



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFEECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON
GONADOTROPINAS SOBRE EL NÚMERO DE
FOLICULOS Y LA VIABILIDAD DE OOCITOS
OBTENIDOS DE DONADORAS DIFERENTES
RAZAS**

Silvia Andrea Ruiz Cristancho

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Salud Animal
Bogotá, Colombia

2022

EFEECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINAS SOBRE EL NÚMERO DE FOLICULOS Y LA VIABILIDAD DE OOCITOS OBTENIDOS DE DONADORAS DIFERENTES RAZAS

Silvia Andrea Ruiz Cristancho

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director (a):

Dra. Claudia Jiménez Escobar MV, MSc, DVSc, DACT

Codirector (a):

Dr. Jorge Luis Zambrano Varón MV, MPVM, PhD, DACT

Línea de Investigación:

Teriogenología y Salud de Hato

Grupo de Investigación:

Reproducción Animal y Salud de Hato

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Salud Animal

Bogotá, Colombia 2022

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

SILVIA ANDREA RUIZ CRISTANCHO

Fecha 6/10/2022

Agradecimientos

Agradezco en primera instancia a la Dra. Claudia Jiménez por permitirme el honor de ser una vez más su estudiante y guiarme y apoyarme durante todo este proceso, al Dr. Jorge Zambrano por todo el apoyo, paciencia y consejos durante mi formación desde hace tantos años, infinitas gracias a los dos.

A mis compañeros del post grado en especial a Karen Reina por apoyarme durante todo este tiempo, termino la maestría con una gran amiga. A mi colega Mónica Vergara que ha sido un soporte emocional inmenso. A mi familia, mis padres, hermanos y sobrinos y mis amigas más cercanas por darme fuerza siempre.

A la universidad Nacional de Colombia, al grupo de investigación en Reproducción Animal y Salud de Hato, a la gobernación de Cundinamarca y el sistema general de regalías por hacer posible este proyecto.

Por último, y muy importante, a Carlos Andrés Muñoz, por inspirarme, darme fuerza y soporte, cuando ni siquiera yo creía en mí.

EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINAS SOBRE EL NÚMERO DE FOLICULOS Y LA VIABILIDAD DE OOCITOS OBTENIDOS DE DONADORAS DIFERENTES RAZAS

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estimulación ovárica con gonadotropinas sobre a) la cantidad de folículos ováricos de 3-9 mm al momento de la aspiración folicular, b) la cantidad y calidad de complejos cumulus oocitos obtenidos por sesión de aspiración folicular, c) la capacidad de desarrollo de los mismos medida por la tasa de clivaje y de blastocistos, así como determinar si existe efecto de la raza de la donadora en las tasas de recuperación y viabilidad de oocitos obtenidos mediante aspiración folicular. Veintitrés donadoras de razas Brahman, Jersey, Gyr, Simmental y Holstein, fueron sometidas a cuatro tratamientos: G1) control (sin tratamientos farmacológicos), G2) sincronización de la onda folicular sin estimulación con gonadotropinas G3) sincronización con estimulación con FSH y G4) sincronización con estimulación con eCG, en un modelo factorial cruzado.

Un efecto positivo ($p < 0.05$) fue encontrado en términos del número de folículos disponibles al momento de la OPU en los grupos de tratamientos G2, G3 y G4 comparados con los animales del grupo control (G1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos tres grupos (Sincronización, FSH o eCG). La sincronización de la onda folicular, afectó positivamente la cantidad de los complejos cumulus oocitos (COC's), tasas de clivaje y blastocistos. Adicionalmente, se encontró un efecto positivo de la raza sobre la población de folículos presentes al momento de la OPU, tasas de recuperación, número de COC's recuperados, tasas de maduración, de clivaje y de blastocistos.

En conclusión, se encontró un efecto positivo de la sincronización de la onda folicular y de la raza sobre la calidad de los oocitos obtenidos y parámetros de producción de embriones *in vitro*, lo cual justificaría su utilización en programas de producción de embriones *in vitro*, más no se encontró en efecto benéfico del uso de gonadotropinas (FSH o eCG) antes de realizar la OPU.

Palabras clave: Gonadotropinas, sincronización, bovinos, producción embriones in vitro

Effect of stimulation with gonadotropins on the number of follicles and the oocyte viability obtained from donors of different breed

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of ovarian stimulation with gonadotropins over the number of ovarian follicles (3-9 mm), at the time of Ovum Pick Up (OPU), the quantity and quality of oocyte cumulus complexes obtained per OPU session, their developmental capacity measured by the cleavage rate and blastocyst production; Additionally the effect of donor breed on the recovery and viability rates of oocytes obtained by follicular aspiration was also evaluated. Twenty-three donors of Brahman, Jersey, Gyr, Simmental and Holstein breeds were subjected to four treatments: G1) control (without pharmacological treatments), G2) synchronization of the follicular wave without gonadotropin stimulation, G3) synchronization and FSH stimulation and G4) synchronization and eCG stimulation, in a crossed factorial model.

A positive effect was found in terms of the number of follicles available at the time of OPU in G2, G3 and G4 treatments compared to control group, with no significant differences between these three groups (synchronization, FSH or eCG). Regarding the number of COC's obtained, cleavage and blastocyst rates, a positive effect of synchronization was found, but not in the animals stimulated with FSH or eCG. Additionally, a positive effect of breed was found in terms of follicular population present at OPU, number of COC's recovered, viable COC's, COC's recovery, maturation and cleavage rate as well as blastocyst production.

In conclusion, a positive effect of follicular wave synchronization, was found in cows with regard to follicular population, cleavage rate and blastocyst production, which would indicate its use in *in vitro* embryo production programs; there was no beneficial effect on the use of gonadotropins (FSH or eCG).

X EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINAS SOBRE EL NÚMERO DE FOLICULOS Y LA VIABILIDAD DE OOCITOS OBTENIDOS DE DONADORAS DIFERENTES RAZAS

Keywords: Synchronization, Gonadotropins, Bovine, in vitro embryo production.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	XII
Lista de gráficas y tablas.....	XIV
Introducción	17
1. Capítulo 1 Marco teórico.....	21
1.1 Producción de embriones <i>in vitro</i>	21
1.2 Superestimulación ovárica.	24
2. Capítulo 2 Artículo de investigación.....	35
3. Conclusiones y recomendaciones.....	65
3.1 Conclusiones.....	65
3.2 Recomendaciones.....	66

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estadísticas de producción de embriones in vitro e in vivo en bovinos	19
Figura 2. Competencia de oocitos bovinos obtenidos de folículos madurados in vivo o in vitro	21
Figura 3. Porcentaje de tamaños foliculares previa aspiración folicular comparando tres dosificaciones de eCG y el grupo control	23
Figura 4. Distribución de las tasas de fertilización en animales superestimulados con eCG	24
Figura 5. Comparación de folículos de tamaño pequeño, mediano y grande entre animales tratados con FSH y controles	25
Figura 6. Comparación de las tasas de Clivaje, Blastocistos y Blastocistos expandidos de acuerdo con la clasificación en grados I.II y III	26
Figura 7. Porcentaje de desarrollo de oocitos de acuerdo con su clasificación inicial, las mejores tasas de clivaje y blastocistos se evidencian en los grados I, II y III	27
Figura 8. Esquemas de estimulación hormonal para los diferentes grupos	40

Lista de gráficas y tablas

Pág.

Tabla 1. Número total de folículos observados, tasas de recuperación, fertilización, clivaje y blastocistos, en vacas sometidas a (OPU) para producción de embriones *in vitro* 44

Tabla 2. Efecto de la estimulación exógena con gonadotropinas (grupo control, grupo sincronización, Sincronización + FSH y Sincronización + eCG) sobre el número de folículos observados al momento de la OPU, número y tasas de recuperación de COC's), COC's viables que pasaron a maduración, tasas de maduración, tasas de Clivaje y Tasas de Blastocistos 45

Tabla 3. Efecto de la raza en la producción de embriones *in vitro*, parámetros posteriores a la estimulación ovárica con gonadotropinas en donadoras Brahman, Jersey, Gyr, Simmental y Holstein 47

Tabla 4. Efecto del número de partos sobre la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas en los parámetros obtenidos en la producción de embriones *in vitro* 48

Tabla 5 Efecto del uso de semen sexado vs convencional en la producción de embriones *in vitro* posterior a la estimulación ovárica con gonadotropinas 49

Grafica 1 Interacción de la raza con los diferentes tratamientos en las diferentes razas evaluadas 50

Introducción

La producción de embriones *in vitro* (PEIV) se ha implementado en las producciones ganaderas a nivel mundial con el fin de maximizar el potencial genético de las hembras. Esta técnica de reproducción asistida ha crecido vertiginosamente en los últimos años, a partir del 2012 el incremento se ha mantenido en un 15.8% anual (Viana, 2019) y se considera una opción comercial para el mejoramiento genético en las ganaderías de leche y de carne. Para el 2019 donde la producción de embriones *in vitro* superó la producción *in vivo* (IETS, 2019). En Suramérica la mayor proporción de producción corresponde a Brasil y Argentina.

Con relación a las donadoras de oocitos (para obtención *in vivo*), muchos factores llegan a afectar el éxito de un programa de PEIV. Entre ellos se encuentran el tamaño del folículo aspirado, el tamaño del oocito recuperado, la etapa de la onda folicular en la cual se realiza el procedimiento, la raza y tipo de la donadora (Baruselli et al., 2012).

La mayoría de los oocitos se obtienen de vacas vivas por medio de la técnica de aspiración folicular conocida como OPU (por sus siglas en inglés, Ovum Pick UP) por vía transvaginal, en la cual se obtienen varios oocitos en diferentes estados de desarrollo. Se considera que el oocito proveniente de un folículo dominante que sufre maduración *in vivo* tiene una mayor competencia para producir un embrión viable dado que su proceso de maduración ya ha iniciado dentro del folículo; sin embargo, si solamente se realizara la aspiración de dichos folículos, la cantidad de oocitos que se obtendrían de esta manera sería muy baja, ya que a la dominancia folicular solamente llegan uno o dos folículos, dificultando la aplicabilidad comercial de esta técnica. Por esta razón, se prefiere aspirar folículos de 2-9

mm de diámetro obteniendo un buen número de oocitos inmaduros que deberán ser madurados en condiciones in vitro.

Se considera que las razas de tipo *Bos indicus* poseen un mayor número de folículos por cada onda folicular y por ende presentan una mayor tasa de recuperación de oocitos que podría impactar positivamente en la cantidad de embriones producidos por cada sesión de aspiración folicular. Dicha diferencia en la población folicular de las vacas *B. indicus* con respecto a las *B. taurus* parece estar relacionado con los valores circulantes de IGF-1 (Albares et al., 2000) lo cual puede influir en los mejores resultados en los programas de producción de embriones in vitro (PEIV) y se sugiere que en animales de tipo *indicus*, las células de la granulosa adquieren un mayor número de receptores para LH (Nogueira et al., 2007; Barros et al., 2009).

Es indiscutible que la tasa de producción de embriones in vitro depende de muchos factores y aún se requieren más estudios en diversas áreas. La mayoría de las publicaciones referencian estudios en *Bos indicus*, pero faltan estudios de otras razas que no son usadas comercialmente con tanta frecuencia posiblemente por esta falta de información. En general se busca aumentar el número de oocitos competentes por aspiración para intentar incrementar la tasa de producción de embriones viables por cada sesión de aspiración folicular.

El uso de hormonas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) buscan incrementar el número de folículos disponibles al momento de la aspiración con el fin de mejorar las tasas de recuperación de oocitos y el número de blastocistos obtenidos por cada sesión, sin embargo, los resultados de estos protocolos de superestimulación son variables.

Algunos autores reportan un incremento en el número de folículos aspirados, el número de complejos cumulus-oocitos (COC's) recuperados y el número de COC's viables en

animales tratados con FSH a dosis de 160 mg en animales de raza Angus y Brangus, en comparación con los animales estimulados con 800 UI de eCG (Ongaratto et al., 2015). Por el contrario, otros autores no reportan incrementos en las tasas de recuperación y clivaje en animales superestimulados posterior al tratamiento con 200 mg de FSH en animales Holstein, aunque si se reporta un mayor número de folículos de tamaño medio (6-10 mm) y mejor tasa de blastocistos (52.8%) en los animales tratados (Vieira et al., 2014). Un estudio realizado en animales de raza Braford reportó mejores tasas de fertilización (68.6%) en el grupo tratado con 800 UI de eCG en comparación con el control (36.9%); sin embargo, el número de folículos al momento de la OPU, tasa de recuperación, tasa de clivaje no tuvieron diferencias estadísticamente significativas (Ribas et al., 2018).

En Colombia, se han publicado pocos estudios sobre la PEIV y los pocos que se han publicado están más enfocados a los factores que afectan las tasas de preñez en las receptoras (Oyuela, 2009). No se ha reportado la eficiencia de la producción de oocitos obtenidos de donadoras, a pesar de que hoy en día la producción de embriones *in vitro* tiene alcances comerciales importantes en el país especialmente en la especie *Bos indicus*.

Se plantea como hipótesis que el uso de hormonas folículo estimulantes (FSH y eCG) promueve el reclutamiento de un mayor número de folículos antrales (de 3-9 mm) los cuales estarían disponibles al momento de realizar la aspiración folicular, incrementando la tasa de recuperación de oocitos y que esto redunde en una mayor tasa de embriones producidos *in vitro*; en ése sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estimulación ovárica con gonadotropinas sobre la cantidad de folículos ováricos de tamaño medio (3-9 mm) al momento de la aspiración folicular, la cantidad y calidad de complejos cumulus oocitos obtenidos por sesión de aspiración folicular, así como la capacidad de desarrollo de los mismos medida por la tasa de clivaje y producción de blastocistos; adicionalmente se determinó si existe un efecto de la raza de la donadora en las tasas de recuperación y viabilidad de oocitos obtenidos mediante aspiración folicular.

1. Capítulo 1 Marco teórico

1.1 Producción de embriones *in vitro*

El uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) ha sido un impulso importante en la eficiencia de las producciones lácteas y cárnicas en el ganado bovino maximizando el potencial genético de las hembras. La producción de embriones *in vitro*

(PEIV) ha crecido vertiginosamente en los últimos años; a partir del 2012 el incremento ha sido constante en promedio de un 15.8% anual (Viana, 2019) y se considera una opción comercial para las ganaderías con una relativa facilidad en la aplicabilidad en la práctica. Para el 2016 cerca del 50% de los embriones producidos a nivel mundial eran derivados de producción *in vitro*, tendencia que fue superada según informe de la IETS para el 2019 donde la producción de embriones *in vitro* superó la producción *in vivo* (Perry, 2016; Viana, 2019). En Suramérica la mayor producción corresponde a Brasil y Argentina.

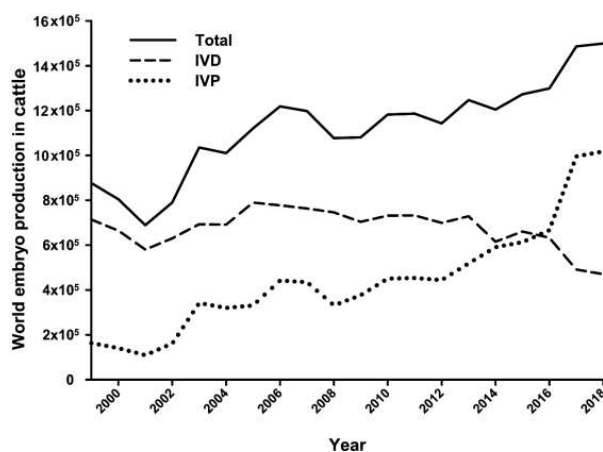


Figura 1. Estadísticas de producción de embriones *in vitro* e *in vivo* en bovinos (tomado de data retrieval report, 2019).

El proceso de PEIV involucra cuatro etapas fundamentales: obtención de oocitos de vacas vivas mediante la técnica de aspiración folicular OPU o por aspiración directa de los ovarios extraídos *postmortem* con el posterior procesamiento en laboratorio que se divide en maduración, fertilización y cultivo de oocitos hasta la etapa de blastocito (Cavalieri et al., 2018; Ferré et al., 2020).

Con relación a la donadora, muchos factores afectan el éxito de un programa de PEIV. Entre ellos se encuentran el tamaño folicular, el tamaño del oocito, la etapa de la onda folicular, la raza y el tipo de animal donador (Baruselli et al., 2012).

Actualmente, la mayoría de los oocitos son obtenidos de vacas donadoras vivas mediante la técnica de OPU. Los folículos presentes en los ovarios varían de tamaño y número de acuerdo con la onda folicular, la cual tiene tres etapas principales: reclutamiento, selección y dominancia. Se considera que el oocito proveniente de un folículo dominante que sufre maduración *in vivo* tiene una mayor competencia, la cual depende de factores como son el tamaño folicular, la etapa del ciclo y el estado de atresia al momento de la obtención (Machatkova et al., 2004).

Así pues, en condiciones fisiológicas el oocito madurado *in vivo* tendría mayor competencia como se observa en la Figura 2. La producción de blastocistos a partir de oocitos madurados *in vitro* es más baja (cerca al 30%) comparada con la producción de embriones obtenidos a partir de oocitos madurados *in vivo* provenientes de folículos dominantes (cerca al 60%); (Matoba et al., 2014). Sin embargo, la cantidad de oocitos que se obtendrían de esta manera sería muy baja considerando que, a la dominancia folicular, llegan solo uno o máximo dos folículos y se dificultaría la aplicabilidad comercial de la PEIV. Por esta razón se prefieren aspirar folículos de 2-9 mm de diámetro obteniendo oocitos inmaduros que se deben madurar *in vitro*.

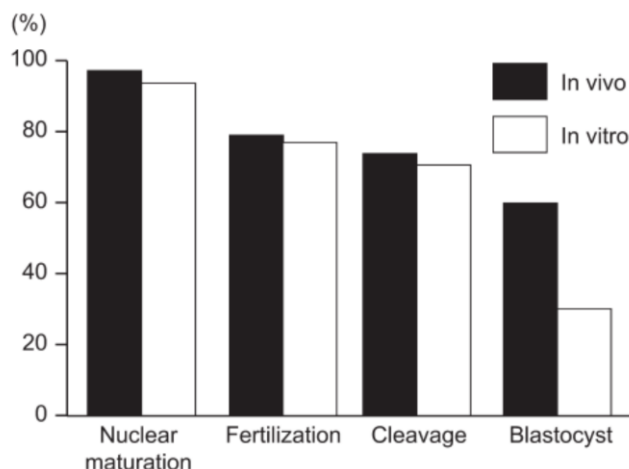


Figura 2. Competencia de oocitos bovinos obtenidos de folículos madurados in vivo o in vitro (Tomado de Matoba, 2014).

En otro estudio, se evaluó el potencial de desarrollo de oocitos obtenidos por OPU en diferentes etapas de la onda folicular (Nagano et al., 2007). En este estudio se reportó que el potencial de desarrollo de los oocitos fue mejor si se aspiraban folículos en las fases de reclutamiento y selección folicular que coincide con una mayor población de folículos entre 3-9 mm de diámetro. Este estudio fue corroborado por otro estudio (Gimenes et al., 2015) realizado en novillas Nelore y Holstein que concluyó que la tasa de recuperación de oocitos fue similar si el procedimiento OPU se realizaba al día 1,3 o 5 del inicio de la onda folicular (que corresponderían a las primeras dos etapas de la onda folicular).

Un estudio en animales *Bos Taurus*, reportó que al obtener oocitos en los días 2,3,5, y 7 de la emergencia folicular (fase de crecimiento, estático temprano, estático tardío y fase de regresión) se obtuvo una tasa de blastocistos del 17%,15%,49% y 26% respectivamente para cada día siendo mayor para el día 5 en comparación con los colectados los demás días, y concluyeron que se presenta un efecto positivo entre la atresia temprana y el desarrollo de la competencia en el oocito (Vassena et al., 2003).

Un factor importante para considerar es el tamaño del oocito; se ha reportado que la tasa de competencia de desarrollo es mejor si el oocito tiene un tamaño entre 115-120 micras

en comparación con oocitos de menor tamaño. Éstos oocitos provendrían de folículos de más de 3 mm siendo mejores los oocitos que provienen de folículos entre 6-9 mm (De Bem et al., 2014).

Se tiene una convicción general que las razas de la especie *Bos Indicus* tienen un mayor número de folículos por onda folicular y tanto la tasa de recuperación de oocitos por aspiración como la cantidad de embriones producidos *in vitro* es mayor, Gimenes et al., 2015 realizaron una comparación entre novillas Holstein y novillas Nelore en el cual se encontró una mayor tasa de folículos disponibles para aspiración, mayor tasa de oocitos obtenidos y mayor tasa de embriones en las novillas *B.Indicus*. Adicionalmente, en este estudio se concluyó que la tasa de recuperación de oocitos fue similar si el procedimiento OPU se realizaba al día 1,3 o 5 del inicio de la onda folicular.

1.2 Superestimulación ovárica

Se estima que los folículos que son sensibles a las gonadotropinas tienen un diámetro de 3-4 mm (Hunter et al., 2004). En ese orden de ideas, se busca con el uso de gonadotropinas “rescatar” de la atresia fisiológica folículos que pueden proveer oocitos competentes para producción de embriones *in vitro* y así aumentar la población de folículos disponibles al momento de la aspiración (Vieira, et al., 2014; Ongaratto et al., 2020).

Se han empleado diferentes protocolos de estimulación ovárica a partir del uso de FSH (da Silva et al., 2017). Algunos estudios han reportado un incremento en la cantidad de folículos disponibles al momento de la aspiración folicular lo cual a su vez ha tenido un efecto positivo en la cantidad y competencia de los oocitos Vieira, et al., 2014 demostró un efecto positivo en el número de folículos de tamaño medio (6-10 mm) disponibles al momento de la aspiración folicular, siendo el 50.2% de dicho tamaño en los animales tratados con pFSH vs 17% para animales control; de igual forma la proporción de folículos

de tamaño pequeño en animales con el tratamiento fue del 38.8% en comparación con los animales control donde fue de más frecuente 69.7%.

También se ha descrito el uso de la Gonadotropina Coriónica equina (eCG), por su acción tanto FSH como LH, que promueve la esteroidogénesis, el crecimiento folicular (Duffy et al., 2004), y la maduración de los oocitos (P. Baruselli et al., 2008; Murphy, 2012). Un estudio realizado en animales Braford, reportó el uso de diferentes dosificaciones de eCG (200, 400 y 800 UI por animal), encontraron un mayor número de folículos de tamaño medio (6 mm) en animales tratados con 800 UI de eCG. Sin embargo, el total de folículos disponibles al momento de la aspiración fue similar tanto en los grupos tratados, como en el grupo control (Ribas et al., 2018). (Figura 3).

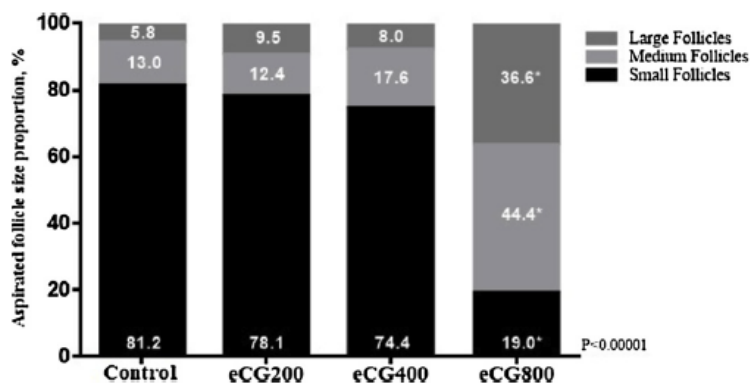


Figura 3. Porcentaje de tamaños foliculares previa aspiración folicular comparando tres dosificaciones de eCG y el grupo control (Tomado de Ribas, 2018).

En este caso, los autores concluyen que el efecto positivo en cuanto al aumento del número de folículos de tamaño medio al momento de la aspiración depende de la dosificación de la eCG, los cuales tendrían una mayor competencia para la producción de embriones *in vitro* (Blondin & Sirard, 1995; Blondin et al., 2002; ; Nivet et al., 2012).

En el estudio de los animales Braford, si se reportó un efecto positivo en la tasa de fertilización con el uso de 800 UI eCG previo a la aspiración folicular siendo de 68.6% para los animales tratados y de 36.9% para los animales control. (Ribas et al., 2018),

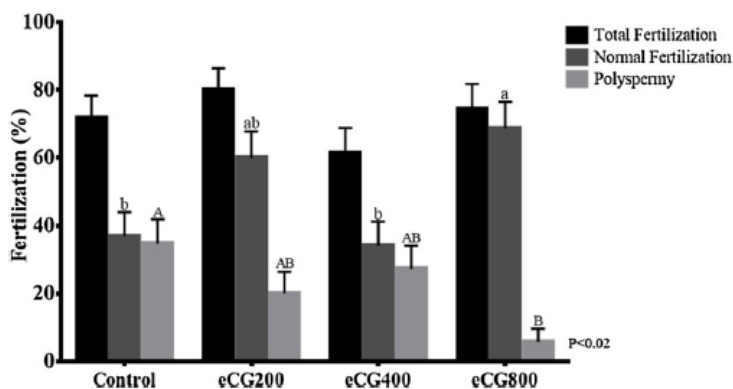


Figura 4. Distribución de las tasas de fertilización en animales superestimados con eCG (Tomado de Ribas, 2018).

Se ha reportado un efecto positivo de la estimulación con FSH sobre la cantidad de folículos de tamaño medio al momento de la aspiración, pero no se demostró un efecto del tratamiento ($P > 0,70$) en cuanto a tasa de producción de embriones. (da Silva et al., 2017).

Por otra parte, el uso de la FSH ha sido reportada en varios estudios con el fin de generar estimulación ovárica. Teniendo en cuenta la vida media corta de la FSH, se han propuesto diferentes protocolos, los cuales han mostrado el influjo positivo de la misma sobre la población de oocitos disponibles al momento de la aspiración folicular.

Un estudio comparó dos protocolos de estimulación con FSH previa a la aspiración folicular con una dosis total de 200 mg, dividida en 4 o 6 aplicaciones. Se evidenció un mejor resultado con el protocolo de dosificación dividido en 6 ocasiones, encontrando una mayor proporción de folículos mayores de 6 mm (18.1 ± 1.4) comparada con las 4 aplicaciones

(5.2 ± 0.5) (da Silva et al., 2017). Sin embargo, éste aumento en el número de folículos disponibles, no se correlacionó positivamente con el número de oocitos viables (12%), tasas de recuperación (36%) y blastocistos producidos (4%), para los grupos tratamiento y control respectivamente.

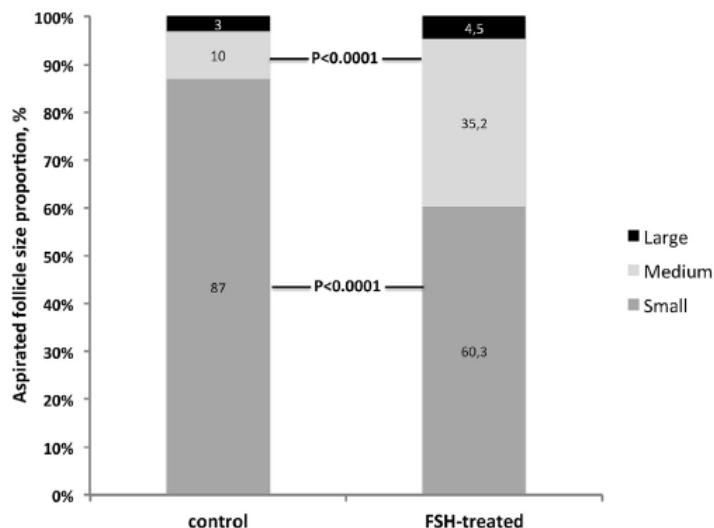


Figura 5. Comparación de folículos de tamaño pequeño, mediano y grande entre animales tratados con FSH y controles (Tomado de da Silva, 2017).

La competencia de desarrollo del oocito se refiere a la capacidad de un oocito para completar la maduración, fertilización y desarrollarse hasta el estado de embrión aumentando la posibilidad de producir una progenie viable (Watson, 2007). *In vivo*, esta competencia aumenta con relación al desarrollo folicular (Machatkova et al., 2004) y la cercanía al pico de LH, que tiene la función a nivel del oocito de estimular el reinicio de la Meiosis (maduración nuclear). Adicionalmente ocurre una acumulación de ARNm en los oocitos durante la maduración citoplasmática, la cual parece tener un papel clave en los primeros ciclos del desarrollo embrionario temprano (Watson, 2007).

Rutinariamente en los programas de producción de embriones *in vitro*, se realiza una clasificación de los oocitos obtenidos en relación con su morfología. Sin embargo, (De Bem

et al., 2014) sugiere que la clasificación dada por la apariencia morfológica no garantiza un adecuado desarrollo embrionario ya que éste es multifactorial y demostró que los oocitos que se consideraban de peor calidad (grado III), poseían mejor potencial de desarrollo embrionario.

Table 2. Embryo development and blastocyst hatching rates according to morphological classification of COCs

Group	Oocytes N	Cleavage D2 n (% ± SD)	Blastocysts D7 n (% ± SD)	Hatched D9 n (% ± SD)
GI	92	78 (85 ± 4.0)	34 (36.9 ± 1.1) ^{ab}	31 (91.2 ± 5.2)
GII	91	73 (80 ± 8.8)	26 (28.5 ± 4.8) ^b	22 (84.6 ± 8.3)
GIII	88	72 (82 ± 4.2)	42 (47.7 ± 5.5) ^a	37 (88.1 ± 8.4)

SD, standard deviation of the mean.

Results of four replicates.

Different letters within the same column indicate a difference between treatments.

Figura 6. Comparación de las tasas de Clivaje, Blastocistos y Blastocistos expandidos de acuerdo con la clasificación en grados I,II y III (Tomado de Bem, 2014).

De igual forma, (Blondin & Sirard, 1995), reportaron que, tras realizar clasificaciones morfológicas, los oocitos grado 3 que por el método morfológico no serían considerados los mejores ya que presentaban un grado de expansión en las células del cumulus y adicionalmente el citoplasma se observaba granulado, consiguieron la mayor capacidad de desarrollo

En este orden de ideas, no solo se debe tener en cuenta aumentar la cantidad de folículos disponibles por sesión de aspiración folicular, sino también, evaluar la competencia de los oocitos obtenidos. Un estudio evaluó la relación entre la morfología de los oocitos recuperados de folículos antrales de tamaño pequeño y su competencia de desarrollo (Nagano, 2019). La clasificación de los oocitos se realizó de acuerdo con las características morfológicas en siete grados y posteriormente fueron sometidos a maduración, fertilización y cultivo; los resultados indicaron que los oocitos de las primeras tres categorías, tuvieron

mayores tasas de clivaje y de blastocistos, a diferencia de lo que reportaron los otros dos estudios mencionados anteriormente.

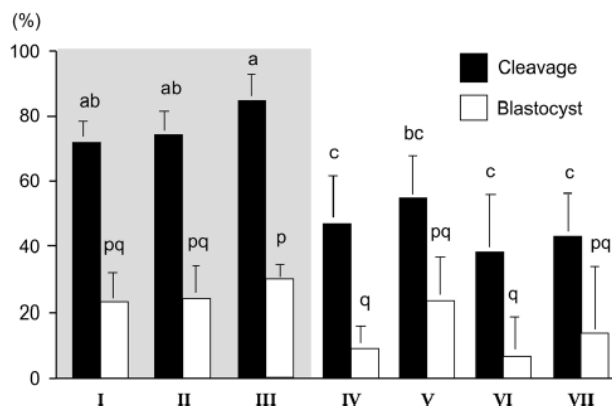


Figura 7. Porcentaje de desarrollo de oocitos de acuerdo con su clasificación inicial, las mejores tasas de clivaje y blastocistos se evidencian en los grados I, II y III (Tomado de Nagano, 2019).

En diferentes estudios se ha demostrado que las razas de tipo *Bos indicus* tienen un mayor número de folículos por cada onda folicular y por ende presentan una mayor tasa de recuperación de oocitos que podría impactar positivamente en la cantidad de embriones producidos por cada sesión de aspiración folicular. Dicha diferencia en la población folicular de las vacas *Indicus* con respecto a las *Taurus* parece estar relacionado con los valores circulantes de IGF-1 (Alvarez et al., 2000), lo cual puede influir en los mejores resultados en los programas de producción de embriones *in vitro* (PEIV) en esta especie (Viana y Camargo., 2007).

Un estudio comparando animales de tipo indicus y taurus reportó un mayor número de folículos al momento de la emergencia folicular en animales Brahman (30 ± 4) comparado con vacas Angus (21 ± 4) (Alvarez et al., 2000). Por otra parte, otro estudio que comparaba novillas Nelore con Holstein, reportó un mayor número de folículos disponibles para aspiración (Nelore $38,3 \pm 3$) vs (Holstein 23.1 ± 2.6), mayor tasa de oocitos recuperados ($35,2 \pm 4.8$) vs (13.8 ± 1.8) y mayor tasa de blastocistos (28.1 ± 5.6) vs ($16.6.1 \pm 5.2$)

(Gimenes et al., 2015). Adicionalmente, en este estudio se concluyó que la tasa de recuperación de oocitos fue similar si el procedimiento OPU se realizaba al día 1, 3 o 5 del inicio de la onda folicular

Con el ánimo de comprobar este impacto positivo en la PEIV, un estudio realizado en animales de tipo *indicus* reportó un promedio de 41 folículos en comparación con 24 folículos al momento del reclutamiento (3-5 mm) posterior a la una sincronización de la onda folicular con 2mg de BE combinado con dispositivo intravaginal de progesterona (Sartori & Barros, 2011)

Adicional a la mayor población folicular durante la emergencia, se sugiere que las células de la granulosa en vacas tipo *indicus* como las Nelore, adquieren un mayor número de receptores para LH en un folículo dominante de menor tamaño en comparación con vacas de tipo Taurus como las Holstein (Nogueira et al., 2007; Barros et al., 2009).

Esta revisión indica que son diversos los factores que afectan las tasas de éxito en la producción de embriones *in vitro*, tales como la raza, tratamientos farmacológicos y número de folículos disponibles al momento de la OPU entre otros. Es indiscutible que intentar aumentar la población de folículos aspirables podría aumentar la eficiencia de la producción de embriones *In Vitro*; adicionalmente se debe considerar si la estimulación con gonadotropinas pueda variar con factores individuales como la raza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alvarez, P., Spicer, L. J., Chase, C. C., Payton, M. E., Hamilton, T. D., Stewart, R. E., Hammond, A. C., Olson, T. A., & Wettemann, R. P. (2000). Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. In *J. Anim. Sci* (Vol. 78). <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/5/1291/4668492>
- Baruselli, P., Jacomini, J. O., Sales, J. N., & Crealdi, G. A. (2008). importancia do emprego de eCG em protocolos de IA , TE e IATF. *III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, January*.
- Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., Vieira, L. M., Mendanha, M. F., & Bó, G. A. (2012). Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), 134–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x>
- Barros, C.M., Ereno, R.L., Machado, M.F., Buratini Jr., J., Pegorer, M.F., Simões, R.A.L., Satrapa, R.A., 2009. Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHr) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 187 (abstract).
- Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard, M.-A. (2002). Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 66(1), 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>
- Blondin, P., & Sirard, M. -A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1), 54–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Bogotá DC. (2009). *Lino Andrés Oyuela-Universidad Nacional Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia maestría en Salud Animal*.
- Cavaliere, F. L. B., Morotti, F., Seneda, M. M., Colombo, A. H. B., Andreazzi, M. A., Emanuelli, I. P., & Rigolon, L. P. (2018). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 117, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>
- da Silva, J. C. B., Ferreira, R. M., Maturana Filho, M., Naves, J. de R., Santin, T., Pugliesi, G., & Madureira, E. H. (2017a). Use of FSH in two different regimens for ovarian

superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 90, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.016>

De Bem, T. H. C., Adona, P. R., Bressan, F. F., Mesquita, L. G., Chiaratti, M. R., Meirelles, F. V., & Leal, C. L. V. (2014). The Influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and bax transcripts on the developmental competence of bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 576–583. <https://doi.org/10.1111/rda.12325>

Duffy, P., Crowe, M. A., Austin, E. J., Mihm, M., Boland, M. P., & Roche, J. F. (2004). The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology*, 61(4), 725–734. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00255-3)

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F., & Ross, P. J. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 55, Issue 6, pp. 659–676). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>

Gimenes, L. U., Ferraz, M. L., Fantinato-Neto, P., Chiaratti, M. R., Mesquita, L. G., Sá Filho, M. F., Meirelles, F. V., Trinca, L. A., Rennó, F. P., Watanabe, Y. F., & Baruselli, P. S. (2015a). The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, 83(3), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.030>

Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., & Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.013>

Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., & Tomanek, M. (2004a). Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, 61(2–3), 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4)

Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hashiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P., & Imai, K. (2014). Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 743–753. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6838>

Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential too. *Animal Reproduction*, 9(3), 223–230.

Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 64(6), 195–201.

-
- Nagano, M., Hishinuma, M., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2007). The Relationship Between Oocyte Morphology and Ovarian Status in Cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 953–958. <https://doi.org/10.1262/jrd.19022>
- Nivet, A. L., Bunel, A., Labrecque, R., Belanger, J., Vigneault, C., Blondin, P., & Sirard, M. A. (2012). FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, 143(2), 165–171. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0391>
- Nogueira, M. F. G., Buratini, J., Price, C. A., Castilho, A. C. S., Pinto, M. G. L., & Barros, C. M. (2007). Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 74(6), 680–686. <https://doi.org/10.1002/mrd.20656>
- Ongaratto, F. L., Cedeño, A. v., Rodriguez-Villamil, P., Tríbulo, A., & Bó, G. A. (2020). Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. *Animal Reproduction Science*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>
- Ongaratto, F. L., Tribulo, A., & Bó, G. A. (2015). *Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle*. 876–883.
- Perry, G. (2016). 2016 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM. In The International Embryo Transfer Society.
- Ribas, B. N., Missio, D., Junior Roman, I., Neto, N. A., Claro, I., dos Santos Brum, D., & Leivas, F. G. (2018a). Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195(March), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.006>
- Sartori, R., & Barros, C. M. (2011). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006>
- Vassena, R., Mapletoft, R. J., Allodi, S., Singh, J., & Adams, G. P. (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, 60(5), 923–932. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00101-8)
- Viana, J. (n.d.). *2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos*.
- Viana, J.H.M., Camargo, L.S.A., 2007. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario. *Acta Sci. Vet.* 35 (Supl. 3), 920–924.
- Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., Sá Filho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating

Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318–324.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>

Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Mendanha, M. F., Sá Filho, M. F., Sales, J. N. S., Souza, A. H., Santos, J. E. P., & Baruselli, P. S. (2014). Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, 82(2), 204–212.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.018>

Watson, A.J., Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and 97 embryo developmental competence. *Journal of animal science*, 2007. 85(13 suppl): 98 p. E1-E3

2. Capítulo 2 Artículo de investigación

EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON GONADOTROPINAS SOBRE EL NÚMERO DE FOLICULOS Y LA VIABILIDAD DE OOCITOS OBTENIDOS DE DONADORAS DIFERENTES RAZAS

Andrea Ruíz-Cristancho¹, Jorge Zambrano-Varón², Claudia Jiménez-Escobar¹.

¹Departamento de Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de investigación en Reproducción Animal y Salud de Hato.

cjimeneze@unal.edu.co

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la superestimulación ovárica con gonadotropinas sobre la cantidad de folículos ováricos de 3-9 mm al momento de la aspiración folicular (OPU), la cantidad y calidad de complejos cumulus-oocitos (COC'S) obtenidos por sesión de aspiración folicular. Adicionalmente se determinó la capacidad de desarrollo de los mismos medida por la tasa de clivaje y de blastocistos y el efecto de la raza de la donadora sobre las tasas de recuperación y viabilidad de oocitos obtenidos. Veintitrés donadoras de razas Brahman, Jersey, Gyr, Simmental y Holstein, fueron sometidas a cuatro tratamientos antes de la aspiración folicular: G1) control (sin tratamientos farmacológicos), G2) sincronización de la onda folicular sin estimulación con gonadotropinas G3) sincronización y estimulación con FSH y G4) sincronización y estimulación con eCG, en un modelo factorial cruzado. Se encontró un efecto positivo en cuanto a la cantidad de folículos disponibles al momento de la OPU en los grupos G2, G3 y G4 en comparación con los animales control, sin que hubiera diferencias significativas

entre estos tres grupos que recibieron tratamiento (sincronización, FSH o eCG). En cuanto a cantidad de COC'S obtenidos, las tasas de clivaje y de blastocisto, se encontró un efecto positivo de la sincronización más no en los animales estimulados con FSH o eCG. Adicionalmente se encontró un efecto de la raza en cuanto, a la población de folículos presentes a la OPU, número de COC's recuperados, COC's viables, tasas de recuperación de COC's, tasa de maduración, de clivaje y de blastocistos. En conclusión, se encontró un efecto positivo de sincronización de la onda folicular en vacas sobre la población folicular, la tasa de clivaje y la producción de blastocistos, lo cual indicaría su utilización en programas de producción de embriones in vitro, más no se encontró un efecto benéfico del uso de gonadotropinas (FSH y eCG).

Palabras clave: Gonadotropinas, Bovinos, sincronización, producción embriones in vitro

2.1 Introducción

La producción de embriones in vitro (PEIV) se considera una opción comercial para el mejoramiento en las ganaderías de leche y de carne. Para el 2016, cerca del 50% de los embriones producidos a nivel mundial eran derivados de producción *in vitro*, tendencia que fue superada según informe de la IETS para el 2019 donde la producción de embriones *in vitro* correspondió al 72.7% de los embriones reportados, superando la producción *in vivo* (Viana, 2019).

Los oocitos para la PEIV se obtienen de vacas vivas por medio de la técnica de aspiración folicular conocida por sus siglas en inglés, Ovum Pick UP (OPU) por vía transvaginal. La población objetivo de estas rutinas son los folículos de 3-9 mm de diámetro (tamaño medio), de los cuales se obtienen un número significativo de oocitos que serán madurados en condiciones *in vitro* (Sendag et al., 2008; Vieira et al., 2014).

Es comúnmente aceptado que las razas de tipo *Bos indicus* tienen una mayor población folicular por cada onda y gracias a esta condición se expresa una mayor tasa de recuperación de oocitos que impacta positivamente en las tasas de embriones producidos por cada sesión de aspiración folicular. Diferentes autores han atribuido dicha diferencia en la población de folículos por cada onda folicular de las vacas *B. indicus* con respecto a las *B. taurus* la cual parece estar relacionada con los valores circulantes de IGF-1 (Alvarez et al., 2000) y con un mayor número de receptores para LH en las células de la granulosa (Nogueira et al., 2007; Sartori & Barros, 2011).

Es indiscutible que la tasa de producción de embriones *in vitro* depende de muchos factores y aún se requieren más estudios en diversas áreas además del factor raza. Una de ellas es la cantidad de oocitos competentes por aspiración que determinaría el número de embriones viables por cada sesión de aspiración folicular (Sendag et al., 2008; Vieira et al., 2014).

El uso de hormonas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) buscan incrementar el número de folículos disponibles al momento de la aspiración con el fin de mejorar las tasas de recuperación de oocitos y el número de blastocistos obtenidos por cada sesión; sin embargo, los resultados de estos protocolos de estimulación son variables (Chaubal et al., 2007; Ongaratto et al., 2015).

Algunos autores reportan un incremento en el número de folículos aspirados, el número de complejos cumulus-oocitos (COC's) recuperados y el número de COC's viables en animales tratados con FSH. Tal es el caso de un estudio donde se observó un efecto positivo cuando se aplicó una dosis de 160 mg de FSH a animales de raza Angus y Brangus, en el número de folículos aspirados (17.9 ± 1.2), en comparación con los animales estimulados con eCG a dosis de 800 UI (13.6 ± 1.2), COC's recuperados (FSH 10 ± 0.8 vs eCG 7.3 ± 0.8) y COC's viables (FSH 6.8 ± 0.6 vs eCG 3.7 ± 0.6) (Ongaratto et al., 2015). Por el contrario, otros autores no reportan incrementos importantes sobre las tasas de recuperación y clivaje en vacas Holstein tratadas con 200 mg de FSH, aunque si

reportan un mayor número de folículos de tamaño medio (55.1 vs 20.8 respectivamente), así como una mejor tasa de blastocistos (52.8%) en los animales tratados versus los animales control (31.3%) (Vieira et al., 2014).

Con relación a la eCG, un estudio realizado en animales de raza Braford, reportó mejores tasas de fertilización (68.6%) en el grupo tratado con 800 UI de eCG en comparación con el control (36.9%); sin embargo, el número de folículos al momento de la OPU, tasa de recuperación, tasa de clivaje y blastocistos, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas. (Ribas et al., 2018).

Se han reportado muy pocos estudios que comparan tasas de PEIV en donadoras de diferentes razas y con protocolos de sincronización con o sin estimulación con gonadotropinas. Se plantea como hipótesis que el uso de hormonas folículo estimulantes (FSH y eCG) promueve el reclutamiento de un mayor número de folículos antrales (de 3-9 mm) los cuales estarían disponibles al momento de realizar la aspiración folicular, lo cual incrementaría la tasa de recuperación de oocitos y a su vez la tasa de blastocistos producidos *in vitro*. También se plantea que hay una variación entre razas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estimulación ovárica con gonadotropinas (FSH y eCG) sobre la cantidad de folículos ováricos de tamaño medio (3-9 mm) al momento de la aspiración folicular, la cantidad y calidad de complejos cumulus oocitos obtenidos por sesión de aspiración folicular, así como la capacidad de desarrollo de los mismos medida por la tasa de clivaje y blastocistos; adicionalmente se buscó si existe un efecto de la raza de la donadora en las tasas de recuperación y viabilidad de oocitos obtenidos mediante aspiración folicular.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Animales

Se seleccionaron inicialmente 25 hembras donadoras por conveniencia, en grupos de cinco por raza: Brahman, Gyr, Jersey, Simmental y Holstein. Se excluyeron dos animales por razones de salud (una vaca Holstein y una vaca Simmental) quedando, 17 vacas multíparas (2-13 años) y 6 vacas nulíparas (2-4 años). Todas las vacas estaban vacías, no lactantes, con adecuada condición corporal, en promedio de 2.7-3 /5 (en escala de 1-5) para las razas de leche y 7-8 /9 (en escala de 1-9) para las razas de carne, anatómicamente normales y sin patologías reproductivas evidentes. Las donadoras se encontraban alojadas en una central de reproducción de la empresa Embiovet, en el caso de los animales de carne, se encontraban en San Martín-Meta a una altura promedio de 405 msnm y temperatura promedio de 28 °C. en el caso de los animales de leche se encontraban en Rosal-Cundinamarca, a una altura promedio de 2685 msnm y con una temperatura promedio de 19 °C. Todos los animales se manejaron en condiciones controladas de alimentación y alojamiento.

Dentro de los criterios de inclusión estaba la certificación de libertad de Brucella y tuberculosis emitida por ICA y serologías negativas a Virus de leucosis bovina, *Neospora caninum*, *Brucella abortus* y PI de Diarrea viral bovina.

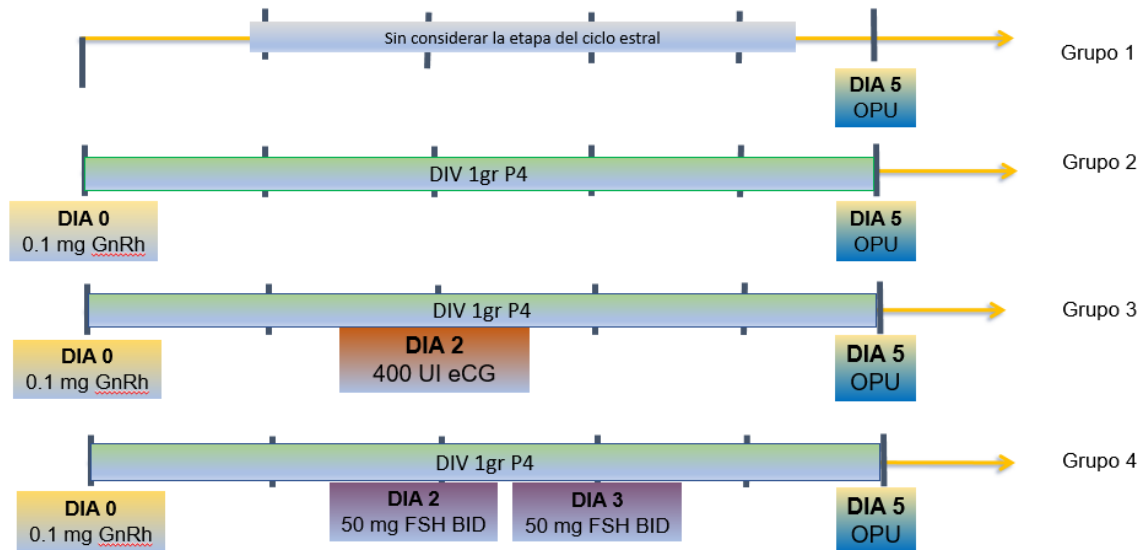
2.2.2 Diseño experimental y esquemas de estimulación hormonal.

Se realizó un ensayo clínico de diseño factorial cruzado. Los animales (n=23) fueron asignados aleatoriamente a los cuatro grupos (control, sincronización, sincronización + FSH, sincronización + eCG); todos fueron sometidos a todos los tratamientos. Al Grupo 1 (G1, control) se le realizó la aspiración folicular sin ningún tratamiento hormonal previo y sin tener en cuenta la etapa del ciclo estral. El G2 (GnRH + DIV P₄) consistió en un protocolo de sincronización de la onda folicular que incluyó: el día 0, GnRH 0.01mg DT (2.5 ml Sincroforte ® IM) e inserción de dispositivo intravaginal de 1gr de Progesterona (Sincrogest ®); el día 5 se retiró el dispositivo y se procedió con la aspiración folicular. El G3 (GnRH + DIV P₄ + eCG) recibió el mismo protocolo de sincronización; adicionalmente el día 2, se realizó un único tratamiento de Gonadotropina coriónica equina (eCG) 400UI en vacas o 240UI en novillas (2 y 1.2 ml IM Sincro eCG ® respectivamente). El G4 (GnRH + DIV P₄ + FSH) también incluyó un protocolo de sincronización y adicionalmente el día 2

y 3 se realizó tratamiento con FSH a dosis de 50mg de Hormona Folículo Estimulante FSH (2.5ml Foltropin^(R) IM BID) por día, en este caso, se usó la misma dosis tanto para novillas como vacas sin diferenciar tampoco entre tipo de raza. Todos los animales sincronizados fueron aspirados al Día 5.

Se determinó dar un descanso a las donadoras de en promedio de 20 días entre cada tratamiento y se realizaron un total de 119 sesiones de aspiración folicular.

Figura 1. Esquemas de estimulación hormonal para los diferentes grupos. De tratamiento (G1: control, G2: sincronización, G3: sincronización + FSH y G4: sincronización + eCG



2.2.3 Aspiración folicular

No se realizó un conteo folicular antes del inicio de los tratamientos. Previa aspiración folicular (D5) se realizó la evaluación del estatus ovárico mediante ultrasonografía en modo B con transductor microconvex de 7.5 MHz (DP-2200 Vet-Mindray-Nanshan, Shenzhen-China). Se realizó el conteo del número total de folículos presentes entre 6-9 mm, los cuales fueron la población de folículos a aspirar. De igual forma se evaluó la presencia de

folículo dominante (>10 mm) y/o la presencia de cuerpos lúteos. Se registró la cantidad de estructuras obtenidas en comparación con las contadas al inicio de la sesión (tasa de recuperación). Las donadoras fueron restringidas en un brete específico para bovinos y se procedió a realizar anestesia epidural con clorhidrato de Lidocaína al 2% a efecto; la zona perineal fue lavada y desinfectada; el transductor fue insertado por vía vaginal y al obtener la imagen del ovario y previo conteo y evaluación de estructuras ováricas se procedió a la aspiración folicular. Dicha aspiración folicular fue guiada por ultrasonografía transvaginal, con una guía de aspiración folicular a la cual se le conectó una aguja calibre 20G que a su vez se conectó a una bomba de vacío (BV 003-WTA-Cravinhos-SP-Brasil) con una presión de aspiración de 70 mm/Hg, a una tasa de 12-15 ml/min (Sendag et al., 2008).

Mediante un sistema de conducción, los complejos cumulus-oocitos (COC's) fueron recuperados en tubos Falcon® de 50ml, estériles y atemperados; el medio de colecta utilizado fue solución salina fisiológica enriquecida con suero fetal bovino al 1% y 10UI/ml de Heparina sódica (Ongaratto et al., 2020); este medio se encontraba en un rango de temperatura de 35 a 37 grados Celsius. El líquido folicular recuperado se pasó por un filtro con tamaño de poro de 75 µm con el fin de facilitar la recuperación de los COC's estudio se realizó la clasificación propuesta por (Sendag et al., 2008), dicho filtro fue lavado instilando con jeringa estéril el mismo medio de aspiración. Las sesiones de aspiración folicular fueron realizadas por dos operarios de la empresa Embriovet.

2.2.4 Procesamiento de los oocitos

Una vez obtenidos los complejos cúmulus-oocitos (COC's), fueron clasificados morfológicamente mediante estereoscopio (Olympus S22-ST)) así: Grado I: >4 capas de células del *cumulus*, citoplasma homogéneo, COC claro y transparente, Grado II: de 1-3 capas, citoplasma homogéneo pero con apariencia gruesa y tono más oscuro, Grado III: Sin capas de células del *cumulus*, citoplasma irregular con gránulos oscuros y tono más oscuro, Grado IV: *cumulus* expandido y con dispersión de las células del cumulus,

dispersas en la matriz, citoplasma irregular con gránulos oscuros, tono oscuro e irregular (Loos et al., 1989).

Los COC's grado I y II fueron lavados en 3 ocasiones en medio TCM-199 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y posteriormente pasaron a medio de maduración para ser procesados. La clasificación y procesamiento de laboratorio estaba a cargo de dos operarios de la empresa Embriovet.

2.2.5 Maduración, fertilización, cultivo.

Los COC's fueron incubados a 39°C y tensión de CO₂ al 5% en incubadora (Nuair-UN-5100-USA); los oocitos obtenidos de cada donadora se ubicaron en gotas de 100 µL de TCM-199 bic, suplementado con SFB 10%, 50 µg/ml LH, 5 µg FSH, 0.1 µg/mL Estradiol, 22 µg Piruvato de Na, 50 µg/mL Amikacina (Marcondes Seneda et al., 2001), durante 24 horas (5-10 oocitos por gota), cada gota cubierta con aceite mineral.

La fertilización *in vitro* (FIV) se realizó con semen tanto convencional (N= 86) como sexado (N= 33), de cada raza de cada donadora, previamente descongelado a 35 °C durante 30 segundos; posteriormente se seleccionaron los espermatozoides motiles por medio de la técnica de Percoll con gradientes de 90 y 45% y centrifugados a 9000 rpm por 5 min. Se realizó una segunda centrifugación (1000 rpm/ 3 min) con 1ml de medio de fertilización para capacitación de semen; se evaluó el pellet obtenido y se determinó la motilidad y concentración (da Silva et al., 2017). A cada gota de medio de fertilización (HEPES TALP suplementado con albúmina sérica bovina (BSA), cada gota con volumen de 60 µL y se disponían de 5 a 10 COC's, se le adicionaron 5 µL de semen con una dosis seminal de 1x10⁶ espermatozoides y se procedió a incubación por 16 a 18 horas a de 39°C y tensión de CO₂ del 5%.

Posteriormente para el procedimiento de cultivo, a los presuntos cigotos les fueron removidas las células del *cumulus* mediante pipeteo suave; se realizaron 3 lavados y posteriormente se pasaron a medio de cultivo el cual contenía, mSOF suplementado con SFB 1%, BSA 10%, L-glutamina y amikacina. El medio de cultivo se cambió parcialmente a los tres días, y se determinó la tasa de clivaje; los cigotos no fecundados se descartaron. Para el día 5 nuevamente se cambió parcialmente el medio de cultivo y al día 7 se evaluó la tasa de producción de embriones total (incluyendo mórulas y blastocitos). La clasificación de calidad de los embriones obtenidos se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por la IETS (Robertson & Nelson, 1998), así: Grado 1. Excelente: masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Las irregularidades deben ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. Grado 2. Bueno: irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular debe encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable. Grado 3. Regular: irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable. Grado 4. Malo (muerto o degenerado): embrión, oocitos degenerados, oocitos no fertilizados, no viables.

Para este estudio, los embriones grado I y II se consideraron aptos para la transferencia a las diferentes receptoras (las cuales hacen parte de otro estudio) y los restantes fueron descartados.

2.2.6 Análisis estadístico.

Este estudio fue realizado utilizando un diseño factorial cruzado de 5x4, así que todos los animales (n=25) pasaron por todos los tratamientos; el poder del estudio se calculó en un 80%. El tamaño de la muestra se estableció por conveniencia. El criterio de inclusión se basó en la disponibilidad de animales puros en buen estado de salud (sanitaria y

reproductiva). Para el análisis de los resultados se utilizó un modelo multivariado de medidas repetidas, como variables independientes se tomó la raza y el tratamiento, como covariables se tomó el número de partos y el tipo de semen utilizados para la FIV. A los post Hoc se les realizó prueba de Bonferroni. El análisis se realizó utilizando el programa SPSS Statistics 23 IBM.

Se establecieron comparaciones entre razas y tratamientos para las variables de tasa de recuperación de oocitos ($\#$ total de COC's recuperados / $\#$ total de folículos contados), tasa de COC's viables ($\#$ total de COC's puestos a MIV / $\#$ total de COC's recuperados), tasa de clivaje ($\#$ zigotos clivados / $\#$ total de COC's en FIV) y tasa de blastocistos ($\#$ de blastocistos producidos / $\#$ total de zigotos clivados en CIV).

2.3 Resultados

Se utilizaron 23 vacas donadoras de oocitos de las razas Brahman, Jersey, Gyr, Simmental y Holstein y se realizaron 119 sesiones de aspiración folicular. Se obtuvieron en promedio 14.1 ± 7.1 oocitos por sesión de aspiración folicular; la tasa de recuperación promedio de oocitos fue de $87.5 \pm 3.5 \%$ con un promedio de 12.5 ± 8.6 COC's recuperados por OPU; la tasa de Maduración obtenida fue en promedio de $88.5 \pm 2\%$; el promedio de oocitos viables sometidos a maduración fue 10.4 ± 8.0 de los cuales 9.3 ± 7.0 fueron sometidos a fertilización; la tasa de clivaje fue de $65.7 \pm 2.4 \%$ y la tasa de blastocistos $33.1 \pm 2.4\%$.

Tabla 1.

Tabla 1. Número total de folículos observados, tasas de recuperación, fertilización, clivaje y blastocistos, en vacas sometidas a (OPU) para producción de embriones *in vitro*.

Variable	N	Media	ES
Número total de folículos al momento de la OPU	119	14,1	7.1
Número de oocitos recuperados	119	12,5	8.4
Tasa de recuperación (%)	119	87,5	3.5

Número de COC's viables	119	10,4	8.0
Tasa de Maduración (%)	119	88,5	2.0
Tasa de Clivaje (%)	119	65,7	2.4
Tasa de Blastocistos (%)	119	33,1	2.4

2.3.1 Efecto del tratamiento sobre la producción de embriones in vitro

El número de folículos disponibles al momento de la OPU fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales tratados. El G2 de sincronización tuvo un promedio de 16.0 ± 1.3 folículos, el G3 sinc+FSH 15.6 ± 1.2 y el G4 Sinc+ eCG 15.5 ± 1.1 mientras que los no tratados, G1 Control, tuvieron un promedio de 11.9 ± 1.2 (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la estimulación exógena con gonadotropinas (grupo control, grupo sincronización, Sincronización + FSH y Sincronización + eCG) sobre el número de folículos observados al momento de la OPU, tasa de recuperación de COC's, tasa de COC's viables que pasaron a maduración, tasa de Clivaje y tasa de Blastocistos.

Variable	Grupo de tratamiento	Promedio	\pm ES	Valor de P
Número de folículos observados a la OPU	Control	11.9 ^b	1,2	0,035
	Sinc+FSH	15.6 ^a	1,1	0,035
	Sinc+eCG	15.5 ^a	1,1	0,032
	Sincronización	16.0 ^a	1,2	0,022
Tasa de recuperación de COC's %	Control	84.2	8,5	0,430
	Sinc+FSH	83.6	8,2	0,963
	Sinc+eCG	83.7	7,6	0,969
	Sincronización	93.0	8,7	0,470
Tasa de COC's viables a maduración	Control	85.0	4.1	0.976
	Sinc+FSH	80.7	4.3	1.000
	Sinc+eCG	75.5	4.2	1.000
	Sincronización	82.1	4.1	1.000

Tasa de Clivaje %	Control	60.9 ^a	5,5	0,152
	Sinc+FSH	49,8 ^a	5,3	0,001
	Sinc+eCG	69,2 ^{ab}	2,5	0,009
	Sincronización	75.4 ^{ac}	5,6	0,001
Tasa de Blastocito %	Control	33.9 ^a	5,8	0,130
	Sinc+FSH	21.7 ^b	5,5	0,030
	Sinc+eCG	32.5 ^a	5,2	0,157
	Sincronización	39.5 ^c	8,5	0,030

Las tasas de recuperación fueron similares para los cuatro grupos ($p > 0.05$). Siendo para el grupo control de $84.2 \pm 8.5\%$, para el grupo de sincronización $93 \pm 8.7\%$, para el grupo Sinc+FSH fue de $83.6 \pm 8.2\%$ y para el grupo Sinc+eCG fue de $83.7 \pm 7.6\%$.

Tampoco hubo un efecto significativo del tratamiento que redundara en mayores o menores tasas COC's viables ($p > 0.05$). La tasa de oocitos viables por OPU fue de $85 \pm 4.1\%$ para el G1 (grupo control), de $82.1 \pm 4.1\%$, para el G2 (Sincronización), de $80.7 \pm 4.3\%$, para el G3 (Sinc +FSH) y de $75.5 \pm 4.2\%$ para el G4 (Sinc+eCG).

En cuanto a la tasa de clivaje, el grupo tratado con FSH presentó una menor tasa de clivaje ($49.8 \pm 5,3$) comparado con los otros tres grupos ($p < 0.05$). Los otros tres grupos tuvieron tasas similares (Control 60.9 ± 5.5 ; sincronización 75.4 ± 5.6 y Sinc+eCG 69.2 ± 5.0) ($p > 0.05$). Tabla 2.

La tasa de blastocistos fue significativamente baja en los animales tratados con FSH (21.7 ± 5.5) ($p < 0.05$) en comparación con los demás grupos. Las tasas de blastocistos para los otros grupos fueron grupo Control (33.9 ± 5.8); grupo Sincronización (39.6 ± 5.9); y $32.5 \pm 5.2\%$ para el grupo Sinc+eCG. Tabla 2.

2.3.2 Efecto de la raza sobre la producción de embriones *in vitro*

La raza Brahman mostro un mayor número de folículos ($p < 0.05$) observados al momento de la OPU (19.4 ± 1.2), seguida de la Gyr (15.1 ± 1.1), Simmental (12.7 ± 1.5), Jersey (11.8 ± 1.4) y Holstein (8.8 ± 1.4); adicionalmente la raza Gyr tuvo un número significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con la raza Holstein.

Una tendencia similar se observa sobre el número de COC's viables que pasaron a maduración *in vitro*, para la raza Brahman fue de 17.9 ± 1.6 , seguido de la Jersey (10.4 ± 1.8), la Simmental (10.1 ± 2.7), la Gyr (9.2 ± 1.9) y por último la Holstein (8.8 ± 4.0). Se encontraron diferencias cuando se realizó la comparación entre razas. La raza Brahman fue significativamente mayor a la Jersey y a la Gyr, más no con las otras dos razas (Tabla 3).

Las tasas de recuperación en general son similares en todas las razas: Simmental (115 ± 10.3), Brahman (93.3 ± 8.2), Jersey (90.7 ± 9.6), Gyr (74.4 ± 7.8) y Holstein (71.5 ± 9.7). La raza Simmental tuvo una tasa de recuperación significativamente mayor ($p < 0.05$) comparada con las razas Holstein y Gyr. (Tabla 3)

Tabla 3. Efecto de la raza en la producción de embriones *in vitro*, parámetros posteriores a la estimulación ovárica con gonadotropinas en donadoras Brahman, Jersey, Gyr, Simmental y Holstein.

Variable	Raza	Media	Error Standard	Valor de P
Número de folículos observados a la OPU	Brahman	19.4 ^a	1.2	0,001
	Jersey	11.8 ^b	1.4	0,001
	Gyr	15.1 ^a	1.1	0,001
	Simmental	12.7 ^b	1.5	0,001
	Holstein	8.8 ^b	1.4	0,001

Numero de COC's recuperados	Brahman	20,7 ^a	1,7	0,025
	Jersey	12,3 ^b	2,0	0,025
	Gyr	10,7 ^b	1,9	0,003
	Simmental	16	2,9	0,125
	Holstein	10,8	4,3	0,247
Tasa de recuperación de COC's %	Brahman	93,3	8,2	0,102
	Jersey	90,7	9,6	0,089
	Gyr	74,4 ^b	7,8	0,002
	Simmental	115,0 ^a	10,3	0,002
	Holstein	71,5 ^b	9,7	0,003
Numero de COC's viables a MIV	Brahman	17,9 ^a	2	0,003
	Jersey	10,4 ^b	2	0,003
	Gyr	9,2 ^b	2	0,003
	Simmental	10,1	3	0,120
	Holstein	8,8	4	0,250
Tasa de Clivaje %	Brahman	72,3 ^a	5,3	0,021
	Jersey	65,6	6,3	0,415
	Gyr	55,0 ^b	5,0	0,021
	Simmental	67,4	6,7	0,569
	Holstein	64,6	6,3	0,354
Tasa de Blastocitos %	Brahman	38,5 ^a	5,6	0,010
	Jersey	39,7	6,5	0,896
	Gyr	23,9 ^b	5,3	0,010
	Simmental	27,6	7,0	0,225
	Holstein	32,8	6,5	0,514

La tasa de Clivaje fue similar para todas las razas: Brahman (72.3 ± 5.3), Simmental (67.4 ± 6.7) Holstein (64.6 ± 6.3), Jersey (65.6 ± 6.3) y Gyr (55.0± 5.0) (Tabla 3). Cuando se realiza la comparación pareada, hay una diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre la raza Gyr y Brahman siendo esta última superior.

La raza Gyr mostro la tasa más baja de blastocistos (23.9 ± 5.3) comparada con las otras razas, mientras que la raza Brahman (38.5 ± 5.6) y la Jersey (39.7 ± 6.5), mostraron las tasas de blastocistos más altas. La comparación pareada mostro que la raza Gyr tuvo la tasa de blastocistos más baja comparada con la Brahman y la Jersey (p<0.05). Tabla 3.

2.3.3 Efecto del número de partos de las donadoras sobre los parámetros en la producción de embriones *in vitro*

Existe una diferencia significativamente alta en el número de folículos ($p < 0.05$) presentes al momento de la OPU para las vacas primíparas (16.5 ± 1.5) comparadas con las vacas multíparas (12.9 ± 0.8). Por otra parte, los restantes parámetros no tuvieron diferencias. La tasa de recuperación de COC's fue de 95.5 ± 9.2 vs 85.4 ± 4.8 . la tasa de Clivaje fue de 64.4 ± 6.5 para las vacas primíparas y de 65.9 ± 3.4 para las vacas multíparas. Y la tasa de Blastocistos fue de 23.9 ± 6.3 para las vacas primíparas y de 31.1 ± 3.3 para el grupo de vacas multíparas. Tabla 4.

Tabla 4. Efecto del número de partos sobre la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas en los parámetros obtenidos en la producción de embriones *in vitro*.

Variable	Grupo	Media	Error Standard	Valor de P
Número de folículos observados a la OPU	Múltipara	12,9	0,8	0,001
	Primípara	16,5	1,5	
Tasa de recuperación de COC's %	Múltipara	85,4	4,8	0,9
	Primípara	95,5	9,2	
Tasa de Clivaje %	Múltipara	65,9	3,4	0,7
	Primípara	64,4	6,5	
Tasa de Blastocitos %	Múltipara	31,1	3,3	0,5
	Primípara	23,9	6,3	

2.3.4 Efecto del semen sexado versus convencional sobre los parámetros en la producción de embriones *in vitro*.

No se encontró un efecto significativo sobre la producción de embriones *in vitro*, cuando se comparó el tipo de semen ya fuera sexado o convencional; sin embargo, hubo una tendencia a ser mayor para el semen convencional. La tasa de Clivaje fue de 65.6 ± 3.0 y 36.1 ± 3.2 para semen convencional y sexado respectivamente y la tasa de Blastocitos de 59.6 ± 5.4 y 23.4 ± 5.7 para semen convencional y sexado respectivamente. Tabla 5.

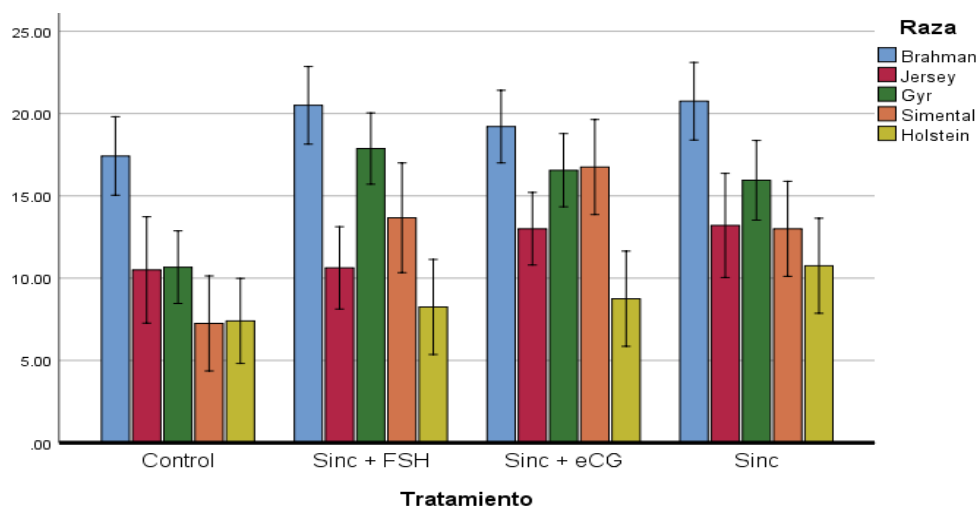
5. Efecto del uso de semen sexado vs convencional en la producción de embriones *in vitro* posterior a la estimulación ovárica con gonadotropinas

Variable	Tipo de semen	Media	Error Standard	Valor de P
Tasa de Clivaje %	Convencional	65,6	3,0	0,33
	Sexado	59,6	5,4	
Tasa de Blastocitos %	Convencional	36,1	3,2	0,055
	Sexado	23,4	5,7	

2.3.5 Comparación del efecto del tratamiento en cada raza sobre los parámetros en la producción de embriones *in vitro*.

En esta comparación se observó en general la misma tendencia que hemos presentado en los resultados anteriores y es que, por ejemplo, en el caso de la cantidad de folículos observados pre OPU, la raza Brahman ($p < 0.05$) tuvo los mejores resultados con los tratamientos en comparación con el control comparado con las demás razas evaluadas como lo podemos evidenciar en la Grafica 1.

Grafica 1. Interacción de la raza con los diferentes tratamientos en las diferentes razas



En cuanto a las tasas de recuperación, maduración, clivaje o blastocistos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el análisis de la interacción raza x tratamiento.

2.4 Discusión

Pocos estudios han reportado resultados de tratamientos enfocados a mejorar la tasa de recuperación de oocitos de vacas de diferentes razas en procedimientos de OPU in vivo. En nuestro estudio, todos los animales fueron sometidos a cuatro tratamientos con el fin de investigar si se lograba una mayor tasa de recuperación de oocitos y así incrementar la tasa de embriones para transferencia. Adicionalmente se evaluaron cinco razas con el fin de detectar un efecto por raza tanto en animales *B. indicus* como *B. taurus*.

La estimulación con gonadotropinas (FSH o eCG) busca incrementar los niveles circulantes de FSH y que se mantengan entre 36 a 72 horas con el fin de aumentar la población folicular para la OPU. De esta manera se busca “rescatar” de la atresia fisiológica folículos que puedan proveer oocitos competentes para producción de embriones in vitro y así aumentar la población de folículos disponibles al momento de la aspiración folicular (Bó & Mapletoft, 2020; da Silva et al., 2017).

Para nuestro estudio, se detectó un efecto positivo de cualquiera de los tratamientos sobre el número de folículos de tamaño medio (3-6mm) al momento de la OPU comparado con el grupo no tratado. Sin embargo, no se detectó un efecto significativo del uso de las gonadotropinas comparado con el grupo que solo se sometió a sincronización de la onda folicular; es decir que según nuestros resultados no se justificaría utilizar la estimulación con las dosis de gonadotropinas utilizadas considerando que este tratamiento incrementaría los costos del procedimiento de manera infructuosa.

Las altas tasas de recuperación (87%) y fertilización (88.5%), no se vieron reflejadas en un incremento en las tasas de clivaje (65.7%) y de blastocistos (33.1%) al final de la técnica y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre tratamientos. En este sentido, diversos factores pueden influir; intrínsecos como la población de folículos antrales presentes en la donadora y el estado en el que se encuentre la onda folicular al momento de realizar la estimulación hormonal (Bó et al., 2019). Extrínsecos tales como la raza, edad de las donadoras, el estatus general, nutrición, etc (P. S. Baruselli et al., 2012). En nuestro estudio se observó una tendencia similar en cuanto a la disminución progresiva de los diferentes parámetros a lo largo de la técnica, a la reportada por Vieira et al., (2014) quien informó una tasa de recuperación del 59%, tasa de clivaje de 63% y tasa de blastocistos de 17% en animales estimulados con FSH y por (da Silva et al., 2017) con tasas de clivaje del 64% y de blastocistos del 22-30%. En el presente estudio y los citados, la estimulación con FSH fue similar, sin embargo, en dichos estudios se utilizó solamente la raza Holstein y en nuestro estudio quisimos probar los tratamientos en diferentes razas tanto de tipo *taurus* como *indicus*. Aunque los resultados en general en diferentes estudios son divergentes, son muchos los factores que pueden influir, el hecho de usar dosis fijas y no decrecientes de FSH podría llegar a alterar el descenso fisiológico del aporte de FSH que se observa durante el reclutamiento folicular (da Silva et al., 2017).

De igual forma, en el presente estudio, comparando tasas de recuperación en animales estimulados con eCG, se obtuvieron resultados similares a los reportados por la literatura (83.7%) sin embargo no hay diferencias estadísticamente significativas en comparación con animales control (81.1%), sincronizados (92.9%) o estimulados con FSH (83.6%) aunque en general son tasas relativamente altas. Un estudio realizado en vacas y novillas reportó tasas de recuperación entre el 64-76% en las diferentes dosificaciones de eCG (200, 400, 800UI eCG) sin embargo, dichas tasas de recuperación fueron menores en comparación con los animales no estimulados (Ribas et al., 2018). En el presente estudio la estimulación se realizó con eCG a 400UI para vacas y 240UI para novillas, y de nuevo, aunque las tasas de recuperación son altas, no redundaron en un incremento en las tasas de clivaje (69.2%) o blastocistos (32.5%).

La estimulación con gonadotropinas mostró un efecto benéfico en cuanto a aumentar la población folicular en comparación con el control, pero no en la calidad de COC's recuperados o en las tasas de clivaje y blastocistos, el uso de FSH tuvo los resultados más bajos (49.7 ± 5.3 y 21.6 ± 5.5 respectivamente) en comparación con los animales control (60.8 ± 5.5 y 33.9 ± 5.7), eCG (69.1 ± 4.9 y 32.5 ± 5.1) y Sincronización (75.4 ± 5.6 y 39.5 ± 5.8). Así que, de nuevo, encontramos que la estimulación con gonadotropinas con el fin de incrementar resultados en un programa de producción de embriones *in vitro* puede ser remplazada solo por la sincronización de la onda folicular, mejorando la eficiencia de la misma.

El uso de FSH ha sido reportado en varios estudios para OPU con el fin de generar estimulación ovárica. Teniendo en cuenta la vida media corta de la FSH, se han propuesto diferentes protocolos, los cuales han mostrado el influjo positivo de la misma sobre la población de folículos disponibles al momento de la OPU. En un estudio con 30 animales de raza Holstein, se demostró un incremento en el número de folículos de tamaño medio (6-10mm) al momento de la OPU en el 50% de animales tratados con pFSH vs 17% para los animales control; de igual forma la proporción de folículos clasificados de tamaño pequeño (<6mm) fue menor (38%) en comparación con los animales control donde fue de 69%; lo cual muestra que dicha estimulación logró aumentar la población de folículos

aspirables (6-10 mm) al momento de la OPU (Vieira et al., 2014) . En el presente estudio se encontraron resultados estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) sobre el número de folículos presentes a la OPU en los animales tratados comparados con el control, siendo en promedio de 15.6 ± 1.2 para los animales estimulados con FSH y de 11.9 ± 1.2 para el grupo control, sin embargo, esa misma diferencia fue evidenciada en los grupos estimulados con eCG (15.5 ± 1.1) o los que fueron sometidos a sincronización de la onda folicular (16 ± 1.3).

Se han probado diferentes protocolos y dosificaciones para llevar a cabo la estimulación ovárica con FSH (Kajihara et al., 1991.; Taneja et al., 2000). Un estudio comparó dos regímenes de estimulación con FSH previa a la aspiración folicular con una dosis total de 200 mg, dividida en 4 (72-48 hrs pre OPU) o 6 aplicaciones (84-24 hrs pre OPU); se evidenció un mejor resultado con el protocolo de dosificación dividido en 4 ocasiones, encontrando una mayor proporción de folículos mayores de 6 mm (20 ± 2) comparada con las 4 aplicaciones (16 ± 1.9) (da Silva et al., 2017). Así mismo, se reportó un efecto positivo en el número de folículos disponibles de tamaño medio (6-10 mm) en los animales tratados (18 ± 1.4) vs los animales control (5.2 ± 0.5). pero no hubo efecto del tratamiento con FSH o del régimen de administración (4 o 6 aplicaciones) para las tasas de clivaje ni de blastocistos, lo cual pudimos contrastar en el presente estudio ya que las tasas de recuperación, clivaje y de blastocistos no fueron incrementadas con relación a la administración de la FSH. En nuestro caso, se usó la dosis de 200mg divididos en 4 aplicaciones (BID por 2 días) entre 48-24 hrs pre OPU como lo reporta (Vieira et al., 2014) basándonos en los mejores resultados reportados en cuanto a la población de folículos al momento de la OPU (da Silva et al., 2017). Sin embargo, aunque en este estudio se demostró ese efecto positivo de la administración de FSH en el incremento del número de folículos pre OPU, no fue así para las tasas de recuperación, clivaje o blastocistos.

En las comparaciones entre razas en cuanto a la población folicular, fue posible evidenciar diferencias significativas entre razas, encontrando mejores resultados para la raza Brahman de tipo *indicus*, comparada con la raza Holstein de tipo *taurus*. En ese sentido el

factor raza fue considerado en este estudio como un factor importante que se quiso evaluar.

Un estudio del 2008 encontró que los animales de tipo *Bos indicus* (Nelore, Gyr y Nelore x Gyr) tuvieron un mayor número de folículos reclutados por cada onda folicular y un diámetro inferior del folículo dominante en la desviación y la ovulación en comparación con los *Bos taurus* (Gimenes et al., 2008). Así mismo al comparar novillas Nelore y Holstein, los animales de tipo *Bos indicus*, tuvieron mejores resultados en cuanto al número de folículos visualizados pre OPU, número de COC's recuperados, número de COC's viables y tasa de clivaje (Gimenes et al., 2015). En el presente estudio se pudo demostrar resultados estadísticamente significativos en el número de folículos presentes a la OPU en animales de tipo *indicus* como la Brahman (19.4 ± 1.2) y Gyr (15.1 ± 1.1) comparados con animales de tipo *Taurus* como los Holstein (8.8 ± 1.4) y; de igual forma el efecto positivo se mantuvo en el número de COC's recuperados con mejores resultados en la raza Brahman (20.6 ± 1.7) vs la Jersey (12.2 ± 1.9) y la Gyr (10.7 ± 1.9). Es importante resaltar que la raza Gyr a pesar de ser *Bos indicus* no mostró diferencias favorables con relación a las otras razas, En cuanto al número de COC's viables la raza Brahman también mostró mejores resultados ($p < 0.05$) (17.9 ± 1.6) comparados con la raza Jersey (10.4 ± 1.8) y la raza Gyr (9.2 ± 1.7). Estas comparaciones se realizaron sin tener en cuenta el protocolo de estimulación. Fue interesante encontrar un efecto de la raza sobre la tasa de recuperación, siendo superior para la raza Simmental (115 ± 10 $p < 0.05$) comparado con animales Gyr y Hosltein. Aunque no es claro por qué esta diferencia, se puede especular que puedo ser debido a una mayor facilidad para aspirar las vacas Simmental comparada con la Brahman o a la aspiración de folículos de otros tamaños dando como resultado un mayor número de oocitos obtenidos. A pesar de esta mayor tasa de recuperación las demás tazas de producción no fueron mejores comparándola con las otras razas.

Los datos obtenidos en el presente estudio son parcialmente comparables con lo reportado por (Pontes et al., 2010), quien demostró que la media para el número de oocitos recuperados fue mayor en animales Gyr vs Holstein (17 ± 4.5 vs 11 ± 3.9) así como en el número de oocitos viables (12 ± 3.9 vs 8 ± 2.7). Sin embargo, hay otro estudio en el cual

no se encontró un efecto de la raza o interacción de la raza con relación al tratamiento en animales de tipo *Bos taurus* comparado con un híbrido (Angus-Brangus) (Ongaratto et al., 2015) por lo tanto , los resultados son muy variables en la literatura reportada.

Otro factor para tener en cuenta dentro de los programas de producción de embriones *in vitro* es la calidad o competencia de los oocitos recuperados. Diferentes autores han reportado una mayor competencia de los oocitos obtenidos de folículos de tamaño medio (3-9 mm) al momento de la aspiración (Blondin et al., 2002; Blondin & Sirard, 1995b; Nivet et al., 2012). La competencia de desarrollo se refiere a la capacidad del oocito recuperado de convertirse en un embrión transferible. In vivo, ésta aumenta con relación al desarrollo folicular y la cercanía al pico de LH; dicho pico de LH favorece la maduración final del folículo y del oocito (Hsueh et al., 1994). Un estudio que recuperó oocitos provenientes de ovarios de planta de beneficio y de los cuales se aspiraron folículos de 6-8 mm tuvieron mayor competencia de desarrollo, que los recuperados de folículos de tamaño <4 mm (Lequarre et al., 2005). En el presente estudio se realizó, además de la estimulación con gonadotropinas, la sincronización de la onda folicular y así obtener una mayor población de folículos de tamaño medio (6-9 mm) al momento de la OPU; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en esta variable en cuanto a la comparación de los tratamientos.

De acuerdo con los resultados tan variables reportados y encontrados, no solo se debe tener en cuenta el objetivo de aumentar la cantidad de folículos disponibles por sesión de aspiración folicular, sino también, que se vea reflejado en un mayor número de oocitos obtenidos competentes. Incrementar el número de folículos disponibles no necesariamente provee un ambiente folicular ideal para adquirir competencia (Blondin et al., 1997) Un estudio evaluó la relación entre la morfología de los oocitos recuperados de folículos antrales de tamaño pequeño y su competencia de desarrollo (Nagano, 2018). La clasificación de los oocitos se realizó de acuerdo con las características morfológicas en siete grados y posteriormente fueron sometidos a maduración, fertilización y cultivo. Los resultados indicaron que los oocitos de las primeras tres categorías, tuvieron mayores tasas de clivaje y de blastocistos. Rutinariamente en los programas de producción de

embriones *in vitro*, se realiza una clasificación de los oocitos obtenidos en relación con su morfología, sin embargo, otro estudio sugiere que la clasificación dada por la apariencia morfológica no garantiza un adecuado desarrollo embrionario ya que éste es multifactorial y demostró que los oocitos que se consideraron de peor calidad (grado III), tuvieron mejor potencial de desarrollo embrionario medida por la tasa de blastocistos al día 7 (GIII 47% vs GII 28%) (de Bem et al., 2014). Así mismo, (Gimenes et al., 2015) menciona que la estimulación folicular podría dar lugar a una población de folículos acumulada (en regresión y nueva cohorte de folículos), lo cual podría explicar en alguna medida por qué razón se logra tener una mayor población de folículos aspirables sin que se refleje en un incremento en las tasas de embriones transferibles. En el presente estudio se realizó la clasificación propuesta por (Loos et al., 1989) y se seleccionaron solamente los oocitos grado 1 y 2.

En cuanto a la competencia de los oocitos recuperados, un estudio reportó que la estimulación con eCG afectó negativamente el metabolismo lipídico, la protección contra el estrés oxidativo y el desarrollo como tal del oocito (Franchi et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado que la eCG puede mostrar una estimulación más prolongada por su vida media circulante lo cual causa mayor proporción de folículos no ovulados, alteraciones en perfiles endocrinos y menor calidad en oocitos y embriones (Greve et al., 1983). En nuestro caso este efecto no se detectó y aunque dentro de los objetivos del presente estudio, no se determinó establecer diferencias a este nivel valdría la pena explorar otras formas de evaluar la competencia del oocito con el fin de procesar solo los oocitos que puedan tener mejor potencial de desarrollo.

En cuanto a las comparaciones entre novillas y vacas hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a la población folicular al momento de la OPU donde las novillas presentaron la población más alta sin embargo esto no se vieron reflejados en las tasas de recuperación, clivaje y blastocistos. Cabe resaltar que, aunque se habla de novillas, no se trata de animales muy jóvenes ya que las edades oscilaron entre 2-4 años, lo que puede explicar en alguna medida que no se encontraran más diferencias en las comparaciones con las vacas de mayor edad. De igual forma, también es importante aclarar que este análisis de comparación entre novillas y vacas solamente se realizó para las razas

Brahman (3 novillas) y Gyr (2 novillas) que fueron las que tuvieron esta diversidad en los grupos.

El uso de semen sexado en la producción de embriones *in vitro*, supone una herramienta eficiente para incrementar la ganancia genética en un programa de cría (Seidel, 2014), sin embargo, se reporta que su uso puede tener una influencia negativa en los resultados, teniendo en cuenta por ejemplo los daños a nivel espermático en el proceso como tal del sexaje, entre otros (Hollinshead et al., 2003; Suh et al., 2005). En el presente estudio no se encontró una diferencia significativa en cuanto a la producción de embriones *in vitro* usando semen sexado o convencional, aunque se resalta una tendencia de mejores resultados con semen convencional en cuanto a tasas de clivaje y blastocistos, un estudio realizado en 2020 usando ovarios de vacas Holstein obtenidos de planta de beneficio, comparó la viabilidad de los embriones obtenidos con el uso de semen sexado y convencional, en dicho estudio, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en las tasas de clivaje o blastocistos (Magata et al., 2021).

2.5 Conclusión

En el presente estudio se encontró que el uso de gonadotropinas con el fin de incrementar la población de folículos presentes a la OPU a las dosis utilizadas no mejoró la tasa de producción *in vitro* de embriones en las razas utilizadas.

Aunque la población folicular se pudo ver incrementada con los diferentes tratamientos, no se mejoró la producción de blastocistos. Sin embargo, si se encontró un efecto favorable de la sincronización de la onda folicular pre OPU. Por consiguiente, se recomienda, el uso de la sincronización de la onda folicular pre OPU.

2.6 Bibliografía

- Alvarez, P., Spicer, L. J., Chase, C. C., Payton, M. E., Hamilton, T. D., Stewart, R. E., Hammond, A. C., Olson, T. A., & Wettemann, R. P. (2000). Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. In *J. Anim. Sci* (Vol. 78). <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/5/1291/4668492>
- Baruselli, P., Jacomini, J. O., Sales, J. N., & Creoidal, G. A. (2008). importancia do emprego de eCG em protocolos de IA, TE e IATF. *III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, January.
- Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., Vieira, L. M., Mendanha, M. F., & Bó, G. A. (2012a). Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), 134–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x>
- Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard, M.-A. (2002). Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 66). <http://www.bioreprod.org>
- Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* 1997; 48:803–813
- Blondin, P., & Sirard, M. -A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1), 54–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Bó, G. A., Cedeño, A., & Mapletoft, R. J. (2019). Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 411–422. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0042>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>
- Bogotá DC. (2009). *Lino Andrés Oyuela Universidad Nacional Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Maestría en Salud Animal*.
- Cavaliere, F. L. B., Morotti, F., Seneda, M. M., Colombo, A. H. B., Andreazzi, M. A., Emanuelli, I. P., & Rigolon, L. P. (2018). Improvement of bovine in vitro embryo

- production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 117, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>
- Chaubal, S. A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Rezamand, P., Tian, X., & Yang, X. (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, 67(4), 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.022>
- da Silva, J. C. B., Ferreira, R. M., Maturana Filho, M., Naves, J. de R., Santin, T., Pugliesi, G., & Madureira, E. H. (2017). Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 90, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.016>
- De Bem, T. H. C., Adona, P. R., Bressan, F. F., Mesquita, L. G., Chiaratti, M. R., Meirelles, F. V., & Leal, C. L. V. (2014). The Influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and bax transcripts on the developmental competence of bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 576–583. <https://doi.org/10.1111/rda.12325>
- Duffy, P., Crowe, M. A., Austin, E. J., Mihm, M., Boland, M. P., & Roche, J. F. (2004). The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology*, 61(4), 725–734. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00255-3)
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F., & Ross, P. J. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 55, Issue 6, pp. 659–676). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>
- Franchi, F. F., Satrapa, R. A., Fontes, P. K., Santos, P. H., Razza, E. M., Emanuelli, I. P., Ereno, R. L., Mareco, E. A., Nogueira, M. F. G., Barros, C. M., & de Souza Castilho, A. C. (2019). Equine chorionic gonadotropin drives the transcriptional profile of immature cumulus-oocyte complexes and in vitro-produced blastocysts of superstimulated Nelore cows. *Molecular Reproduction and Development*, 86(11), 1639–1651. <https://doi.org/10.1002/mrd.23251>
- Gimenes, L. U., Ferraz, M. L., Fantinato-Neto, P., Chiaratti, M. R., Mesquita, L. G., Sá Filho, M. F., Meirelles, F. V., Trinca, L. A., Rennó, F. P., Watanabe, Y. F., & Baruselli, P. S. (2015). The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, 83(3), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.030>
- Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Carvalho, N. A. T., Torres-Júnior, J. R. S., Souza, A. H., Madureira, E. H., Trinca, L. A., Sartorelli, E. S., Barros, C. M., Carvalho, J. B. P.,

-
- Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, *69*(7), 852–858. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001>
- Hollinshead, F. K., Gillan, L., O'Brien, J. K., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2003). In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction, Fertility and Development*, *15*(5–6), 351–359. <https://doi.org/10.1071/rd03060>
- Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., & Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, *82–83*, 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.013>
- Kajihara, Y., Blakewood, E., Yyersz Konetani, Y. N., Goto, K., & Godke, B. (n.d.). *Theriogenology In Vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves
- Lequarre, A. S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H., & Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, *63*(3), 841–859. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>
- Loos, F. D., van Wet, C., van Maurik, P., & Kruip, T. A. M. (1989). Morphology of Immature Bovine Oocytes. In *Gamete Research*.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., & Tomanek, M. (2004a). Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, *61*(2–3), 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4)
- Magata, F., Urakawa, M., Matsuda, F., & Oono, Y. (2021). Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Theriogenology*, *161*, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.001>
- Marcondes Seneda, M., Roberto Esper, C., Mansano Garcia, J., Ademir De Oliveira, J., & Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 67).
- Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hashiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P., & Imai, K. (2014). Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science*, *97*(2), 743–753. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6838>

- Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential too. *Animal Reproduction*, 9(3), 223–230.
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*.
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 64(6), 195–201.
- Nagano, M., Hishinuma, M., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2007). The Relationship Between Oocyte Morphology and Ovarian Status in Cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 953–958. <https://doi.org/10.1262/jrd.19022>
- Nivet, A. L., Bunel, A., Labrecque, R., Belanger, J., Vigneault, C., Blondin, P., & Sirard, M. A. (2012). FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, 143(2), 165–171. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0391>
- Nogueira, M. F. G., Buratini, J., Price, C. A., Castilho, A. C. S., Pinto, M. G. L., & Barros, C. M. (2007). Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 74(6), 680–686. <https://doi.org/10.1002/mrd.20656>
- Ongaratto, F. L., Cedeño, A. v., Rodriguez-Villamil, P., Tríbulo, A., & Bó, G. A. (2020a). Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. *Animal Reproduction Science*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>
- Ongaratto, F. L., Tribulo, A., & Bó, G. A. (2015). *Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle*. 876–883.
- Pontes, J. H. F., Silva, K. C. F., Basso, A. C., Rigo, A. G., Ferreira, C. R., Santos, G. M. G., Sanches, B. v., Porcionato, J. P. F., Vieira, P. H. S., Faifer, F. S., Sterza, F. A. M., Schenk, J. L., & Seneda, M. M. (2010). Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74(8), 1349–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>
- Ribas, B. N., Missio, D., Junior Roman, I., Neto, N. A., Claro, I., dos Santos Brum, D., & Leivas, F. G. (2018). Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195(March), 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.006>
- Sartori, R., & Barros, C. M. (2011a). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006>

-
- Seidel, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8(SUPPL. 1), 160–164. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000202>
- Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Hadelar, K. G., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 106(1–2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.007>
- Suh, T. K., Schenk, J. L., & Seidel, G. E. (2005). High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64(5), 1035–1048. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.002>
- Taneja, M., Bols, P. E. J., van de Velde, A., Ju, J.-C., Schreiber, D., Tripp, M. W., Levine, H., Echelard, Y., Riesen, J., & Yang, X. (2000). Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation 1. In *206 BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 62). <http://www.biolreprod.org>
- Vassena, R., Mapletoft, R. J., Allodi, S., Singh, J., & Adams, G. P. (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, 60(5), 923–932. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00101-8)
- Viana, J. (n.d.). *2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos*.
- Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., Sá Filho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>
- Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Mendanha, M. F., Sá Filho, M. F., Sales, J. N. S., Souza, A. H., Santos, J. E. P., & Baruselli, P. S. (2014). Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*, 82(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.018>

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

La administración de gonadotropinas se propuso con el fin de incrementar la población folicular al momento de la realización de la aspiración folicular y que esto tuviera un impacto positivo en las tasas de embriones viables. Sin embargo, encontramos que el incremento en la población folicular no necesariamente se ve reflejada en una mayor tasa de blastocisto en los animales estimulados con gonadotropinas a las dosis empleadas. Sin embargo, con la sola sincronización de la onda folicular con GnRH y P4, se logró incrementar el número de folículos previos a la OPU, por lo tanto, éste protocolo es más eficiente en estos programas de producción de embriones *in vitro*, teniendo en cuenta que disminuye la manipulación de los animales y los costos asociados a los tratamientos farmacológicos con gonadotropinas.

La raza Brahman presentó los resultados más altos en general para la producción de embriones *in vitro*, mientras que la Holstein tuvo resultados inferiores en comparación con las diferentes razas estudiadas.

Es de anotar que este trabajo se realizó con el fin de divulgar información científica al respecto de las estrategias para optimizar la producción de embriones *in vitro*, teniendo en cuenta que, en Colombia, no se tenían dichos estudios enfocados principalmente a las donadoras de embriones y de diferentes razas.

3.2 Recomendaciones

1. Se puede hacer uso de semen sexado en la producción de embriones *in vitro* asegurando la selección de género que convenga a cada sistema productivo.
2. Aunque en el presente estudio la cantidad de animales jóvenes o primíparas vs vacas multíparas es muy pequeña, se podría realizar un estudio que controle la cantidad de animales en cada grupo etario con el fin de analizar el efecto de la edad en los diferentes parámetros de la producción de embriones *in vitro*.
3. Se recomienda hacer uso de la sincronización de la onda folicular como herramienta para aumentar la cantidad de folículos disponibles al momento de la aspiración folicular sobre todo en animales que se pueden ver beneficiados con este aumento tales como los animales de tipo Taurus sin que eso quiera decir que a los animales de tipo indicus no se les pueda incrementar el mayor pool folicular que de por sí ya presentan.
4. En cuanto al uso de las gonadotropinas, se recomienda realizar estudios comparativos dosis-efecto en diferentes razas.
5. Se recomienda medir el efecto del tiempo de transporte de los oocitos al laboratorio de producción de embriones *in vitro*, así como también el efecto del operario tanto en la aspiración folicular como a nivel de laboratorio.

