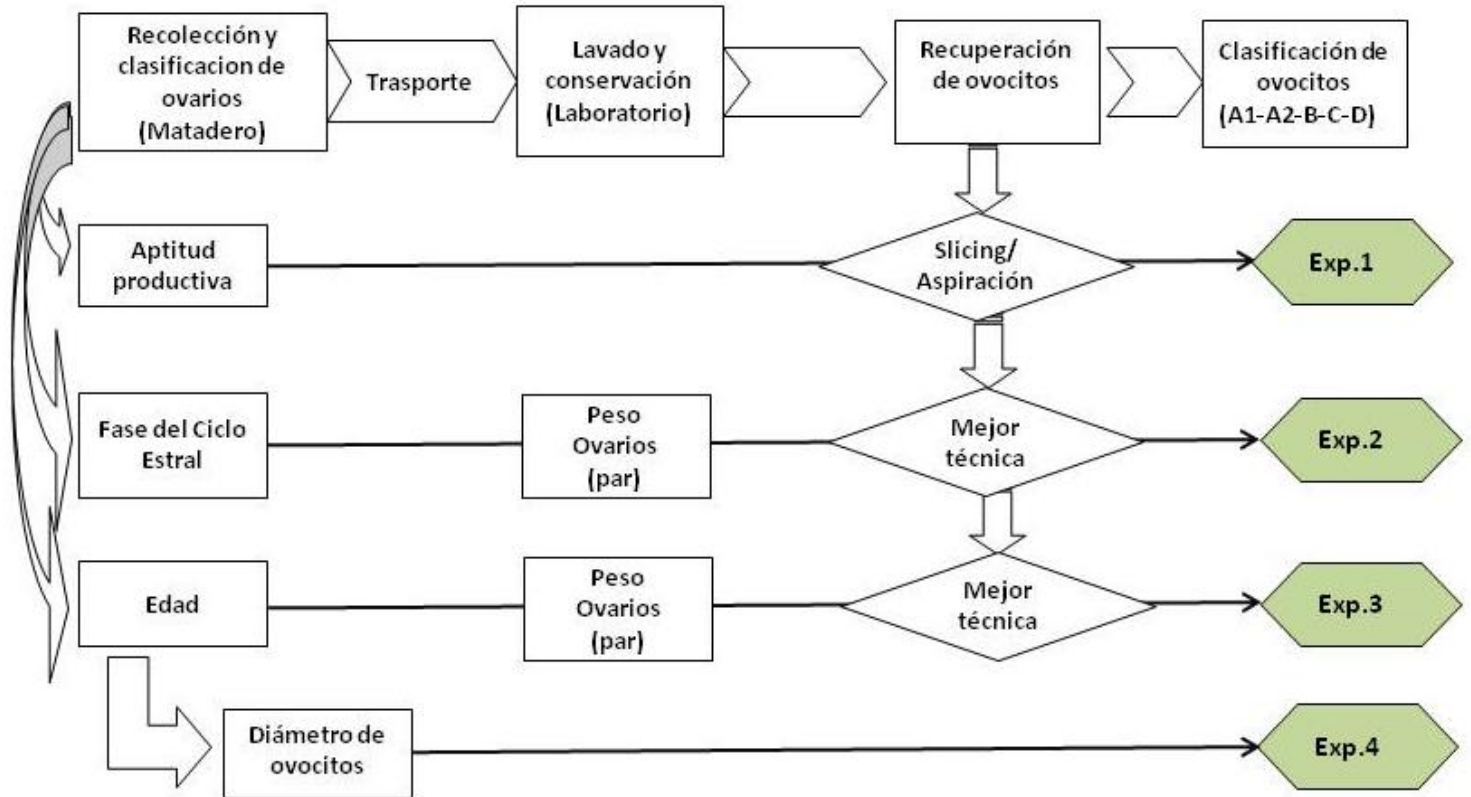
Esta clasificación fue realizada en el laboratorio para los experimentos dos y tres, en los cuales se quería determinar la influencia del ciclo estral sobre el rendimiento de ovocitos (Fig.3).

2.3. Edad

El dato sobre la edad de los animales fue recogido del Documento de Identificación Bovino, proporcionado por los Servicios Veterinarios Oficiales del matadero Coren–Novafrigsa. En base a ello, los animales fueron agrupados en dos categorías:

- Bovinos entre 7 y 12 meses de edad, a quienes se les denominó **novillas $\leq 12m$** .
- Bovinos mayores o iguales a 24 meses de edad, a quienes se les denominó **adultas $\geq 24m$** .

Figura 3. Resumen de las diferentes etapas de los experimentos.



III. TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Los ovocitos fueron recuperados de los ovarios utilizando las técnicas de slicing o de aspiración. Una actividad común para ambas técnicas ha sido la elección de los folículos cuyo rango esté entre 2 – 8 mm (Hendriksen *et al.*, 2000; Gordon, 2003). El objetivo del experimento 1 fue valorar el efecto de estas dos diferentes técnicas sobre la recuperación de ovocitos. El procedimiento de cada una de ellas se detalla a continuación:

3.1. Técnica de Aspiración:

Mediante la técnica de aspiración todos los folículos visibles de 2–8 mm de diámetro fueron aspirados con una aguja de 18G x 1 ½ pulgada en una jeringa de 10mL (Carolan *et al.*, 1994). El líquido folicular recogido se depositaba en un tubo graduado de 15mL contenido en un vaso de precipitación protegido de la luz (Fig.4).

Figura 4. Técnica de aspiración para la recolección de ovocitos

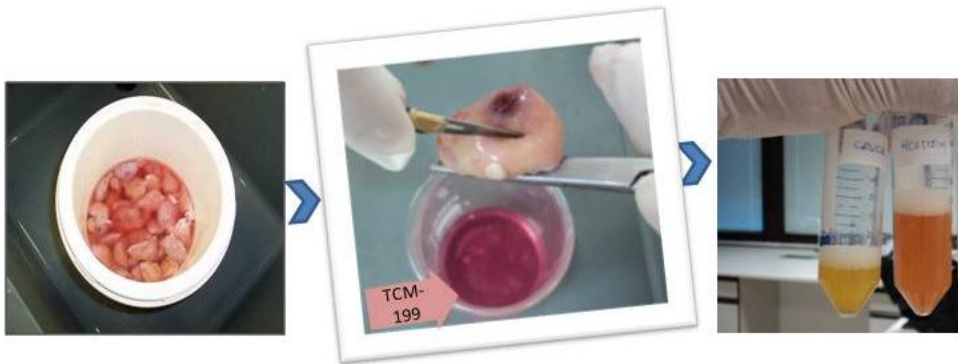


3.2. Técnica de Slicing:

La técnica de slicing consiste en seccionar longitudinalmente todos los folículos visibles de entre 2 a 8 mm con una hoja de bisturí (Das *et al.*, 1996). Para ello, los ovarios fueron secados en papel absorbente, posteriormente fueron fijados con una pinza hemostática por el extremo del hilio ovárico. A continuación los folículos grandes (> 8mm) (si los hubiera) eran seccionados y eliminados. El ovario fue secado nuevamente y se seccionaron todos los folículos visibles sobre un vaso de precipitado con 25mL de medio de lavado TCM-199 más heparina (0.4 UI/mL). Finalmente, el ovario fue sumergido en el medio y fue presionado sobre la pared

del vaso (Fig. 5). La muestra de ovocitos contenida en el vaso fue vertida a un tubo graduado para su precipitación.

Figura 5. Técnica de slicing para la recolección de ovocitos



En ambas técnicas, tras 15 minutos de precipitación, se procedió a tomar una muestra del fondo del tubo con una pipeta Pasteur. El volumen de la muestra a observar fue de 35mL. Posteriormente, la muestra fue depositada y extendida sobre una placa Petri, previamente rayada a modo de cuadrículas para facilitar el recuento. Al final se procedió a observar con una lupa estereoscópica (Nikon SMZ645) a 40X para su clasificación.

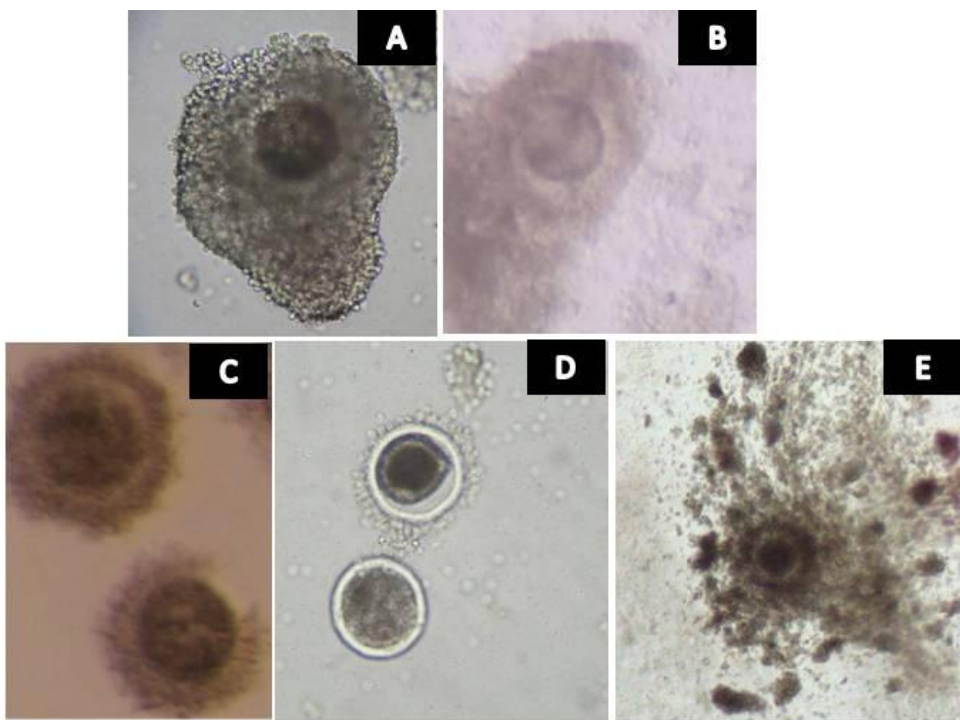
IV. CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS

La clasificación de los ovocitos recolectados fue determinada de acuerdo al número y compactación de las células del cúmulo, al grado de homogeneidad y al color del citoplasma, en cinco clases (Fig.6), según estudios previos (Loneragan *et al.*, 1991; Carolan *et al.*, 1992; Stojkovic *et al.*, 2001; Gordon, 2003):

- Categoría A: ovocitos con muchas capas compactas de células del cúmulo (>4), zona pelúcida bien definida y homogeneidad del citoplasma, (considerados muy competentes para la maduración *in vitro*).
- Categoría B: ovocitos con tres a cuatro capas compactas de células del cúmulo, zona pelúcida bien definida y homogeneidad del citoplasma, (considerados competentes para la maduración *in vitro*).

- Categoría C: ovocitos con menos de tres capas de células del cúmulo, y ovocitos rodeados con células del cúmulo en forma incompleta (>50%)-ovocito algo descubierto.
- Categoría D: ovocitos desnudos, se consideran ovocitos que no presentan células del cúmulo, y aquellos con muy pocas células del cúmulo a su alrededor (< 50%).
- Categoría E: ovocitos con cúmulo ya expandido.

Figura 6. Esquema de la categorización de ovocitos bovinos mediante observación en el estereoscopio.



A partir de esta clasificación hemos dividido en ovocitos de calidad superior, para aquellos ovocitos considerados como competentes o muy competentes para la maduración y fecundación *in vitro*, es decir a la suma de las categorías A y B. Por otro lado, ovocitos de calidad inferior, para aquellos que no se emplean en estos procesos, categorías C, D y E.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Influencia de la aptitud productiva y la técnica de recolección en la recuperación de ovocitos bovinos.

En este experimento se evaluó la posible influencia de la aptitud productiva del animal (carne o leche) y de la técnica de recolección de ovocitos (slicing o aspiración) sobre el rendimiento de los ovarios bovinos sacrificados en el matadero.

Procedimos con la recogida sistemática, una vez por semana, durante los meses de diciembre 2010 y enero-febrero 2011. En total realizamos diez recogidas, de las cuales recuperamos un total de 360 ovarios. La mitad de ellos correspondían a donantes de aptitud cárnica y la otra mitad a los de aptitud láctea. Cada uno de esos grupos fue dividido al azar en otros dos subgrupos para aplicar las dos técnicas de recuperación de ovocitos (Tab.2). Así mismo, se determinó el tiempo que lleva la ejecución de cada una de las técnicas.

Para evaluar el experimento se tomaron como indicadores el número y porcentaje de ovocitos totales recuperados, así como el número y porcentaje de ovocitos de cada categoría.

Por otra parte, para completar el estudio, se decidió cronometrar el tiempo empleado en la recuperación de los ovocitos con cada una de las técnicas, así como el número de ovocitos recuperados por unidad de tiempo en cada técnica (rendimiento de la técnica).

Tabla 2. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 1.

Aptitud	Técnica	Nº repet.	Nº ovarios	Total Ovarios
Cárnica	Aspiración	10	9	90
	Slicing	10	9	90
Láctea	Aspiración	10	9	90
	Slicing	10	9	90
Total		10	36	360

Experimento 2. Influencia del peso del ovario, la aptitud productiva y la fase del ciclo estral en la recuperación de ovocitos bovinos.

Este experimento fue diseñado con el objetivo de determinar la posible influencia del peso de los ovarios, de la aptitud productiva y de la fase del ciclo estral sobre la recolección de ovocitos. Por lo que, en la sala de sacrificio se recuperaron pares de ovarios en recipientes rotulados (bolsas) inmersos en SSF. Los pares de ovarios se separaron según la aptitud productiva del animal (carne o leche), y posteriormente en función de la fase del ciclo estral (lútea o folicular) (Tab.3). Los ovarios en anestro, con apariencias patológica o procedente de animales gestantes fueron desechados.

En el laboratorio, los pares de ovarios fueron pesados en una balanza, posteriormente los ovocitos fueron recolectados mediante la técnica de slicing y fueron evaluados con la ayuda de una lupa estereoscópica (Nikon SMZ645) a 40X.

Para evaluar el experimento se tomaron como indicadores el número y porcentaje de ovocitos totales recuperados, así como el número y porcentaje de ovocitos de cada categoría.

Tabla 3. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 2.

Aptitud	Fase del Ciclo	Nº repet.	Nº pares de ovarios	Total pares ovarios
Cárnica	Folicular	24	1	24
	Lútea	29	1	29
Láctea	Folicular	24	1	24
	Lútea	28	1	28
Total				105

Experimento 3. Influencia de la edad, fase del ciclo estral y peso de los ovarios en la recuperación de ovocitos bovinos.

Este ensayo fue diseñado para determinar la posible influencia de la edad y de la fase del ciclo estral sobre la recuperación de ovocitos bovinos. Este experimento sólo pudo realizarse en animales de aptitud cárnica, ya que en el matadero comercial en el que se realizó el estudio no se sacrificaban hembras bovinas jóvenes de aptitud lechera (Tab. 4). La recolección, transporte y selección de ovarios se realizó siguiendo las consideraciones detalladas al principio de este capítulo. Al igual que en el ensayo anterior, fueron desechados todos los ovarios con signos de encontrarse en anestro o con alteraciones patológicas visibles.

En el laboratorio, los pares de ovarios fueron pesados en una balanza, posteriormente los ovocitos fueron recolectados mediante la técnica de slicing y fueron evaluados con la ayuda de una lupa estereoscópica (Nikon SMZ645) a 40X.

Tabla 4. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 3.

EDAD (m)	Fase del Ciclo	Nº repet.	Nº par de ovarios	Total par ovarios
Novillas ≤ 12	Folicular	48	1	48
	Lútea	39	1	39
Adultas ≥ 24	Folicular	7	1	7
	Lútea	15	1	15
Total				109

Para evaluar el experimento se tomaron como indicadores el número y porcentaje de ovocitos totales recuperados, así como el número y porcentaje de ovocitos de cada categoría.

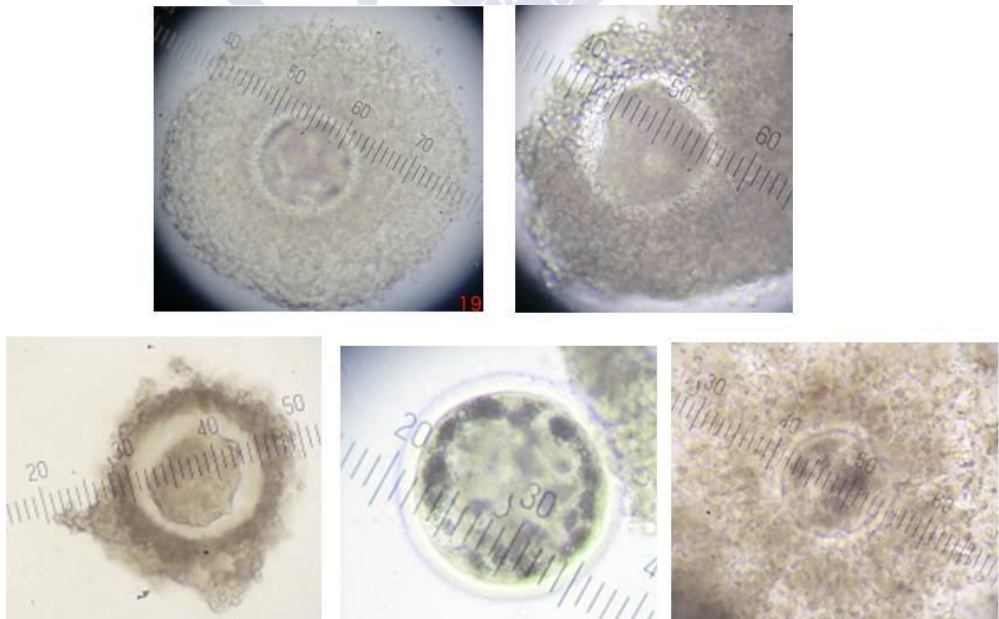
Experimento 4. Relación del diámetro del ovocito con la edad de los donantes de ovarios procedentes de matadero.

El presente trabajo fue realizado teniendo como base el procedimiento técnico de recogida de ovarios del tercer experimento, para lo cual se tomaron al azar un pool de ovocitos procedentes de ovarios de la misma edad y aptitud productiva y se les midió el diámetro a 10 de ellos (Tab.5). Para ello se empleó un microscopio eléctrico marca OLYMPUS con un ocular micrométrico graduado OLYMPUS WHK 10X/20 (Fig.7).

Tabla 5. Distribución de las variables y tamaño de muestra del Experimento 4.

EDAD (m)	Nº repet.	Nro. Ovocitos	Total Ovocitos
Novillas ≤ 12	2	10	20
Adultas ≥ 24	3	10	30
Total			50

Figura 7. Medida del diámetro (μm) de las distintas categorías de ovocitos (A, B, C, D y E).



VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El modelo lineal general (GLM) ha sido utilizado para analizar los datos de la influencia de los distintos factores (técnica de recuperación, aptitud productiva, fase del ciclo estral, y edad de los animales) y sus interacciones sobre el rendimiento de los ovarios, medidos en base a la cantidad (número total) y calidad (superior e inferior) de ovocitos recuperados. El test de Duncan sirvió como prueba de comparación múltiple de medias al observarse diferencia significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos. Para la influencia del peso de los ovarios se utilizó estadística descriptiva de medidas de tendencia central y de correlación de Pearson. Finalmente, para la tasa de rendimiento por categorías de ovocitos utilizamos la prueba de chi cuadrado (χ^2). El programa SPSS v19 sirvió para el procesamiento estadístico de los resultados.



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDADE DE SANTO TOMÁS DE COMPOSTELA'. The word 'RESULTADOS' is centered over the logo.

RESULTADOS

RESULTADOS

A continuación se presentará los resultados de cada uno de los experimentos, no sin antes dar a conocer que en todos los ensayos, referidos a la recuperación de ovocitos, la tasa de recuperación de ovocitos de calidad superior (clases A y B) fue siempre mayor a los de calidad inferior, independientemente de la aptitud productiva, la fase del ciclo estral, el peso de los ovarios o la edad de las donantes ($P < 0,01$) por lo que para evitar repetir continuamente sólo lo mencionaremos en el primer experimento.

Experimento 1. Influencia de la aptitud productiva y la técnica de recolección en la recuperación de ovocitos bovinos.

Este primer experimento fue diseñado para que sirviera de base a los siguientes ensayos. Por un lado evaluamos el posible efecto de la técnica de recolección sobre el número y la calidad de los ovocitos, cuyas conclusiones marcaron el diseño experimental de los siguientes trabajos. Por otro, tratamos de evaluar si se observaban diferencias en el número y calidad de los ovocitos en función de la aptitud productiva.

Nuestros resultados indican que el empleo de la técnica de slicing fue más eficaz que la técnica convencional de aspiración ($P < 0,05$) (Tab.6). De esta forma con el slicing se recuperaban casi dos veces más ovocitos que con la aspiración (11,2 vs 6,4 ovocitos). Otro resultado destacable es que mediante la técnica de slicing se recuperaron un mayor número de ovocitos de calidad superior (categorías A y B) que con la aspiración (7,1 vs 3,0 ovocitos)(Fig. 8).

En todas las experiencias realizadas, el porcentaje de ovocitos recuperados de calidad superior fue siempre mayor que los de calidad inferior ($P < 0,01$). Pero se debe destacar que cuando se empleaba la técnica de slicing el porcentaje de ovocitos de

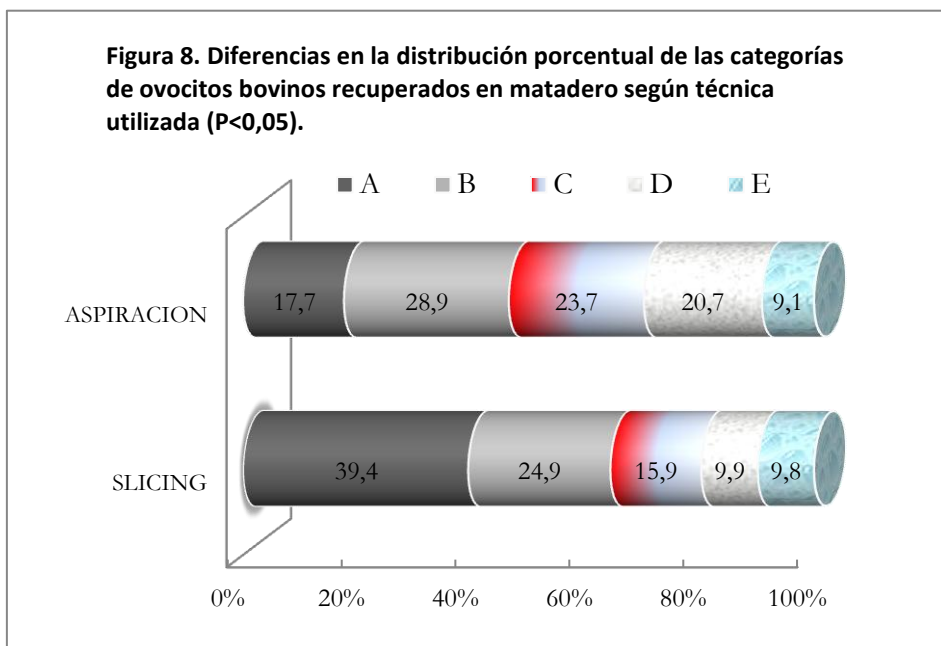
calidad superior era un 18% más elevado (64,3% vs 46,6%) que cuando se empleaba la aspiración (Tab.6, Fig.8).

Tabla 6. Producción de ovocitos bovinos por categorías según la aptitud productiva y la técnica utilizada para su recolección.

Aptitud	Técnica	Nº ovarios	Categoría de ovocitos ($\bar{X} \pm SD$ /ovario)					Total Ovocitos	
			A	B	C	D	E	Nº	($\bar{X} \pm SD$)
Cárnica	Aspiración	90	1,0±0,4 ^a	1,7±0,4 ^a	1,2±0,8 ^a	1,1±0,6 ^a	0,7±0,5 ^a	544	5,7±1,5 ^a
	Slicing	90	3,6±1,3 ^b	2,9±1,1 ^b	1,9±1,0 ^a	0,9±0,5 ^a	1,0±0,6 ^b	904	10,4±2,5 ^b
Lechera	Aspiración	90	1,3±0,4 ^a	1,8±0,7 ^a	1,8±1,6 ^a	1,6±1,0 ^a	0,5±0,3 ^a	637	7,1±3,0 ^a
	Slicing	90	5,3±2,6 ^b	2,8±1,7 ^b	1,7±1,1 ^a	1,3±0,7 ^a	1,2±1,1 ^b	1077	12,0±5,7 ^b
Total	Aspiración	180	1,2±0,4 ^a	1,8±0,6 ^a	1,5±1,3 ^a	1,3±0,9 ^a	0,6±0,4 ^a	1181	6,4±2,4 ^a
	Slicing	180	4,3±2,1 ^b	2,8±1,4 ^b	1,8±1,0 ^a	1,1±0,6 ^a	1,1±0,9 ^b	1981	11,2±4,3 ^b
	MediaTotal	360	2,7±2,2	2,3±1,2	1,7±1,1	1,2±0,7	0,8±0,7	3162	8,8±4,2

^{a,b} Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, P<0,05.

El análisis estadístico ha demostrado que no existen diferencias significativas atribuibles a la aptitud de los animales, observando una distribución muy similar (Tab.6).



A pesar de que, aparentemente, es notablemente más rentable emplear la técnica de slicing, ya que obtenemos una mayor número de ovocitos por ovario y un mayor porcentaje de ovocitos de calidad superior, se decidió evaluar el parámetro tiempo por si éste podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de aplicar esta técnica.

Para ello se cronometraron cada uno de los ensayos realizados, realizando un análisis estadístico de los mismos. Así, se comprobó que recuperar los ovocitos de un ovario mediante aspiración requería de 2'13" por término medio, mientras que si se empleaba el slicing se tardaba un minuto más (3'15").

Sin embargo, cuando se evaluaba el rendimiento de la técnica, es decir cuánto tiempo se empleaba para recuperar un ovocito, se comprobó que mediante el slicing sólo se necesitaban 18"/ovocito, mientras que este tiempo se incrementaba de forma significativa ($p < 0,05$) cuando se empleaba la aspiración (23").

Tabla 7. Resumen de las características de recuperación de ovocitos según técnica utilizada.

Técnica	Nº ovarios	Total ovocitos		Categoría ($\bar{X} \pm SD$ / ovar)		Rendimiento	
		Nº	$\bar{X} \pm SD$	Superior	Inferior	Min/ ovario	Seg/ ovocito
Aspiración	180	1181	6,4 \pm 2,4 ^a	3,0 \pm 0,7 ^a (47%)	3,4 \pm 2,1 ^a	2'13"	23" ^a
Slicing	180	1981	11,2 \pm 4,3 ^b	7,2 \pm 2,8 ^b (64%)	4,0 \pm 1,9 ^a	3'15"	18" ^b
Media Total	360	3162	8,8 \pm 4,2	5,1 \pm 3,0	3,7 \pm 2,0		20,4"

^{a,b} Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, P<0,05.

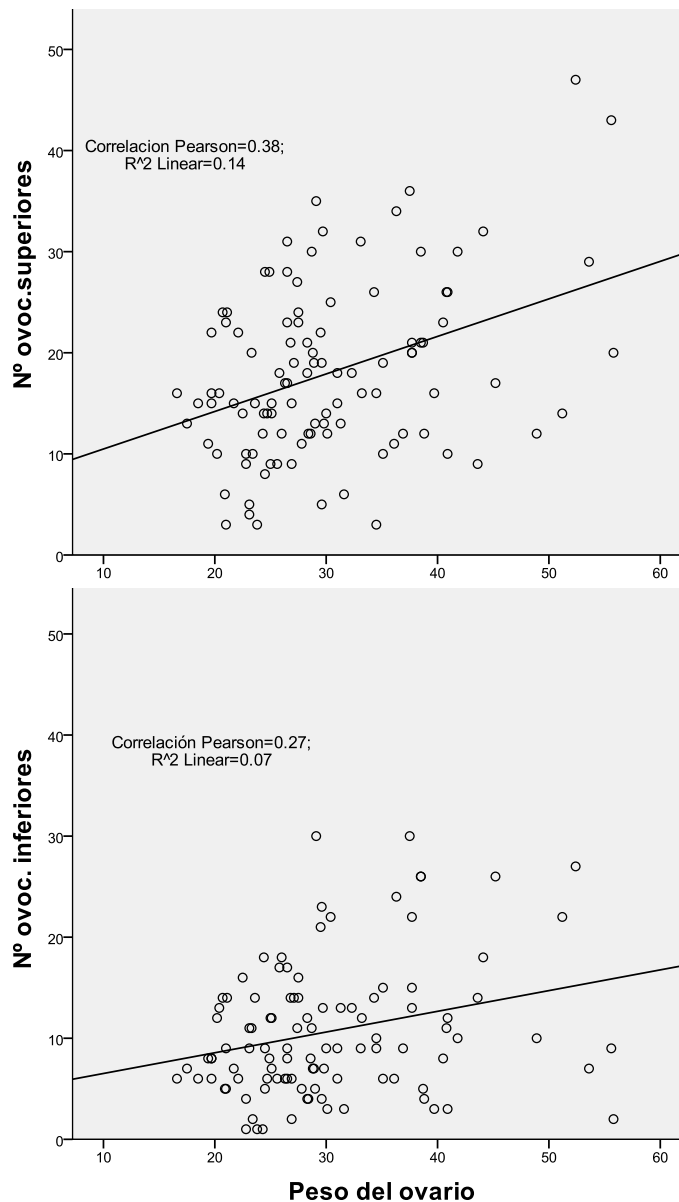
Experimento 2. Influencia del peso del ovario, la aptitud productiva y la fase del ciclo estral en la recuperación de ovocitos bovinos

Tras haber comprobado que la técnica de slicing parece ser la más adecuada para recuperar un mayor número de ovocitos y de mayor calidad, se diseñó este segundo experimento en el que intentamos valorar el efecto del peso de los ovarios, la fase del ciclo estral y la aptitud productiva sobre el número y calidad de los ovocitos recuperados. Se perseguía saber si era más rentable recoger en el matadero ovarios procedentes de una determinada fase del ciclo estral y de un tamaño determinado, o si por el contrario era indiferente. A pesar de que en el experimento previo no apreciamos diferencias significativas en función de la aptitud productiva de los animales, decidimos incluirla en este análisis para eliminar posibles efectos confusores.

El peso ovárico influyó estadísticamente en todos los parámetros evaluados (P<0,01), por lo que se incluyó en el modelo como cofactor para los sucesivos experimentos. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 9. Como se puede apreciar, según aumenta el peso del ovario, aumenta de forma lineal el número de ovocitos recolectados. Esta situación se produce tanto en los ovocitos de calidad superior como en los de calidad inferior

No hemos apreciado diferencias en cuanto al número y calidad de ovocitos recuperados en función de la fase del ciclo estral (P<0,05), tal y como se muestra en la Tabla 8.

Figura 9. Diferencias en la relación del peso del ovario (par) con el número de ovocitos recuperados según categorías superior o inferior ($P < 0,01$).



Tal y como se esperaba la aptitud productiva tampoco mostró ningún tipo de influencia ni sobre el número total ni sobre la calidad de los ovocitos recuperados ($P > 0,05$).

Además, tampoco se encontraron diferencias significativas de la interacción aptitud productiva por fase del ciclo estral (Tab.8).

Tabla 8. Producción de ovocitos recuperados según aptitud productiva y fase del ciclo estral en bovinos.

Factor	Ovarios (par)	Categoría ($\bar{X} \pm SD/\text{anim}$)		Total	
		Superior	Inferior	$\bar{X} \pm SD/\text{anim}$	Nº
Según aptitud^{ns}					
Carne	53	16,5 ± 8,2	10,9 ± 6,7	27,4 ± 13,2	1451
Leche	52	19,6 ± 8,8	10,5 ± 6,6	30,0 ± 13,4	1562
Según Fase^{ns}					
Folicular	48	17,5 ± 8,9	10,4 ± 6,3	27,9 ± 12,9	1341
Lútea	57	18,5 ± 8,3	10,9 ± 6,9	29,3 ± 13,7	1672
Media Total	105	18,0 ± 8,6	10,7 ± 6,7	28,7 ± 13,3	3013

ns: sin diferencia significativa dentro y entre factores.

Experimento 3. Influencia de la edad, fase del ciclo estral y peso de los ovarios en la recuperación de ovocitos bovinos

En la Comunidad Autónoma de Galicia, debido a condiciones de mercado peculiares se puede encontrar un elevado número de hembras bovinas sacrificadas con menos de 12 meses de edad. Por ello, se ha intentado evaluar la posibilidad de emplear este colectivo de individuos como donantes de ovocitos desde el punto de vista de rendimiento, tanto en número total como en calidad de los ovocitos recolectados.

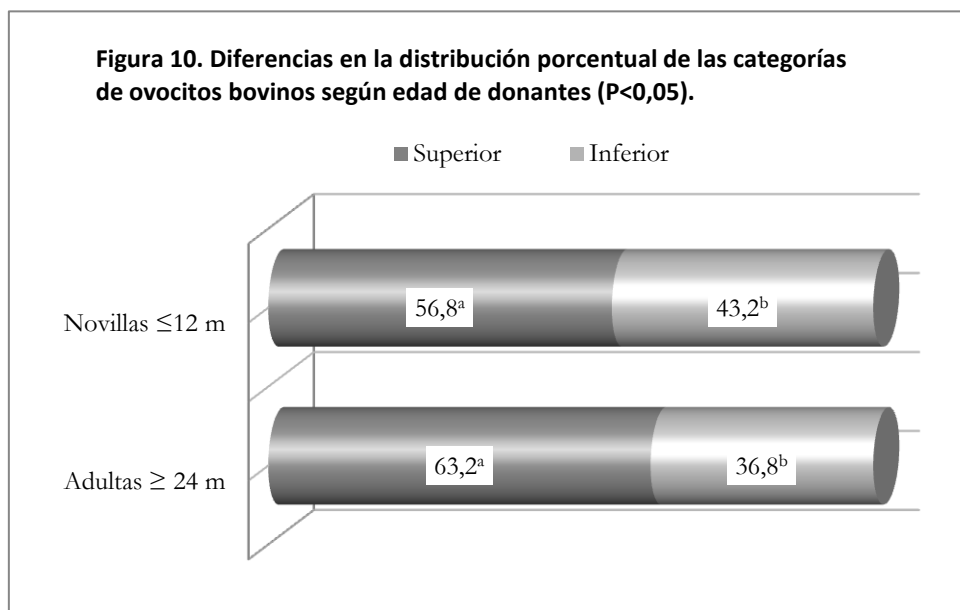
Este estudio fue realizado exclusivamente en animales de razas cárnicas, ya que, en el matadero en el que se realizó el estudio no se sacrificaban hembras de aptitud láctea jóvenes.

Así, se comprobó que se recuperaba un mayor número de ovocitos en los animales más jóvenes (29,3 vs 25,0), siendo estas diferencias significativas ($P < 0,05$). Sin embargo, cuando se estudiaban estas diferencias en función de la calidad de los ovocitos, se apreció que el número de ovocitos de calidad superior (es decir, madurables) era similar tanto en novillas como en hembras adultas (Tab.9 y Fig. 10). Por lo tanto, de los ovarios de novillas se recuperaban más ovocitos, pero la diferencia era debida a los ovocitos de calidad inferior (no madurables).

Tabla 9. Producción de ovocitos recuperados de bovino de carne sacrificados en matadero según edad de donantes.

DONANTES		Categoría, $\bar{X} \pm SD / \text{anim}$		Total ovocitos	
Edad(m)	N	Superior	Inferior	$\bar{X} \pm SD$	n
Novillas ≤ 12	87	16,7 \pm 12,5 ^a	12,7 \pm 8,6 ^a	29,3 \pm 19,5 ^a	2551
Adultas ≥ 24	22	15,8 \pm 10,2 ^a	9,2 \pm 8,4 ^b	25,0 \pm 17,3 ^b	549
Media Total	109	16,5 \pm 12,1	12,0 \pm 8,6	28,4 \pm 19,1	3100

^{a,b} Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $P < 0,05$.



Finalmente, no se apreciaron diferencias significativas en la interacción entre la edad y la fase del ciclo estral ni en el número total de ovocitos ni cuando se tenía en cuenta la calidad de los mismos (Tab.10).

Tabla 10. Producción de ovocitos recuperados de ganado de carne según edad y fase del ciclo estral.

Características de donantes			Categoría, $\bar{X} \pm SD/\text{anim.}$		Total
Edad (m)	Fases ^{ns}	N	Superior	Inferior	$\bar{X} \pm SD$
Novillas ≤ 12	Folicular	48	16,4 \pm 13,1	12,3 \pm 9,0	28,7 \pm 20,5
	Lútea	39	16,9 \pm 11,9	13,2 \pm 8,3	30,1 \pm 18,4
Vacas ≥ 24	Folicular	7	18,0 \pm 7,9	9,9 \pm 9,3	27,9 \pm 16,2
	Lútea	15	14,7 \pm 11,3	8,3 \pm 8,2	23,6 \pm 18,1

ns: sin diferencia significativa.

Experimento 4. Relación del diámetro del ovocito con la edad de las donantes de ovarios procedentes de matadero

Este último ensayo fue realizado empleando los ovocitos recolectados en el experimento anterior. El objetivo de este experimento era comprobar si la edad podría afectar al diámetro de los ovocitos.

Para ello hemos procedido a medir el diámetro de diez ovocitos recolectados en el experimento III, evaluando el posible efecto de la edad sobre el tamaño de los mismos.

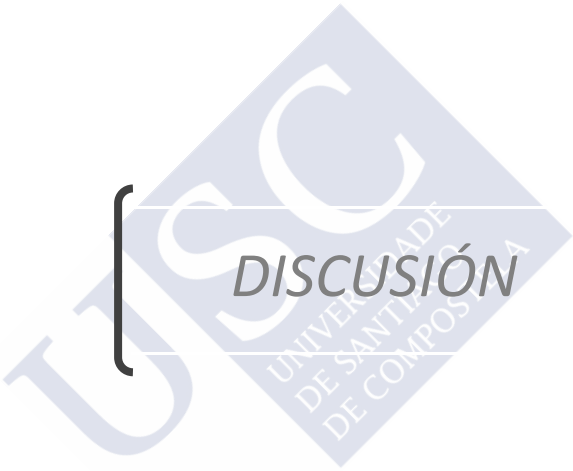
En todas las categorías (A, B, C, D y E) el diámetro de los ovocitos en vacas adultas son superiores a los de novillas ($P < 0.05$). Asimismo, en general, el rango en vacas adultas superan los 132 μm mientras que en novillas son inferiores (Tab.11).

Tabla 11. Diámetro (μm) de las distintas categorías de ovocitos bovinos de carne según la edad.

EDAD (m)	n	CATEGORÍAS DE OVOCITOS ($\bar{X} \pm \text{SD}$)					Media por Edad
		A	B	C	D	E	
Novillas ≤ 12	20	130,5 \pm 9,5 ^a	127,0 \pm 10,8 ^a	131,0 \pm 12,5 ^a	129,0 \pm 14,1 ^a	130,0 \pm 10,8 ^a	129,5\pm11,5^a
Adultas ≥ 24	30	138,0 \pm 14,5 ^b	136,7 \pm 13,5 ^b	141,3 \pm 8,6 ^b	138,3 \pm 12,3 ^b	141,3 \pm 10,1 ^b	139,1\pm12,0^b
Media Total	50	135,0 \pm 13,1	132,8 \pm 13,3	137,2 \pm 11,4	134,6 \pm 13,7	136,8 \pm 11,7	135,3 \pm 12,7

^{a,b} Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $P < 0,05$.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han producido numerosos cambios en los procedimientos utilizados para la PIV de embriones bovinos. Aunque la eficiencia de estas técnicas ha ido mejorando, tan sólo se ha logrado que el 30-40% de los ovocitos madurados *in vitro* evolucionen a blastocistos, mientras que en el caso de los madurados *in vivo*, y posteriormente sometidos a fecundación y cultivo *in vitro*, este porcentaje se sitúa en torno al 60% (Rizos *et al.*, 2002).

Es ampliamente aceptado que la calidad de los ovocitos es el principal factor que afecta a la producción de blastocistos en los sistemas de producción *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002). Además, la posterior morfología del embrión y su capacidad de desarrollo estarán relacionados con la posibilidad de que se establezca una gestación y en que pueda nacer un ternero vivo (Lindner y Wright, 1983).

En el ganado bovino una de las técnicas más empleadas para la obtención de ovocitos para FIV es el aprovechamiento de ovarios procedentes de animales sacrificados en mataderos comerciales. Este método permite disponer de gran cantidad de ovocitos de manera simultánea, por lo que resulta muy útil para producir un gran número de embriones de bajo coste.

Debe tenerse en cuenta que para un mejor aprovechamiento de este material biológico es necesario analizar los factores que podrían influir en el rendimiento y en la eficiencia de las técnicas de recuperación de los ovocitos, como un primer paso en la tecnología de producción de embriones *in vitro*.

Para ello, en este estudio fueron diseñados cuatro experimentos que permitieron comprobar la influencia de la técnica de recolección, la aptitud de los animales, la fase del ciclo estral, el peso de los ovarios y la edad de los animales en la recuperación de ovocitos a partir de ovarios recogidos en matadero.

I. LA TÉCNICA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

El primer experimento fue diseñado con el fin de determinar cuál sería el método de recolección más eficaz para recuperar mayor número de ovocitos y de elevada calidad. De esta forma, mediante el presente experimento se pudo comprobar que el empleo del slicing permitía recuperar casi el doble de ovocitos que la técnica convencional de aspiración (11,2 vs 6,4 ovocitos).

La mayor eficacia de esta técnica ya había sido puesta de manifiesto en diversas especies, como vacunos (Hamano y Kuwayama, 1993; Carolan *et al.*, 1994; Hernández-Fernández *et al.*, 2010), en caprinos (Martino *et al.*, 1994; Pawshe *et al.*, 1994), en ovinos (Wani *et al.*, 2000; Shirazi *et al.*, 2005; Petrean *et al.*, 2010) y en búfalas (Das *et al.*, 1996)

Este mayor rendimiento obtenido mediante el slicing podría deberse a que esta técnica no solo permite recuperar los ovocitos a partir de los folículos superficiales, sino también de aquellos ubicados en áreas más profundas de la corteza-estroma (Das *et al.*, 1996). Este hecho permitiría duplicar la recuperación de ovocitos si se compara con aquellos recolectados en una sola zona (Arlotto *et al.*, 1996). Por lo tanto, el menor rendimiento de la aspiración, respecto del slicing, podría deberse a que en la aspiración sólo se recuperarían los folículos observables en la superficie ovárica, mientras que el slicing permitiría recuperar también los que se encuentran debajo de la corteza (Pawshe *et al.*, 1994). Evidentemente esta técnica sería la más indicada cuando tratásemos de recuperar el mayor número posible de ovocitos en hembras de elevado valor genético.

Gordon (2003) propuso la combinación de ambas técnicas, una aspiración folicular preliminar seguida de un slicing, para mejorar la eficacia individual de cada una de las técnicas, sin embargo no fue capaz de observar ninguna mejoría ni en el número de ovocitos recuperados ni en la calidad de los mismos respecto al slicing.

En este sentido nuestros resultados con el slicing son semejantes a los descritos por Hernández-Fernández *et al.*, (2010), pero inferiores a Suss *et al.*, (1988), y Carolan *et al.*, (1994). Probablemente estas diferencias se deban a que estos autores eliminaron el cuerpo lúteo antes de proceder a la disección del ovario y esta práctica podría aumentar el número de ovocitos recuperados al contar con una mayor superficie de corte.

En nuestro experimento también se recuperaron un menor número de ovocitos que Hamano y Kuwayama (1993). Sin embargo, estos autores utilizaban la técnica de "cutting", una modificación del slicing, consistente en cortar la superficie y el interior

del ovario con un set de 10 cuchillas separadas cada 2 mm, con lo que se consigue la recuperación de ovocitos de todo el ovario.

Por otro lado, en este experimento también se pudo comprobar que mediante el slicing se recuperaba mayor número de ovocitos de alta calidad (categorías A y B), los que se podrían considerar ovocitos con capacidad para madurar. De esta forma, en nuestro estudio obtuvimos que el 64,3% de los ovocitos recuperados mediante el slicing eran de calidad superior. Sin embargo, esta cifra disminuía hasta el 46,6% cuando se empleaba la aspiración como técnica de recuperación. La posible explicación a estas diferencias, podría deberse en gran medida a que los ovocitos recuperados mediante slicing no sufren traumas significativos que provoquen la destrucción de las células del cúmulo, lo cual es inevitable con la técnica de aspiración. Así, la aspiración provoca fricciones con los bordes internos de la aguja ocasionando mayor destrucción de las células del cúmulo y por ello menores tasas de ovocitos de calidad superior. Existen estudios que se han centrado en evaluar el impacto del diámetro de la aguja, del tamaño de la jeringa y de la presión empleada en la aspiración (Fry *et al.*, 1997), ya que todos estos factores condicionan la calidad de los ovocitos recuperados mediante esta técnica.

Por lo tanto, en términos de eficiencia (tasa de recuperación de ovocitos de calidad superior), la técnica del slicing arrojó resultados semejantes a Hernandez-Fernandez *et al.*, (2010) y superiores a Carolan *et al.*, 1994.

Una vez determinado que mediante el slicing se conseguía un excelente rendimiento y eficiencia en ovarios recuperados en el matadero, se estudió si el tiempo necesario para realizar esta técnica podría llegar a ser un factor limitante.

Así, por un lado se cuantificó el tiempo necesario para recuperar los ovocitos de un ovario mediante las dos técnicas de recolección (aspiración y slicing), y por el otro se evaluó el tiempo requerido para recuperar un ovocito.

En términos de eficiencia en función del tiempo invertido, la aspiración de los ovocitos visibles en un ovario requirió de 2'13'', casi un minuto menos que el utilizado en realizar el slicing (3'15''), sin ser estas diferencias significativas. Con estos datos, no parece que el factor tiempo pudiese condicionar el empleo de esta técnica.

Además, cuando se profundizaba en el estudio de este factor y evaluábamos cuanto tiempo se empleaba para recuperar un ovocito con cada técnica, se comprobó que el slicing era significativamente más eficaz que la aspiración ya que sólo se necesitaban de 18 segundos para recuperar un ovocito, mientras que en el caso de la aspiración se empleaba una media de 23 segundos. Estas diferencias eran debidas a

que la técnica de slicing permitía recuperar el doble de ovocitos por ovario y tan sólo se necesitaba un minuto más para realizarlo.

Por todo ello, desde un punto de vista práctico el empleo del slicing es más eficaz tanto en el número de ovocitos recuperados como en la calidad de los mismos. Además, el mayor tiempo requerido para recuperar los ovocitos de un ovario mediante el slicing queda diluido cuando evaluamos el tiempo necesario para recuperar cada ovocito

II. LA APTITUD PRODUCTIVA

A lo largo de los experimentos uno y dos se evaluó la posible influencia de la aptitud productiva sobre la recuperación de ovocitos de ovarios recogidos en mataderos comerciales. Debe tenerse en cuenta que cuando se habla de aptitud productiva este concepto no sólo indica la capacidad genética de los animales para tener una determinada producción (carne o leche), sino que también engloba las diferencias de manejo a la que están sometidos los animales en función de su producción (animales productores de leche en regímenes intensivos, frente a animales no ordeñados criados en regímenes semi-extensivos).

Existen discrepancias en cuanto a la existencia de diferencias en el rendimiento reproductivo entre vacas de aptitud cárnica y lechera (Oltenucu *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2004) que parecen indicar una mejor fertilidad en las razas de aptitud cárnica. Además en las últimas décadas se ha detectado un marcado descenso en la fertilidad en las hembras lecheras (Lucy, 2001; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008). No se sabe si estas diferencias están causadas por factores intrínsecos que afectan al potencial reproductivo de los animales o si esos cambios pueden ser debidos a nuevas situaciones de manejo provocadas por el aumento del tamaño de los rebaños (Abraham *et al.*, 2012). Además, hay pocos estudios que comparan el número y la calidad de ovocitos recuperados de ovarios en las distintas razas de ganado bovino.

Por ello, la hipótesis de trabajo era que el ganado de aptitud cárnica, criado generalmente en forma semi-extensiva, en pastoreo, y a priori, sometido a menor estrés metabólico, podría presentar diferencias en el desarrollo folicular respecto de las hembras de aptitud lechera, y este hecho podría influir en el número y/o calidad de los ovocitos recuperados.

Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado ningún tipo de influencia de la aptitud sobre la recuperación de los ovocitos, ni sobre el número de ovocitos

recolectados ni sobre la calidad de los mismos; estos hallazgos están de acuerdo con lo descrito por Abraham *et al.* (2012). Ya en 1990, Lonergan describía que parecía existir una marcada uniformidad en el número de ovocitos encontrados en distintas razas bovinas europeas.

Sin embargo, ciertos estudios indican que la raza debería ser tenida en cuenta, ya que se aprecian diferencias atribuibles a ella en el desarrollo embrionario temprano durante la producción de embriones *in vitro* (Abraham *et al.*, 2012), que podrán atribuirse a diferencias en la calidad de los ovocitos.

Por ello, a pesar de que la aptitud productiva no resultó significativa, se decidió mantener este factor en los siguientes experimentos para eliminar el posible efecto sobre otras variables.

III. EL PESO DE LOS OVARIOS

La relación existente entre el ovario, sus gametos y la fertilidad de la hembra es un supuesto de muchos años en la biología reproductiva (te Velde y Pearson, 2002). Por ello, se consideró conveniente estudiar la influencia del peso de los ovarios (como reflejo del tamaño de los mismos) en la capacidad de recuperación de ovocitos.

Los ovarios recuperados de matadero para este estudio presentaron un peso medio de $28,695 \pm 13,66g$, no apreciando diferencias ni en función de la fase del ciclo estral ni en función de la aptitud productiva. Sin embargo, el análisis de resultados permitió comprobar la existencia de diferencias significativas en relación al peso de los ovarios respecto a la recuperación de ovocitos, tanto en el número total de ovocitos como por categorías. Una relación semejante fue descrita también por otros autores (Erickson, 1966b; Cushman *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2005) cuando relacionaban el tamaño de los ovarios bovinos con el número de folículos.

También encontramos una tendencia lineal de relación directa entre peso de ovarios y número de ovocitos de calidad superior e inferior (Fig.9). Situación semejante fue descrita por Palma *et al.*, (2008) e Ireland *et al.*, (2011), quienes indicaron que los ovarios más pequeños tienen bajo número de folículos antrales y una disminución marcada del número total de folículos y ovocitos morfológicamente útiles. La situación opuesta fue descrita cuando se trataba de ovarios grandes. A priori, parece fácilmente justificable, ya que si en el macho una mayor circunferencia escrotal se relaciona con mayor cantidad y calidad de los espermatozoides (Gipson *et al.*, 1985), una situación similar debería producirse con los ovarios de mayor tamaño.

Este aspecto cobra una gran importancia práctica, puesto que podemos inferir que a mayor peso de los ovarios se recogerá mayor cantidad de ovocitos y de mejor calidad. Es decir que, independientemente de la fase del ciclo estral o de la aptitud productiva del animal, a la hora de elegir ovarios es importante tener en cuenta el tamaño de los mismos.

Por todo ello y para evitar este sesgo, el peso fue introducido como cofactor en los experimentos dos y tres. Debe tenerse en cuenta que al introducir como cofactor el peso del ovario permite observar más claramente la ausencia de efecto de la fase del ciclo estral, ya que de no hacerlo, es posible que los ovarios que presentasen cuerpo lúteo pudiesen presentar una mayor cantidad de ovocitos recolectables.

IV. LA FASE DEL CICLO ESTRAL

Otro de los factores que parece influir sobre la competencia de los ovocitos es la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la hembra, aunque generalmente este aspecto no se tiene en cuenta a la hora de recolectar ovocitos (Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; Sirard *et al.*, 2006).

Previo a la discusión de nuestros experimentos 2 y 3 debemos aclarar que hubo mayor cantidad de animales que presentaban una estructura luteínica en el momento de recolectar los pares de ovarios. Esto era esperable debido a la mayor duración de esta fase con respecto a la folicular.

Algunos trabajos afirman que la presencia del cuerpo lúteo en los ovarios reduce número y/o calidad de los ovocitos recolectados (Moreno *et al.*, 1992; Wani *et al.*, 1999). Del mismo modo que la fase del ciclo estral tiene una clara influencia sobre la capacidad de los ovocitos (Hagemann *et al.*, 1999; Nagai, 2001). Esta capacidad está relacionada con el potencial del ovocito para completar con su crecimiento y maduración, llevar a cabo la meiosis y evolucionar a blastocisto. Por lo que, para el presente experimento se ha sugerido que la fase del ciclo estral podría influir en el número y la calidad de los ovocitos recolectados.

A la luz de nuestros resultados la fase del ciclo estral no parece influir ni en la cantidad ni en la calidad de ovocitos recuperados. Esto nos indica que, a pesar del espacio que ocupan el (los) cuerpo(s) lúteo(s) durante la fase lútea en gran parte del ovario y a la acción de inhibición ejercida por la progesterona sobre el crecimiento de los folículos (Rahe *et al.*, 1980; Walters *et al.*, 1984), el número de ovocitos recuperados mediante slicing durante esta fase no se vió afectado.

Sin embargo, para Salomone *et al.*, (1999), la fase de crecimiento folicular (días 1-3 del ciclo estral) presentan mayor cantidad y calidad de recuperación de ovocitos que en la fase regresiva del desarrollo folicular (días 5-6). Es de entender que el planteamiento es distinto, estos autores realizan un seguimiento detallado de los ovarios de los animales, estudiando la oleada de crecimiento folicular. Sin embargo, esta opción no es aplicable cuando se trata de ir al matadero para obtener los ovarios que nos permitan recuperar los ovocitos para el sistema de producción de embriones *in vitro*, sin disponer de información previa de los animales.

Nuestros resultados confirman lo descrito por Suss *et al.*, (1988) quienes no encontraron correlación entre CCOs y la fase del ciclo estral. Por lo que, en términos prácticos en la rutina de laboratorio de conseguir ovarios para someter ovocitos a la FIV, da igual la fase del ciclo estral en la que se encuentre los ovarios obtenidos del matadero.

V. LA EDAD

Al analizar este factor, debemos destacar que diversos autores sospechan que la edad juega un papel importante en la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos, pero aún está poco claro si existen diferencias en la calidad de los ovocitos en función de la edad de los animales (Presicce *et al.*, 1997; Rizos *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012).

Presicce *et al.* (1997) describieron que las novillas prepúberes (5, 7 m de edad) producen mayor número de ovocitos de calidad (tipos A y B), pero que presentan una menor capacidad para su posterior desarrollo a blastocisto comparado con las adultas. Y de otro lado aquellas pospuberales (11 m) tienen una capacidad de desarrollo similar a las de adultas (40 vs 45% respectivamente).

La utilización de animales jóvenes como fuente de ovocitos constituye un área de mucho interés para la producción de embriones debido a la ventaja que resulta acortar el intervalo generacional, con la consecuente aceleración de la tasa de ganancia genética (Lohuis, 1995; Duby *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1998). Motivo por el cual en el tercer y cuarto ensayo se decidió comparar los ovocitos de novillas con animales adultos.

En nuestro estudio hemos empleado exclusivamente hembras de aptitud cárnica, debido a que en la CCAA de Galicia se sacrifica un importante número de animales de aptitud cárnica de menos de 12 meses de edad. Este colectivo podría ser una fuente

interesante y económica para la obtención de ovocitos, por lo que se decidió evaluar esta posibilidad. Debemos justificar que este estudio no se ha realizado en hembras de aptitud láctea porque el porcentaje de animales sacrificados pertenecientes a ese rango de edad era prácticamente despreciable.

Hemos recuperado mayor cantidad de ovocitos en las novillas que en las vacas adultas. Estos resultados concuerdan con las evidencias mostradas en bovinos (Erickson, 1966 a,b), porcino (Black y Erickson, 1968), ovino (McNatty *et al.*, 1995; Steckler *et al.*, 2005), cabras (Martino *et al.*, 1994; Pawshe *et al.*, 1994) y seres humanos (Lobo, 2003). Esta relación ciertamente es evidente toda vez que a medida que transcurre la edad existe una tendencia a la disminución por degeneración o atresia folicular del pool de folículos con que nace cada especie.

A pesar de ello, cuando se profundiza en el estudio se aprecia que las diferencias son debidas al número de ovocitos de baja calidad. Es decir, no se aprecian diferencias significativas entre las hembras jóvenes y las vacas adultas en el número ovocitos transferibles (de alta calidad), por lo que las diferencias encontradas son debidas a que las novillas tienen un mayor número de ovocitos de baja calidad que las hembras adultas.

Estas diferencias podrían ser debidas al propio crecimiento folicular que tienen los animales prepúberes y púberes cuyos ovocitos experimentan notables cambios ultra estructurales durante la fase de crecimiento. La fase de crecimiento del ovocito incluye una serie de cambios de organelas e inclusiones, como también un periodo de transcripción del ovocito, las cuales son necesarias para que el ovocito logre las capacidades para reanudar la meiosis y el correspondiente desarrollo (Hyttel *et al.*, 1986).

De otro lado nuestros resultados permitieron definir que no existen diferencias en la interacción de edad por fases del ciclo estral para ovocitos totales y ni de los de mejor calidad (Tab.10), lo cual indica que para efectos de MIV-FIV es indiferente la fase, por lo que sería inútil invertir esfuerzos en separar ovocitos de los ovarios correspondientes a cada fase.

VI. EL DIÁMETRO DEL OVOCITO

La medida del diámetro ovocitario puede ser una herramienta práctica para seleccionar ovocitos competentes, y de considerable importancia cuando se trata de colectar a partir del pool de folículos (Hyttel *et al.*, 1997; Otoi *et al.*, 1997). Para Hyttel

et al.(1997) los ovocitos adquieren plena capacidad para completar la maduración meiótica a MII y soportar el desarrollo embrionario cuando superan los 110 μm . Por su parte, Otoi *et al* (1997) consideran que la capacidad meiótica se adquiere a partir de los 115 μm , y la capacidad de desarrollo para llegar a blastocisto la adquieren a partir de las 120 μm . Este es el motivo por el que algunos estudios seleccionan sus ovocitos a partir esta medida (Eppig *et al.*, 1998; Albarracín, 2005).

Aparentemente, los ovocitos de más de 120 μm ya han culminado la síntesis de ARN y están caracterizados por la presencia de cromatina altamente condensada, encapsulado en un nucléolo fibrilar electrodenso dentro de un núcleo periféricamente localizado (Fair *et al.*, 1996). Estos hechos parecen estar estrechamente relacionados con la transcripción del ARN y con el logro de las capacidades del ovocito (Fair *et al.*, 1995).

En el apartado anterior se comprobó que desde un punto de vista del rendimiento se podrían emplear como donantes de ovocitos hembras de menos de 12 meses de edad. Sin embargo, a pesar de que aparentemente la calidad de los ovocitos era similar, se decidió investigar si existían diferencias en el diámetro de los ovocitos, como un posible indicador de la competencia para el desarrollo de los mismos.

Así, el experimento cuatro confirmó que, en nuestro estudio, el diámetro de los ovocitos de las novillas era significativamente más pequeño que el de las vacas adultas.

En nuestro estudio el diámetro medio de los ovocitos de las hembras jóvenes era de 129,5 μm significativamente más pequeño que los de las hembras adultas (139,1 μm). Debemos indicar que nuestros resultados en vacas adultas son semejantes a lo encontrado por Carolan *et al.*, (1994). Es lógico pensar que el diámetro del ovocito vaya aumentando en relación al incremento del número y tamaño de las organelas y las inclusiones de su citoplasma. Así lo ha confirmado Hyttel *et al.*, (1997) al encontrar que en el citoplasma, un número de organelas e inclusiones como el complejo de golgi, retículo endoplásmico liso, gotas de lípidos y delimitadas vesículas de membrana, se están desarrollando gradualmente y sometiéndose a una dislocación periférica. Así, aparecen ciertas estructuras específicas de los ovocitos en el folículo secundario como gránulos corticales y de la zona pelúcida. También, hacia el final del crecimiento ovocitario aparece la cresta mitocondrial (Hyttel *et al.*, 1997).

Otro hecho destacable es que los ovocitos de las novillas superan ampliamente los 120 μm de diámetro, cifra considerada por muchos autores como determinante para la futura competencia de los ovocitos. Este hecho apoyaría el empleo de estas hembras jóvenes como donantes de ovocitos para la fecundación *in vitro*.

A pesar de que las pruebas realizadas en nuestro estudio son favorables al empleo de las hembras entre 7 y 12 meses de edad, deberían realizarse más estudios que envuelvan la maduración, fecundación y transferencia que confirmen esta hipótesis.



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'. The word 'CONCLUSIONES' is centered within this watermark, enclosed in large black square brackets. The text 'CONCLUSIONES' is in a bold, black, sans-serif font.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La técnica slicing para la recuperación de ovocitos de ovarios procedentes de matadero es más eficiente que la técnica de aspiración. Con la técnica slicing se obtienen más ovocitos y de mejor calidad. A pesar de que el procedimiento de slicing parece ser más lento, esta técnica aumenta la eficiencia del proceso, ya que obtenemos mayor número de ovocitos de calidad superior (más capacitados para la maduración) por unidad de tiempo.
2. La aptitud productiva de los animales no influye en la recuperación de ovocitos ni en la cantidad ni en la calidad.
3. El peso condiciona la cantidad y la calidad de los ovocitos recuperados. Los ovarios de mayores dimensiones incrementan el rendimiento de la técnica del slicing.
4. La fase del ciclo estral en la que se encuentran los animales no influye sobre la recuperación de ovocitos cuando se emplea el slicing.
5. Aparentemente se pueden emplear hembras jóvenes sacrificadas en matadero como donantes de ovocitos ya que la edad no influye en la calidad de los ovocitos recuperados.
6. A pesar de que el diámetro de los ovocitos recuperados en las hembras jóvenes era inferior al de las vacas adultas, su tamaño es superior a las cifras consideradas como límite para asegurar la competencia. A pesar de ello, sería necesario realizar pruebas de maduración, fecundación y transferencia que demuestren que se pueden emplear de forma rutinaria en FIV.



*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**A_**

- Abdoon, A.S.S., Kandil, O.M., 2001. Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. *Reproduction, Nutrition and Development* 41, 71-77.
- Abraham, M.C., Gustafsson, H., Ruete, A., Brandt, Y.C.B., 2012. Breed influences on in vitro development of abattoir-derived bovine oocytes. *Acta Vet. Scand.* 54, 36.
- Adams, G., Matteri, R., Kastelic, J., Ko, J., Ginther, O., 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177-188.
- Adams, G., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72-80.
- Adashi, E.Y., 1998. The IGF family and folliculogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 39, 13-19 (Abst).
- Albarracín, M.J. , 2005. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica de Open Pullen Straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis UBA. Fac. Veterinaria .
- Albertini, D.F., Sanfins, A., Combelles, C.M.H., 2003. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive biomedicine online* 6, 410-415 (Abstr).
- Alila, H., Dowd, J., Corradino, R., Harris, W., Hansel, W., 1988. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *J. Reprod. Fertil.* 82, 645-655.
- Anderson, E., Albertini, D.F., 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* 71, 680-686.
- Apter, D., 1997. Development of the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 816, 9-21.

Arav, A., 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55, 1561-1565.

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

Armstrong, D., 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55, 1303-1322.

Auletta, F.J., Flint, A.P.F., 1988. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates, and women especially in relation to the time of luteolysis. *Endocr. Rev.* 9, 88-105 (Abst).

B_

Bagavandoss, P., Midgley, A., Wicha, M., 1983. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 31, 633.

Ball, G., Bellin, M., Ax, R., First, N., 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28, 113-122 (Abstr).

Berardinelli, J., Dailey, R., Butcher, R., Inskeep, E., 1979. Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 49, 1276.

Berardinelli, J., Dailey, R., Butcher, R., Inskeep, E., 1980. Source of circulating progesterone in prepubertal ewes. *Biol. Reprod.* 22, 233-236.

Black, J.L., Erickson, B.H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat. Rec.* 161, 45-55 (Abst).

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

Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., Sirard, M.A., 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 66, 38.

Bols, P., Goovaerts, I., Leroy, J., 2007. From retrieval to blastocyst culture: following the individual oocyte.

Brower, P.T., Schultz, R.M., 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.* 90, 144-153.

Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54-62.

Byskov, A.G., Nielsen, M., 2003. Ontogeny of the mammalian ovary. *Biology and Pathology of the Oocyte*, 13-28.

C_

Canipari, R., 2000. Oocyte-granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update* 6, 279-289.

Carolan, C., Monaghan, P., Mehmood, A., Lonergan, P., Gallagher, M., Gordon, I., 1992. Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. *J. Reprod. Fertil.* 9, 51.

Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M., Gordon, I., 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41, 1061-1068.

Carroll, J., Jones, K.T., Whittingham, D.G., 1996. Ca²⁺ release and the development of Ca²⁺ release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Rev. Reprod.* 1, 137-143.

Cheung, A., Swann, K., Carroll, J., 2000. The ability to generate normal Ca²⁺ transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocyte growth and maturation. *Human Reproduction* 15, 1389-1395.

Choi, J.K., Lee, J.H., Lee, S.T., Choi, M.H., Gong, S.P., Lee, E.J., Lim, J.M., 2007. Developmental competence of intrafollicular oocytes derived from preantral follicle culture with different protocols after parthenogenetic activation. *Asian Australas J Anim Sci* 20, 1190.

Choi, M.H., Gong, S.P., Lim, J.M., 2008. Retrieval of porcine ovarian follicles by different methods. *Asian Australas J Anim Sci.* 21, 353.

Conn, P., 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu. Rev. Med.* 45, 391 (Abst).

Cushman, R.A., De Souza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H., 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro-and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60, 349-354.

D_

Dadashpour Davachi, N., Kohram, H., Zainoaldini, S., 2012. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research* 102, 37-42.

Das, G.K., Jain, G.C., Solanki, V.S., Tripathi, V.N., 1996. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology* 46, 1403-1411.

Day, M.L., Anderson, L.H., 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. *J. Anim. Sci.* 76, 1-15.

De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., Kruip, T.A.M., 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24, 197-204 (Abstr).

De los Reyes, M., Aguayo, J., Del Campo, H., Barros, C., 1999. Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avances en Cs Vet (U. de Chile)* 14, 42-53.

De Sousa, P., Caveney, A., Westhusin, M., Watson, A., 1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 49, 115-128.

Dell'Aquila, M., Cho, Y., Minoia, P., Traina, V., Lacalandra, G., Maritato, F., 1997. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12, 2766-2772.

Driancourt, M.A., 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35, 55-79.

Driancourt, M.A., Webb, R., Fry, R.C., 1991. Does follicular dominance occur in ewes? *J. Reprod. Fertil.* 93, 63-70.

Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.

Duby, R., Damiani, P., Looney, C., Fissore, R., Robl, J., 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45, 121-130.

Dunbar, B., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S., Wilkins, B., 1994. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reproduction, fertility and development* 6, 331-347.

E_

Edwards, R.G., 1974. Follicular Fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 37, 189-219.

Edwards, R.G., 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208, 349-351 (Abstr).

Epifano, O., Dean, J., 1994. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reproduction, fertility and development* 6, 319-330 (Abstr).

Eppig, J.J., 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, fertility and development* 8, 485-489 (Abstr).

Eppig, J.J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M.J., Pendola, F.L., Watanabe, S., Wigglesworth, K., 1997. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum. Reprod.* 12, 127-132.

Eppig, J.J., O'Brien, M., Wigglesworth, K., 1998. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 260-273.

Eppig, J.J., Hosoe, M., O'Brien, M.J., Pendola, F.M., Requena, A., Watanabe, S., 2000. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 109-116.

- Eppig, J.J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838.
- Erice, I., Gil, L., Josa, A., Echegaray, A., Martinez, F., Espinosa, E., 1998. Effect of mare's age and recovery methods on the recovery rate of equine follicular oocytes for IVM procedures. *Theriogenology* 49, 735-741.
- Erickson, B.H., 1966a. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 11, 97.
- Erickson, B.H., 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25, 800.
- Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A., Hofeditz, C., 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6, 371-399.
- Espey, L.L., 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 233-238.
- Evans, A., Fortune, J., 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138, 2963-2971.
- Evans, A., 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 240-246.

F_

- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T., 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 437-442 (Abstr).
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M., 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 503-512.
- Fair, T., Hulshof, S., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M., 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol.* 195, 327-336 (Abst).

- Farnworth, P., 1995. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J. Endocrinol.* 145, 387-395 (Abstr).
- Faure, R., Morales, C., 2003. La pubertad de la hembra bovina: I. Aspectos fisiológicos. *Rev. Salud Anim.* Vol 25, 13-19.
- Ferguson, E.M., Leese, H.J., 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.* 116, 373-378.
- Ferguson, E.M., Leese, H.J., 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1195-1201.
- Ferreira, J.L., Toniolli, R., Graça-Duarte, A., Campagnari, F., Padovez, B., 2002. Relative expression of insulin like growth factor I (IGF-I) and follicle stimulating hormone receptor (FSHR) in follicles and ovarian tissue from *Bos primigenius indicus* (Nelore). *Braz J Vet Res anim* 39, 208-212.
- Figueiredo, J.R., Hulshof, S., Van den Hurk, R., Ectors, F., Fontes, R., Nusgens, B., Bevers, M., Beckers, J.F., 1993. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 40, 789-799 (Abst).
- Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F., Crowe, M.A., 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 163-169.
- Fortune, J., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50, 225-232.
- Fortune, J., Rivera, G., Evans, A., Turzillo, A., 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65, 648-654.
- Foster, D.L., Yellon, S.M., Deborah, H., 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 327-344.
- Foster, D.L., Jackson, L.M., 1994. Puberty in the sheep. *The physiology of reproduction* 2, 411-451.

- Frandsen, R., Wilke, W.L., Fails, A.D. , 2003. Anatomy and physiology of farm animals. Willey-Blackwell. 7th ed .
- Fry, R., Niall, E., Simpson, T., Squires, T., Reynolds, J., 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47, 977-987.
- Fukuda, Y., Enari, N., 1993. Developmental ability of in vitro matured-in vitro fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogeneous ooplasm. *Proc. 7th World Conf on Anim Prod.* 2, 276-277.
- Fukui, Y., Sakuma, Y., 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 22, 669.
- Fulka, J.J., First, N.L., Moor, R.M., 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 41-49.
- G_**
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G., 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55, 1341-1357.
- García, R.F., Limia, O.F., 1998. La pubertad de la hembra bovina.
- Garmyn, A.J., Moser, D.W., Christmas, R.A., Minick Bormann, J., 2011. Estimation of genetic parameters and effects of cytoplasmic line on scrotal circumference and semen quality traits in Angus bulls. *Journal of Animal Science* 89, 693-698.
- Gerard, N., Loiseau, S., Duchamp, G., Seguin, F., 2002. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). *Reproduction* 124, 241-248.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 431-446 (Abstr).
- Gilchrist, R.B., Lane, M., Thompson, J.G., 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* 14, 159.

- Ginther, O., Knopf, L., Kastelic, J., 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87, 223-230.
- Ginther, O., Wiltbank, M., Fricke, P., Gibbons, J., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.
- Ginther, O., Bergfelt, D., Kulick, L., Kot, K., 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol. Reprod.* 62, 920-927.
- Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Donadeu, F., Kot, K., 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638-647.
- Ginther, O., Bergfelt, D., Beg, M., Kot, K., 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction* 124, 475-482.
- Ginther, O., Beg, M., Donadeu, F., Bergfelt, D., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 239-257.
- Gipson, T., Vogt, D., Massey, J., Ellersieck, M., 1985. Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology* 24, 217-225 (Abst).
- Giudice, L.C., 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr. Rev.* 13, 641-669.
- Gong, J., Campbell, B., Bramley, T., Gutierrez, C., Peters, A., Webb, R., 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.* 55, 68-74.
- Gordon, I.R., 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos: I.* Gordon. CABI.
- Gordon, I.R., 2004. *Reproductive Technologies in Farm Animals.* CABI.
- Gosden, R., Hunter, R., Telfer, E., Torrance, C., Brown, N., 1988. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 82, 813-825.

- Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., 1991. Secretion of angiogenic activity and progesterone by ovine luteal cell types in vitro. *J. Anim. Sci.* 69, 2099-2107.
- Grazul-Bilska, A.T., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 1997. Gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* 57, 947-957.
- Gupta, P.S.P., Ramesh, H.S., Nandi, S., Ravindra, J.P., 2007. Recovery of large preantral follicles from buffalo ovary: Effect of season and corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 145-152 Abstr.

H_

- Hagemann, L., Beaumont, S., Berg, M., Donnison, M., Ledgard, A., Peterson, A., 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 451-458.
- Hamano, S., Kuwayama, M., 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology* 39, 703-712.
- Hampl, A., Eppig, J.J., 1995. Analysis of the mechanism (s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* 121, 925-933.
- Hardisty, M., 1978. Primordial germ cell and the vertebrate germ line. In Jones RE (ed). *The vertebrate ovary. Comparative Biology and Evolution.* New York: Plenum Press , 1-45.
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M., 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51, 757-765.
- Hazeleger, N.L., Hill, D.J., Stubbing, R.B., Walton, J.S., 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 43, 509-522.
- Hendriksen, P., Vos, P., Steenweg, W., Bevers, M., Dieleman, S., 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53, 11-20.

- Hernández-Fernández, A., Nava-Trujillo, H., Vílchez, V., 2010. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in Vitro*. Producción agropecuaria 3, 41-44.
- Hirschfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. Int. Rev. Cytol. 124, 43.
- Hoque, S.A.M., Kabiraj, S.K., Khandoker, M.A.M.Y., Mondal, A., Tareq, K., 2011. Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. African Journal of Biotechnology 10, 9177-9181.
- Hosoe, M., Shioya, Y., 1997. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. ZYGOTE-CAMBRIDGE- 5, 371-376.
- Howles, C.M., 2000. Role of LH and FSH in ovarian function. Mol. Cell. Endocrinol. 161, 25-30.
- Huang, S., Driessen, N., Knoll, M., Talbot, P., 1997. *In vitro* analysis of oocyte cumulus complex pickup rate in the hamster *Mesocricetus auratus*. Mol. Reprod. Dev. 47, 312-322.
- Huffman, L.J., Inskeep, E.K., Goodman, R.L., 1987. Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. Biol. Reprod. 37, 755-761.
- Hunter, M., 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Rev. Reprod. 5, 122-130.
- Hyttel, P., Xu, K.P., Smith, S., Greve, T., 1986. Ultrastructure of *in-vitro* oocyte maturation in cattle. J. Reprod. Fertil. 78, 615-625.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47, 23-32.

I_

- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian

function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 23, 1-14.

Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219-1225.

J_

Jalabert, B., Fostier, A., Breton, B., Weil, C., 1991. Oocyte maturation in vertebrates. *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications* 4, 23-90.

Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272-1281.

Juengel, J.L., Sawyer, H.R., Smith, P.R., Quirke, L.D., Heath, D.A., Lun, S., Wakefield, S.J., McNatty, K.P., 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 1-10.

K_

Kaipia, A., Hsueh, A.J.W., 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 349-363 (Abstr).

Kakar, S.S., 1997. Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *European journal of endocrinology* 137, 183-192.

, L., 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 461-463.

Kawasaki, Y., Hishunuma, M., Oura, R., Sekine, J., 1999. In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Follicular Oocytes with Various Morphologies. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tottori University* 52, 67-73(Abst).

- Kendrick, K., Bailey, T., Garst, A., Pryor, A., Ahmadzadeh, A., Akers, R., Eyestone, W., Pearson, R., Gwazdauskas, F., 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.* 82, 1731-1741.
- Khatir, H., Lonergan, P., Touze, J., Mermillod, P., 1998. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50, 1201-1210.
- Kinder, J.E., Day, M.L., Kittok, R.J., 1987. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34, 167-186.
- Knight, P.G., Glister, C., 2006. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191-206.
- Krisher, R.L., 2004. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 82, E14-23.
- L**
- Larsen, W.J., Wert, S.E., 1988. Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. *Tissue and Cell* 20, 809-848 (Abstr).
- Lee, S., Choi, M., Gong, S., Han, J., Lim, J., 2007. Establishment of a basic method for manipulating preantral follicles: effects of retrieval method on in vitro growth of preantral follicles and intrafollicular oocytes. *Zygote* 15, 109.
- Leibfried, L., First, N.L., 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48, 76-86.
- Leibfried-Rutledge, M., Critser, E., Eyestone, W., Northey, D., First, N., 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 36, 376-383.
- Leroy, J., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A., Bols, P., de Kruif, A., Van Soom, A., 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 64, 2022-2036.

- Leroy, J., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I., Bols, P., 2008a. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows*. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 612-622.
- Leroy, J., Van Soom, A., Opsomer, G., Bols, P., 2008b. The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality. *Animal* 2, 1120-1127.
- Li, R., Norman, R.J., Armstrong, D.T., Gilchrist, R.B., 2000. Oocyte-secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63, 839.
- Lindner, G.M., Wright, R.W., 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416.
- Lobo, R.A., 2003. Early ovarian ageing: a hypothesis. *Human Reproduction* 18, 1762.
- Lohuis, M.M., 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43, 51-60 (Abst).
- Lonergan, P., 1990. Factors affecting *in vitro* maturation and fertilization of the bovine oocyte. M. Agr. Sc. Thesis, .
- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gallagher, M., Gordon, I., 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. *Theriogenology* 35, 231.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M., Gordon, I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48-53.
- Lonergan, P., Fair, T., 2008. *In vitro*-produced bovine embryos--Dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17-22.
- Lucy, M., 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83, 1635-1647.

Lucy, M., 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.

Lucy, M., 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 85, E89-E99.

M_

Machatkova, M., Jokeová, E., Petelikova, J., Dvoáek, V., 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45, 801-810.

Machatkova, M., Jokesova, E., Horky, F., Krepelova, A., 2000. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 54, 543-550.

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.

Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., 1983. Parameters influencing ovum pickup by oviductal fimbria in the golden hamster. *Gamete Res.* 8, 1-10.

Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Ramesh, H.S., Nandi, S., 2007. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 68, 882-888.

Martino, A., Palomo, M.J., Mogas, T., Paramio, M.T., 1994. Influence of the Collection Technique of Prepubertal Goat Oocytes on In-Vitro Maturation and Fertilization. *Theriogenology* 42, 859-873.

Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science's STKE* 296, 2178.

McEvoy, T., 1999. Oocyte and embryo competence: keys to cattle fertility. *Cattle Practice* 7, part 4, 401-408.

McGee, E.A., Hsueh, A.J.W., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200-214.

- McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Tisdall, D.J., Braw-Tal, R., 1995. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 49, 123.
- McNatty, K., 1978. Follicular fluid. In: Jones RE, editor. *The vertebrate ovary*. New York. Plenum Press , 215-259.
- Merton, J., De Roos, A., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59, 651-674.
- Meza-Herrera, C.A., Gonzalez-Bulnes, A., Kridli, R.T., Mellado, M., Arechiga-Flores, C.F., Salinas, H., Luginbuhl, J.M., 2009. Neuroendocrine, Metabolic and Genomic Cues Signalling the Onset of Puberty in Females. *Reprod Dom Anim.* , 1-8.
- Milvae, R., Hinckley, S., Carlson, J., 1996. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45, 1327-1349.
- Moenter, S., Brand, R., Karsch, F., 1992. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* 130, 2978-2984.
- Moor, R.M., Smith, M.W., Dawson, R.M.C., 1980. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp. Cell Res.* 126, 15-29 (Abstr).
- Moor, R., 1988. Regulation of the meiotic cycle in oocytes of domestic mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 541, 248-258.
- Moran, C., Quirke, J.F., Roche, J.F., 1989. Puberty in heifers: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 18, 167-182 (Abstr).
- Moreno, J., Turczynski, C., Flores-Foxworth, G., Kraemer, D., 1992. Influence of parity of the donor and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Biol. Reprod.* 48, 169.

N_

Nagai, T., 2001. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55, 1291-1301.

Nagano, M., Takahashi, Y., Katagiri, S., 1999. In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 531-535.

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

Nestler, D., Risch, M., Fischer, B., Pocar, P., 2007. Regulation of aryl hydrocarbon receptor activity in porcine cumulus-oocyte complexes in physiological and toxicological conditions: the role of follicular fluid. *Reproduction* 133, 887-897.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1-29.

O_

Olivera A, M., Tarazona, A.M., Ruíz, T., Giraldo, C.A., 2009. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20, 387-393.

Oltenacu, P., Frick, A., Lindhe, B., 1991. Relationship of fertility to milk yield in Swedish cattle. *J. Dairy Sci.* 74, 264-268.

O'Shea, J., Rodgers, R., Wright, P., 1986. Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid-and late luteal phases of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 76, 685-691.

O'Shea, J., Rodgers, R., D'Occhio, M., 1989. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 85, 483-487.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., Suzuki, T., 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48, 769-774.

- Palma, G.A., Tortonese, D., Sinowatz, F., 2008. Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. *Anat. Histol. Embryol.* 30, 295-300.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 63-67 (Abstr).
- Pawshe, C.H., Totey, S.M., Jain, S.K., 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42, 117-125.
- Peterson, A.J., Fairclough, R.J., Payne, E., Smith, J.F., 1975. Hormonal changes around bovine luteolysis. *Prostaglandins* 10, 675-684 (Abstr).
- Petrean, A., Eموke, P., Matei, S., Bogdan, S., 2010. A comparison of two recovery methods of ovine oocyte for in vitro maturation. *Cluj Veterinary Journal* 17, 23-27.
- Pfeifer, L.F.M., Schneider, A., Correa, M.N., 2008. Factors that affect the in vitro production of bovine embryos: A review. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias* 21, 109-120.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R., 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 27-37.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.A.M., Taverne, M.A.M., 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762 (Abst).
- Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, T.A.M., Wurth, Y.A., Van Beneden, T.H., Willemse, A.H., Taverne, M.A.M., 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35, 857-862 (Abst).
- Pratt, H.P.M., George, M.A., 1989. Organisation and assembly of the surface membrane during early cleavage of the mouse embryo. *Dev. Genes Evol.* 198, 170-178 (Abstr).
- Presicce, G.A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C.R., Godke, R.A., Yang, X., 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 56, 386-392.

Q_

Quintal-Franco, J., Kojima, F., Melvin, E., Lindsey, B., Zanella, E., Fike, K., Wehrman, M., Clopton, D., Kinder, J., 1999. Corpus luteum development and function in cattle with episodic release of luteinizing hormone pulses inhibited in the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 61, 921-926.

Quintana, M.D., Campos, P., Herrera, P., Gallego, C., Padrón, E., 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fecundación in vitro FIV obtenidos de hembras *bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal* 34, 53-56.

Quirk, S., Cowan, R., Harman, R., Hu, C.L., Porter, D., 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82, E40-E52.

R_

Rahe, C., Owens, R., Fleeger, J., Newton, H., Harms, P., 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107, 498-503 (Abstr).

Rawlings, N., Evans, A., Honaramooz, A., Bartlewski, P., 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 259-270.

Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J., Heyman, Y., 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fertil.* 103, 115-120.

Reynolds, L.P., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12, 1-9.

Richard, F.J., Sirard, M.A., 1996a. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 54, 16-21.

- Richard, F.J., Sirard, M.A., 1996b. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 54, 22-28.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 234-248.
- Rizos, D., Burke, L., Duffy, P., Wade, M., Mee, J.F., O'Farrell, K.J., MacSiurtain, M., Boland, M.P., Lonergan, P., 2005. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology* 63, 939-949.
- Robker, R.L., Richards, J.A.S., 1998. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol. Reprod.* 59, 476-482.
- Roche, J.F., 1996. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev. Reprod.* 1, 19-27.
- Rodriguez, H., Torres, C., Valdes, X., Guerra, H., Pastor, L., Maccallini, G., Bustos-Obregon, E., 2001. The acrosomic reaction in stallion spermatozoa: inductive effect of the mare preovulatory follicular fluid. *Biocell* 25, 115-120.
- Rodriguez-Martinez, H., Hultgren, J., Båge, R., Bergqvist, A., Svensson, C., Bergsten, C., Lidfors, L., Gunnarsson, S., Algers, B., Emanuelson, U., 2008. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, IVIS (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated .
- Rosairo, D., Kuyznierewicz, I., Findlay, J., Drummond, A.E., 2008. Transforming growth factor- β : its role in ovarian follicle development. *Reproduction* 136, 799-809.
- Rothchild, I., 2003. The yolkless egg and the evolution of eutherian viviparity. *Biol. Reprod.* 68, 337-357.

S_

- Salamone, D.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 52, 549-561.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvao, K.N., 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-3, 513-535.
- Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C.P., Ginther, O., Wiltbank, M.C., 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 65, 1403-1409.
- Saumande, J., Humblot, P., 2005. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. *Anim. Reprod. Sci.* 85, 171-182.
- Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Reproduction* 83, 663.
- Schams, D., Berisha, B., 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reproduction in domestic animals* 39, 241-251.
- Scheffer, G.J., Broekmans, F.J.M., Dorland, M., Habbema, J.D.F., Looman, C.W.N., te Velde, E.R., 1999. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil. Steril.* 72, 845-851.
- Schillo, K., Hall, J., Hileman, S.M., 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.* 70, 3994-4005.
- Sela-Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N., 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 147, 2280-2286.
- Shimada, M., Ito, J., Yamashita, Y., Okazaki, T., Isobe, N., 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes. *J. Endocrinol.* 179, 25.

- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., Hanada, A., 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 30, 489-496.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, S., 2005. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Ruminant Research* 58, 283-286.
- Sirard, M.A., Blondin, P., 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 417-426.
- Sirard, M.A., Richard, F., Mayes, M., 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 49, 483-497.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C., 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65, 126-136.
- Sirois, J., Fortune, J., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308-317.
- Skinner, M.K., 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update* 11, 461-471.
- Smith, M.F., McIntush, E.W., Smith, G.W., 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72, 1857-1872.
- Snijders, S., Dillon, P., O'Callaghan, D., Boland, M., 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53, 981-989.
- Steckler, T., Wang, J., Bartol, F.F., Roy, S.K., Padmanabhan, V., 2005. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 146, 3185-3193.
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P.B., Wolf, E., 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with

morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64, 904.

Su, L., Yang, S., He, X., Li, X., Ma, J., Wang, Y., Presicce, G., Ji, W., 2012. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reproduction in domestic animals* .

Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F., Ireland, J.J., 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101, 547-555.

Suss, U., Madison, V., 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Archives of Andrology* 11, 217-218.

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., De Kruif, A., 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 414-424.

T_

Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N., 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63, 805-810.

Taylor, C., Rajamahendran, R., 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 71, 61-68.

te Velde, E.R., Pearson, P.L., 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update* 8, 141.

Telford, N.A., Watson, A.J., Schultz, G.A., 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 90-100.

Terasawa, E., 2005. Role of GABA in the Mechanism of the Onset of Puberty in Non-Human Primates. *Int. Rev. Neurobiol.* 71, 113-129.

- Tesařík, J., Oltras, C.M., Testart, J., 1990. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 665-675.
- Tokarz, R., 1978. Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in non-mammalian vertebrates. In Jones RE (ed), *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. New York: Plenum Press , 145-180.
- Turner, H., Brüssow, K.P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A., Kanitz, W., 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61, 1675-1689.
- Townson, D., Tsang, P., Butler, W., Frajblat, M., Griel Jr, L., Johnson, C., Milvae, R., Niksic, G., Pate, J., 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80, 1053-1058.

V_

- Valdez, K.E., Cuneo, S.P., Turzillo, A.M., 2005. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction* 130, 71-81.
- Van den Hurk, R., Dijkstra, G., Van Mil, F., Hulshof, S., van den Ingh, T.S., 1995. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 459-467.
- Van den Hurk, R., Spek, E., Hage, W., Fair, T., Ralph, J., Schotanus, K., 1998. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum. Reprod. Update* 4, 833-841.
- Van Den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-1751.

W_

- Walters, A.H., Bailey, T.L., Pearson, R.E., Gwazdauskas, F.C., 2002. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. *J. Dairy Sci.* 85, 824-832.
- Walters, D.L., Schams, D., Schallenberger, E., 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 71, 479-491.
- Wang, L., Wang, D., Zou, X., Xu, C., 2009. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University-Science B* 10, 483-492.
- Wang, Y., Storeng, R., Dale, P.O., Åbyholm, T., Tanbo, T., 2001. Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro. *Gynecological endocrinology* 15, 286-292.
- Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z., Salahudin, S., 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research* 36, 63-67.
- Wani, N., Wani, G., Khan, M., Sidiqi, M., 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilisation procedures in sheep. *Small Ruminant Research* 34, 71-76.
- Ward, F., Lonergan, P., Enright, B., Boland, M., 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54, 433-446.
- Wassarman, P., Albertini, D., 1994. The mammalian ovum. In: Knobil E., Neill J., editors. *The physiology of reproduction* New York: Raven press, 79-122.
- Weck, J., Fallest, P.C., Pitt, L.K., Shupnik, M.A., 1998. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Molecular Endocrinology* 12, 451-457.
- Wehrman, M., Kojima, F., Sanchez, T., Mariscal, D., Kinder, J., 1996. Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. *J. Anim. Sci.* 74, 2462-2467.

Wiltbank, M., Diskin, M., Flores, J., Niswender, G., 1990. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha. *Biol. Reprod.* 42, 239-245.

Wu, B., Ignatz, G.G., Currie, W.B., Yang, X., 1996. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 560-565 (Abst).

Wurth, Y., Kruij, T.M. , 1992. Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands.* 1, 387-389.

X_

Xu, K.P., Greve, T., Smith, S., Hyttel, P., 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.* 27.

Xu, K.P., Greve, T., 1988. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 82, 127-134.

Xu, Z., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Hamilton, S.A., Youngquist, R.S., 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53, 951-957.

Y_

Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P., Presicce, G., 1998. Control of oocyte maturation in cows--biological factors. *Theriogenology* 49, 471-482.

Yang, Y., Lu, K., 1990. The influence of bovine oocyte type on in vitro-fertilization and subsequent development in vitro. *Theriogenology* 33, 355-355.

Younis, A., Brackett, B., Fayer-Hosken, R., 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 23, 189-201(Abstr).

Z_

Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P.J., Yang, X., Godke, R.A., 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Mol. Reprod. Dev. 40, 338-344 (Abstr).

-----***-----

