

**Bouhier, Marina**

*Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria  
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Bouhier, M. 2016. Categorización de estructuras ováricas : relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/categorizacion-estructuras-ovaricas-especie-bovina.pdf> [Fecha de consulta:.....]

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA  
ARGENTINA**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Ingeniería en Producción Agropecuaria**

**Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario *in vitro* en la especie bovina.**

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:  
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Marina Bouhier, n° registro: 05-0900-794

Profesor Tutor: Ing. P.A. Marina Sansiñena, M.Sc., Ph.D.

Investigador Adjunto UCA-CONICET

Fecha: Agosto de 2016

## Resumen

El objetivo de la siguiente investigación fue analizar la relación entre la morfología del ovario y la presencia de ciertas estructuras ováricas (folículo dominante, cuerpo lúteo), y la producción *in vitro* de embriones. A través de dos experimentos se buscó evaluar el efecto de la clasificación anatómica del ovario en (a) el número y la calidad de ovocitos recuperados mediante la técnica de punción folicular, y en (b) la maduración *in vitro* y desarrollo embrionario luego de la activación partenogenética. La clasificación anatómica se basó en tres categorías ováricas distinguidas por presencia o ausencia de ciertas estructuras ováricas y por diámetro folicular: (1) CL con presencia de cuerpo lúteo y folículos de diámetro  $\leq 8$  mm, (2) PRO en etapa de proestro, folículos en crecimiento y de diámetro  $\leq 8$  mm, (3) DOM con presencia de folículo dominante de diámetro  $\geq 15$  mm. Se trabajó con 2.583 ovocitos provenientes de ovarios de frigorífico de vacas y vaquillonas en diferentes estados fisiológicos. Los resultados obtenidos reflejaron que los ovocitos provenientes de ovarios categoría PRO presentaron el mayor porcentaje de recuperación ovocitaria (51,44%) y el mayor porcentaje de ovocitos grado 1 y 2 (66,33%), es decir los de mejor calidad, citoplasma compacto, mayor número de capas de células del cúmulus. Respecto del porcentaje de maduración no hubo diferencias significativas entre las tres categorías ováricas (P-valor = 0,1739). Finalmente, sí se observaron diferencias en el desarrollo a blastocistos. La categoría PRO fue significativamente mayor respecto de la categoría DOM, no habiendo diferencias entre dichas categorías y la categoría CL. Se pudo demostrar que, bajo condiciones de cultivo semejantes, los ovocitos provenientes de ovarios DOM presentaron una calidad inferior para evolucionar hasta el estadio de blastocistos cuando se los compara con aquellos provenientes de la categoría PRO, pudiendo deberse al efecto inhibitorio que ejerce el folículo dominante sobre el resto de los folículos.

## Abstract

*The aim of this investigation was to analyze the relationship between morphological classification of the ovary and the presence of anatomical structures as dominant follicle or corpus luteum, and in vitro embryo production. Two experiments were conducted to assess the effect of anatomical classification of the ovary and (a) the number and quality of oocytes recovered by aspiration method, and (b) and in vitro maturation and embryo development after parthenogenetic activation. Ovaries were divided into three morphological classes based on the presence or absence of certain ovarian structures and follicles diameter: (1) CL bearing a corpus luteum and follicles of  $\leq 8$  mm diameter, (2) PRO ongoing proestro stage with growing follicles of  $\leq 8$  mm diameter, (3) DOM with a dominant follicle of  $\geq 15$  mm diameter. After aspiration, cúmulus-oocyte complexes were classified according to morphological criteria into 5 grades. Grade 1 and 2 were destined to in vitro maturation regarding its higher quality, homogeneous cytoplasm and compact cúmulus with more than 5 layers. There were 2.583 oocytes recovered from slaughterhouse ovaries from cows and heifers in different estrous stages. The present results demonstrated that oocytes from PRO-ovaries showed the highest percentage of*

*oocyte recovery (51,44%) and quality (66.33%). There were no differences in the percentage of in vitro maturation among the three ovarian classes (P-value = 0,1739). Differences were found in embryo development as oocytes from PRO-ovaries showed higher percentages of blastocysts than oocytes from DOM-ovaries. Nevertheless, there were no differences in blastocysts rates between both previous categories and oocytes from CL-ovaries. The results showed that under the same in vitro conditions, oocytes from DOM-ovaries had lower developmental competences to reach blastocyst stage than oocytes from PRO-ovaries, probably due to the inhibitory effects of the dominant follicle over the rest of follicles.*

## **Índice de contenidos:**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción y objetivos.....</b>                       | <b>5</b>  |
| <b>2. Revisión bibliográfica</b>                              |           |
| 2.1. Anatomía y fisiología del ovario bovino                  |           |
| 2.1.1. Estructuras.....                                       | 7         |
| 2.1.2. Revisión del ciclo estral.....                         | 9         |
| 2.2. Técnicas reproductivas                                   |           |
| 2.2.1. Inseminación artificial y congelación de semen.....    | 12        |
| 2.2.2. Sincronización e inducción de la ovulación.....        | 12        |
| 2.2.3. Superestimulación ovárica.....                         | 12        |
| 2.2.4. Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV).....     | 13        |
| 2.2.5. Clonado, congelación y transferencia de embriones..... | 15        |
| <b>3. Materiales y métodos.....</b>                           | <b>15</b> |
| <b>4. Resultados</b>  |           |
| 4.1. Experimento 1 a.....                                     | 26        |
| 4.2. Experimento 1 b. ....                                    | 27        |
| 4.3. Experimento 2 a. ....                                    | 28        |
| 4.4. Experimento 2 b. ....                                    | 29        |
| <b>5. Discusión.....</b>                                      | <b>30</b> |
| <b>6. Conclusiones.....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>7. Anexo de imágenes.....</b>                              | <b>32</b> |
| <b>8. Agradecimientos.....</b>                                | <b>36</b> |
| <b>9. Bibliografía.....</b>                                   | <b>37</b> |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 01.</b> Evolución del número de embriones bovinos en América del Sur.....                | 5  |
| <b>Figura 02.</b> Foliculogénesis y ovogénesis.....  | 9  |
| <b>Figura 03.</b> Ciclo estral de la hembra bovina.....  | 11 |
| <b>Figura 04.</b> Medios para punción y maduración.....  | 19 |
| <b>Figura 05.</b> Clasificación ovárica utilizada para el trabajo.....                             | 20 |
| <b>Figura 06.</b> Clasificación de ovarios y atemperado.....                                       | 20 |
| <b>Figura 07.</b> Grados de clasificación ovocitaria.....  | 22 |
| <b>Figura 08.</b> Ovocitos luego de 22-24 horas de maduración <i>in vitro</i> .....                | 23 |
| <b>Figura 09.</b> Visualización de ovocitos maduros e inmaduros post activación partenogénica..... | 24 |
| <b>Figura 10.</b> Ovocitos luego de 48 horas de cultivo <i>in vitro</i> (lupa).....                | 24 |
| <b>Figura 11.</b> Ovocitos luego de 48 horas de cultivo <i>in vitro</i> (microscopio).....         | 25 |
| <b>Figura 12.</b> Diferentes estadios ovocitarios post activación partenogénica.....               | 25 |

## Índice de gráficos

|   |    |
|---|----|
| <b>Grafico 01.</b> Resultados experimento 1a..... | 26 |
| <b>Grafico 02.</b> Resultados experimento 1b..... | 28 |
| <b>Grafico 03.</b> Resultados experimento 2a..... | 29 |
| <b>Grafico 04.</b> Resultados experimento 2b..... | 30 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 01.</b> Composición del medio de maduración TCM.....     | 19 |
| <b>Tabla 02.</b> Resultados experimento 1a.....                   | 26 |
| <b>Tabla 03.</b> Rendimiento promedio de ovocitos por ovario..... | 27 |
| <b>Tabla 04.</b> Resultados experimento 1b.....                   | 27 |
| <b>Tabla 05.</b> Resultados experimento 2a.....                   | 28 |
| <b>Tabla 06.</b> Resultados experimento 2b.....                   | 29 |

## Índice de imágenes

|   |    |
|---|----|
| <b>Imagen 01.</b> Laboratorio de producción animal – sector punción.....                          | 32 |
| <b>Imagen 02.</b> Laboratorio de producción animal – sector maduración.....                       | 33 |
| <b>Imagen 03.</b> Cabina de flujo Filtrar e incubadora Thermo Scientific.....                     | 33 |
| <b>Imagen 04.</b> Estufa F.B.R.....   | 34 |
| <b>Imagen 05.</b> Lupa Nikon SMZ645.....  | 34 |
| <b>Imagen 06.</b> Microscopio Nikon.....  | 34 |
| <b>Imagen 07.</b> Vortex Decalab Fbr.....   | 34 |
| <b>Imagen 08.</b> Baño termostático Vicking Masson D y portatubos Microvisión.....                | 35 |
| <b>Imagen 09.</b> Indumentaria de trabajo.....  | 35 |
| <b>Imagen 10.</b> Termo de recolección y jeringas + agujas de punzado.....                        | 36 |
| <b>Imagen 11.</b> Pipetas Accumax Smart, tips ThermoScientific,placa de petri y tubos Falcon..... | 36 |

## 1. Introducción y objetivos

La biotecnología de la reproducción utiliza técnicas mediante las cuales es posible aumentar la eficiencia reproductiva de los animales: la inseminación artificial, la congelación de semen, el semen sexado, la sincronización e inducción de la ovulación, la superovulación, la producción *in vitro* (fertilización y cultivo de embriones *in vitro*, capacitación espermática, recolección y maduración de ovocitos), el clonado, la congelación y la transferencia de los embriones; que se diferencian del conjunto de técnicas que abarca la “ingeniería genética”, como pueden ser: el clonado de genes, el análisis de los mismos y la transferencia génica; las cuales se ocupan de los genes en forma individual alterando el genoma del animal. Todas estas técnicas tienen importancia *per se* y se las utiliza no solo con fines científicos, sino que pueden ser empleadas como herramientas en la aplicación de otras más modernas y en cuestiones prácticas de la producción agropecuaria como en el caso de animales de alto valor genético (Clement-Sengewald y col., 1993; Palma, 2001; Rodríguez y col., 2011).

En el año 2013 se logró, a nivel mundial, el nuevo récord en recolecciones y transferencias embrionarias bovinas totalizando 1.275.874 embriones recolectados (6,89 embriones/recolección) y 986.983 embriones transferidos (77% respecto de los recolectados) según datos oficiales de IETS (International Embryo Technology Society).

América del Sur representó un 35% de los embriones recolectados (Figura 01) y un 38% de los transferidos mundialmente. De los 372.128 embriones transferidos un 82% se obtuvo por punción ovárica transvaginal guiada ecográficamente (OPU), maduración de los ovocitos y fertilización *in vitro* (FIV), y el 18% restante fueron embriones desarrollados *in vivo* y luego extraídos mediante lavajes (IETS, 2013).

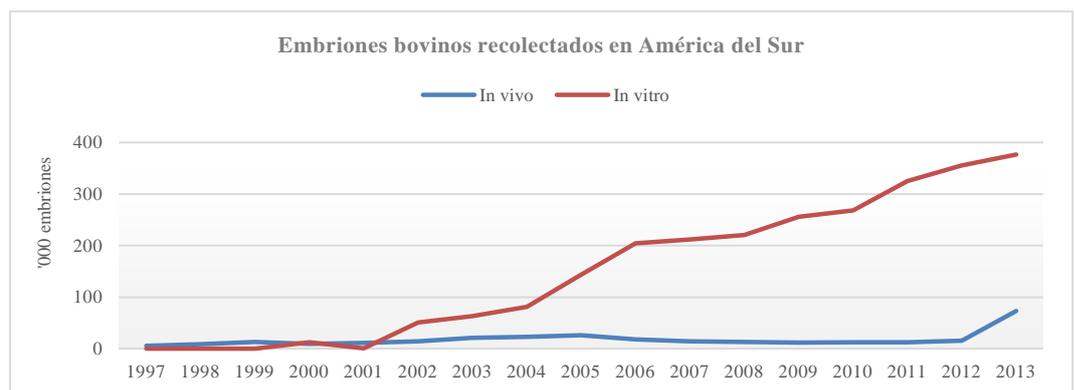


Figura 01. Evolución del número de embriones bovinos recolectado en América del Sur, (IETS).

En Argentina, todos los años hembras bovinas de alto valor genético para producción de leche y carne son faenadas debido a que finalizan su ciclo productivo o poseen lesiones. La recuperación de sus gametos es una alternativa para preservar y potenciar una fuente genética utilizando tecnología *in vitro* de embriones (Aller y col., 2000). Durante los últimos años la aplicación de técnicas *in vitro* para producción de embriones se ha incrementado exitosamente

(Balasubramanian y col., 2007; Carrascal-Triana y col, 2015; Pryor y col, 2015). En nuestro país según datos oficiales de la IETS del año 2013 se recolectaron 27.165 embriones de los cuales un 74% fueron transferidos. De los 20.145 embriones transferidos un 86% fueron obtenidos *in vivo* y luego transferidos, y el 14% (2.786 embriones) restante fueron obtenidos por OPU y luego FIV. Se contabilizaron 1.048 hembras donantes para la obtención de los embriones FIV con un resultado de 2,66 embriones transferidos por donante.

La producción *in vitro* de embriones a través de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de ovocitos aspirados de folículos ováricos se utiliza con fines terapéuticos en humanos, para comercialización, para investigación en laboratorios y para la producción de animales domésticos, transgénicos y/o clonados (Clement-Sengewald y col., 1993; Varisanga, 1998).

La importancia agronómica de la producción *in vitro* de animales, en este caso bovinos, reside principalmente en maximizar la producción de individuos viables, en corto tiempo, a costos accesibles al productor. La producción *in vitro* permite utilizar los ovarios de hembras de alto valor genético que por diversas razones son enviadas a faena, donde la industria frigorífica considera los ovarios como elementos de descarte. De este modo, se puede obtener de ellos, ovocitos viables para el desarrollo de un nuevo individuo ahorrando donantes y aprovechando el potencial de las hembras conservado en los ovocitos (Clement-Sengewald y col., 1993). Si bien esta estrategia no permite hacer un manejo programado del progreso genético y puede incluso aumentar la frecuencia de problemas asociados a la fertilidad (refugos reproductivos), ha sido utilizado con éxito en algunos países del continente Asiático como una forma de aceleración del progreso genético, particularmente en rodeos lecheros. Actualmente, Argentina exporta embriones de fertilización *in vitro* (FIV) obtenidos a partir de ovarios de frigorífico, a Indonesia, lo que permite generar un salto cualitativo en la genética actual de dicho país (Perry, 2013; Rahman y col, 2015, SATE, 2015).

La recuperación de ovocitos de ovarios derivados de matadero para producción *in vitro* de embriones presenta complicaciones operativas. Los animales faenados pueden hallarse en cualquier momento del ciclo estral o incluso pueden estar preñados; y estas diferencias en el status fisiológico podrían afectar las tasas de recuperación de ovocitos, su calidad y posterior desarrollo embrionario.

### **Objetivo general:**

Analizar la relación entre la morfología del ovario y la presencia de ciertas estructuras ováricas (folículo dominante, cuerpo lúteo), y la producción *in vitro* de embriones.

### **Objetivos particulares:**

Evaluar el efecto de la clasificación anatómica del ovario en el número y la calidad de ovocitos recuperados.

Evaluar el efecto de la clasificación anatómica del ovario en la maduración *in vitro* y desarrollo embrionario luego de la activación partenogénica.

## **2. Revisión bibliográfica**

### 2.1 Anatomía y fisiología del ovario bovino

#### 2.1.1 Estructuras

El tracto reproductivo de la hembra bovina incluye órganos genitales internos: ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina, y también externos: vulva y clítoris (McDonald, 1971). Los ovarios (Figura 3), estructuras pares ovoides, de medidas aproximadas: 4 x 2 x 1,5 cm (Dyce y col., 1987), se encuentran situados caudoventralmente a la altura media de la entrada de la pelvis, están sujetos por el mesovario y rodeados por la bolsa ovárica. Estas gónadas femeninas presentan dualidad funcional complementaria: una función exócrina y gametogénica y una endocrina, involucrada en la secreción de hormonas reproductivas (McDonald, 1971; Frandson, 1988; Noakes, 2001; Caravaca y col., 2003; Senger, 2003). La secreción de gonadotrofinas hipofisarias: hormona luteinizante y folículo-estimulante (LH y FSH, respectivamente) es el principal factor que regula la función ovárica (Clement-Sengewald y col., 1993).

Cada ovario se compone de una capa simple de células cúbicas llamada epitelio germinal por debajo del cual se encuentra la túnica albugínea, formada por tejido conectivo externo. Debajo de la túnica albugínea se encuentra una zona llamada corteza ovárica (zona parenquimatosas) (Frandson, 1988), donde se encuentran los folículos primordiales que contienen al ovocito, la gameta femenina propiamente dicha. En la corteza se encuentran también los cuerpos lúteos, formados a partir de las paredes del folículo dominante luego de producida la ovulación. La porción central o medular del ovario corresponde a la zona vascular (Frandson, 1988).

La gametogénesis en la hembra incluye dos procesos: ovogénesis y foliculogénesis (Figura 1). Durante la vida fetal (50-130 días de gestación), se produce la multiplicación (mitosis) de las ovogonias. Aproximadamente a los 80 días de la gestación los ovocitos inician la meiosis, deteniéndose el desarrollo (arresto meiótico) en el estadio de dictiotene de la profase I (Wassarman, 1988; citado por Clement-Sengewald y col., 1993). La meiosis se reanuda sólo en algunos ovocitos, después de una onda preovulatoria de LH en cada ciclo estral (animal adulto) (Clement-Sengewald y col., 1993).

La foliculogénesis se puede definir como la formación de folículos maduros, preovulatorios (de Graff), a partir de una reserva de folículos primordiales cuyo crecimiento se encuentra detenido (Spicer y Echterkamp, 1986; citado por Clement-Sengewald y col., 1993). La función primaria del folículo ovárico en mamíferos es la liberación de un ovocito apto para ser fertilizado (Clement-Sengewald y col., 1993).

Los folículos son unidades altamente complejas formadas por diferentes tipos celulares que proveen el microambiente y las hormonas necesarias para el crecimiento del ovocito que alojan en su interior (Gordon, 1994). Al nacimiento, los ovarios de la ternera bovina contienen hasta 150.000 folículos primordiales cada uno (Noakes y col., 2001). Cada uno de estos folículos contiene un ovocito rodeado de una capa simple de células planas pregranulosas (Byskov, 1978) de origen epitelial, sin haberse desarrollado aún las células de la teca. Poco tiempo después, los ovarios empiezan a desarrollarse y producen el crecimiento de estos folículos primordiales, que dan lugar a folículos primarios y luego a secundarios, donde cada ovocito es rodeado por dos o más capas de células granulosas y una membrana basal. Hasta que la ternera alcanza la pubertad, 7-18 meses de edad (Noakes y col., 2001), los folículos solo se desarrollan hasta presentar teca interna, y luego sufren atresia. Una vez alcanzada la pubertad, estos folículos (preantrales y antrales) continúan desarrollándose por acción de gonadotrofinas, de manera que algunos puedan alcanzar el estado de folículos de Graaf (Noakes, 1999, 2001). La estructura de estos folículos preovulatorios está formada por la membrana granulosa, la teca interna y la teca externa. Una subpoblación de células granulosas forma el cúmulus, que rodea al ovocito, lo nutre (Buccione y col., 1990), participa en la formación de la zona pelúcida y en la generación de los factores inhibidores de la maduración ovocitaria (Tsafriiri y col., 1982; Eppig y Downs, 1984). La primera línea de células del cúmulus es la corona radiata y se encuentra en contacto con el ovocito mediante extensiones citoplasmáticas que conectan con la zona pelúcida (De Loos y col., 1991). Estas prolongaciones permiten suministrar materia vitelina al ovocito (Frandsen, 1988).

Según la clasificación de Rajakoski (citado por McDonald, 1971) los folículos se agrupan en (Figura 02):

1. Folículos primordiales: en su interior se encuentra un ovocito inactivo, de entre 20-30 micras de diámetro, rodeado por una capa simple de células epiteliales.
2. Folículos en crecimiento (primarios y secundarios): aún no se desarrolla la teca ni el antro. Presentan dos o más capas de células foliculares y se define la zona pelúcida.
3. Folículos de Graaf (terciario y preovulatorio): presentan antro. Durante su formación surgen las dos funciones características del ovario. El ovocito mide entre 80-120 micras. El folículo preovulatorio puede llegar a medir entre 16-19mm de diámetro (McDonald, 1971).
4. Folículos atrésicos: proceden de los folículos de Graaf que no ovularon o de aquellos que involucionaron. La atresia puede comenzar en cualquier estadio del desarrollo y se caracteriza por: picnosis y fragmentación de las células granulosas, invasión leucocitaria, pérdida de contacto intercelular, aumento de la permeabilidad de la membrana basal, hipertrofia de las células tecales y disminución de la secreción de

estradiol ( $E_2$ ) (Ryan, 1981; Greenwald y Terranova, 1988; citado por Clement-Sengewald y col., 1993; Díaz, 1999).

La maduración y el crecimiento folicular se dan a partir de una serie de transformaciones secuenciales en el ovocito, la granulosa y la teca (Testart y col., 1982; citado por Hafez, 1993). Los procesos recurrentes de crecimiento folicular y ovulación, son regulados por complejas interacciones entre hormonas, factores de crecimiento y sistemas de comunicación intercelular (Clement-Sengewald y col., 1993). Las células granulosas y de la teca proliferan y se diferencian. Aumenta la capacidad del folículo para secretar  $E_2$  y responder a los estímulos de las gonadotropinas. La producción de  $E_2$  determina qué folículo obtendrá los receptores de LH para la ovulación y la luteinización (Hafez, 1993).

Luego de la ovulación del folículo de Graaf maduro se produce una hemorragia en la cavidad folicular y se forma un cuerpo hemorrágico. Tres a cuatro días después, nuevas células luteínicas invaden el coágulo de modo que la sangre que llena la cavidad folicular va perdiendo su coloración oscura. Se forma de esta manera lo que se denomina cuerpo amarillo o lúteo verdadero, que mide entre 20-25mm de diámetro aproximadamente (McDonald, 1971). Durante su etapa funcional este órgano libera progesterona ( $P_4$ ), luego, si no hubo fecundación, al cesar su función endocrina, comienza a degenerarse. Se torna blanquecino por la disminución del aporte sanguíneo, por lo que se denomina cuerpo albicans y durante varios ciclos estrales se observa en el ovario una cicatriz de tejido conectivo.

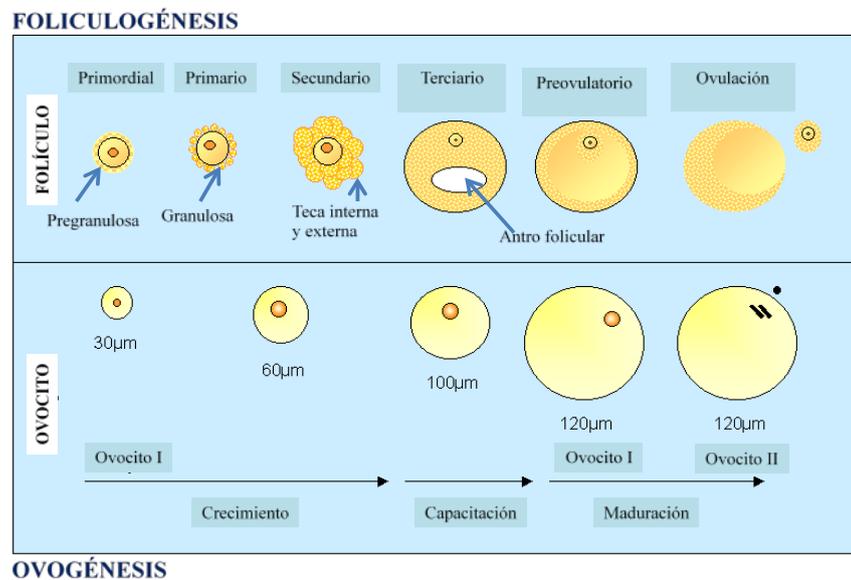


Figura 02. Foliculogénesis y ovogénesis. (Universidad de Laval).

### 2.1.2 Revisión del ciclo estral

El ciclo estral tiene por objeto preparar las condiciones favorables para la fecundación, implantación y desarrollo fetal. Representa un proceso complejo de modificaciones morfológicas y endocrinas del tracto reproductivo y sistema nervioso central (SNC) (Rivera, 2012).

La hembra bovina se caracteriza por ser poliéstrica anual con ciclos periódicos cada 21 días en promedio (oscilación 18-24 días) (Frandsen, 1988; Clement-Sengewald y col., 1993; Noakes, 1999), regulados por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero.

Según Noakes (1999, 2001) el ciclo estral consta de las siguientes cinco fases (Figura 03):

- Proestro: es la etapa previa al estro cuando se produce un incremento del tamaño folicular y regresión del cuerpo lúteo (CL) del ciclo anterior por acción de la principal hormona luteolítica: prostaglandina F<sub>2</sub> α (PGF<sub>2</sub>α). El aparato genital deja de estar sometido a la dominancia de la hormona P<sub>4</sub> cuyas concentraciones decaen a niveles de 1 ng/ml (progesterona sérica) entre las 24-36 horas de iniciada la luteólisis. Esto produce el incremento en la frecuencia de pulsos de LH/FSH que estimula el desarrollo de un folículo grande, que secreta cantidades crecientes de E<sub>2</sub> (Clement-Sengewald y col., 1993). Los estrógenos circulantes en la sangre, absorbidos desde los folículos, estimulan la creciente vascularización y el crecimiento celular de los genitales, como preparación del estro y sucesiva gestación (Frandsen, 1988). Dura 2 a 3 días (McDonald, 1971).
- Estro: corresponde al período en que la hembra acepta al macho, reflejo del aumento en la producción de E<sub>2</sub> que permiten que la hembra se encuentre receptiva. Durante esta etapa la creciente producción de E<sub>2</sub> llega a un umbral y se genera un pico preovulatorio de E<sub>2</sub> que estimula a las neuronas hipotalámicas a producir un pico de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), el cual desencadena un pico de LH posterior responsable de la ovulación. Dura en promedio 15 horas (oscilación 3-20 horas), si bien existen factores diversos que influyen en su duración: raza, época del año, presencia de un toro, nutrición, producción láctea y número de lactancia, grupo sexualmente activo de hembras que se encuentren en la etapa de estro al mismo tiempo (Wishart, 1972; Esslemont y Bryant, 1974; Hurnik y col., 1975). Se puede englobar al proestro y al estro dentro de una única fase denominada: fase folicular.
- Metaestro: es el período que sigue al final del estro. La ovulación es espontánea entre 12 y 16 horas después de finalizado el celo (McDonald, 1971; Clement-Sengewald y col., 1993; Noakes, 1999). El metaestro se caracteriza por la formación de un cuerpo hemorrágico

inmediatamente después de producida la ovulación. Dura 2 a 3 días (McDonald, 1971).

- **Diestro:** corresponde al período de CL funcional, el cual secreta  $P_4$ , la cual evita la nueva evolución de folículos y, por consiguiente, la aparición de otros períodos estrales, ya que el estro no ocurre en tanto esté presente y activo el CL (Frandsen, 1988). Dura 17 días (McDonald, 1971). Se puede englobar al metaestro y al diestro dentro de una única fase: luteal.
- **Anestro:** es el período de reposo sexual que ocurre después del parto, para dar lugar a la regeneración del tracto reproductivo de la hembra. Se caracteriza por un desarrollo folicular mínimo y una regresión del CL, ahora no funcional.

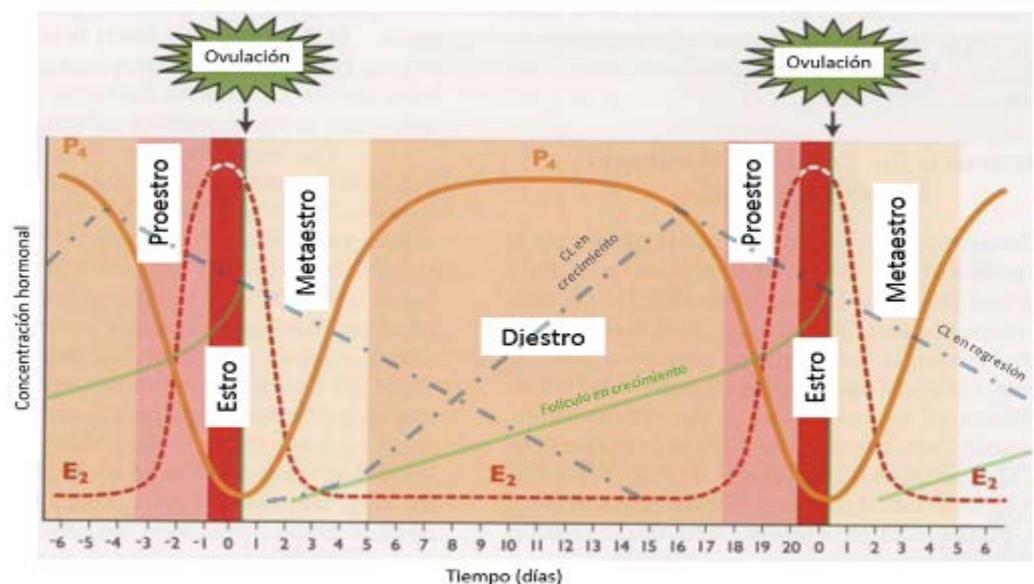


Figura 03. Ciclo estral de la hembra bovina. Adaptado de Anatomía y Fisiología de los animales domésticos (Frandsen, 1998) y Pathways to pregnancy and parturition (Senger, 2003)

La naturaleza cíclica de la reproducción en el bovino consta de ondas foliculares que implican el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos individualmente identificables a partir de un diámetro de 4 mm que ocurre al mismo tiempo en ambos ovarios (Rivera, 2012).

Suelen generarse 2-3 ondas foliculares (Matton, 1981; Ireland, 1987; Pierson, 1987) por ciclo estral que duran entre 7-9 días cada una (Evans y col., 1994), y cada una de ellas consta de tres períodos (Goodman y Hodge, 1983, citado por Clement-Sengewald y col., 1993; Webb y col., 1999; Ginther y col., 2001a, b):

- **Reclutamiento:** formación de una población o “cohorte” de folículos que adquiere la capacidad de responder a las gonadotrofinas y necesita de ellas para seguir creciendo

- Selección: elección del futuro folículo dominante (aquel que alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás); los restantes sufren atresia. Se selecciona un folículo dominante en cada una de las 3 ondas foliculares (Sirois y Fortune, 1988; Savio y col., 1990). La causa por la cual el folículo dominante seleccionado en las primeras ondas regresiona está vinculada a la baja frecuencia de pulsos de LH debido a los altos niveles de  $P_4$ , que caen cuando regresiona el CL, período coincidente con la última onda folicular. El folículo ovulatorio del ciclo se selecciona 3 días antes de la ovulación (Pierson y Ginther, 1988).
- Dominancia: conjunto de mecanismos por los que el folículo dominante (responsable de la mayor parte de la secreción de  $E_2$ ), puede detener el crecimiento de otros folículos y/o adquirir la capacidad de continuar su desarrollo y alcanzar la ovulación en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos

## 2.2 Técnicas reproductivas

### 2.2.1 Inseminación artificial y congelación de semen

La inseminación artificial (IA) junto con la congelación del semen se encuentran enormemente difundidas hoy en día. La IA permite disminuir la transmisión de enfermedades venéreas, obtener una mayor descendencia a partir de un solo macho, aprovechar su potencial y mejorar la estimación del valor genético de reproductores. A través de la congelación de semen en nitrógeno líquido (criopreservación) a  $-196^{\circ}\text{C}$ , se lo puede preservar durante largos períodos de tiempo sin que ello afecte la fertilidad del mismo. A esa temperatura no hay reacciones bioquímicas, energía térmica o cambios de índole genético dentro de la célula, si bien no se ha establecido aun el límite de tiempo de conservación (Watson, 1986; Clement-Sengewald y col., 1993; Palma, 2001).

### 2.2.2 Sincronización e inducción de la ovulación

La sincronización e inducción de la ovulación permiten aumentar la eficiencia del manejo productivo y reproductivo, y la producción de terneros. Posibilita el acortamiento del anestro postparto y la lactancia, facilitando así el reinicio de los animales a la actividad reproductiva. Permite además concentrar los nacimientos en estaciones adecuadas que permitan la mayor disponibilidad de forraje para la madre y el ternero en lactancia. La sincronización disminuye e incluso evita el tiempo de detección de celo y si bien es posible implementarla con el servicio natural su combinación con la IA trae aparejado ventajas económicas y genéticas. Además, es posible la incorporación de múltiples cruzamientos en forma sencilla y a bajo costo, y obtener una mayor cabeza de parición y 50% de preñez en el primer día de servicio (Butler y Alberio, 1997, citado por Palma, 2001; Palma, 2001).

### 2.2.3 Superestimulación ovárica

La superovulación es una técnica que a través de tratamientos hormonales que estimulan el desarrollo supernumerario de los folículos ováricos destinados en condiciones fisiológicas a la atresia, permite obtener un número de embriones transferibles que varía entre 3-7 según Palma (2001). Su mayor aplicación es en la especie bovina donde los costos y el rendimiento lo justifican. Uno de los efectos negativos asociados a la superovulación es la alta tasa de ovocitos sin fecundar atribuido a alteraciones en la maduración como consecuencia del desorden bioquímico y motriz existente en el oviducto y el útero (Palma, 2001).

### 2.2.4 Producción *in vitro* de embriones (PIV)

La producción *in vitro* de embriones permite obtener embriones en diferentes estadios de desarrollo y a bajo costo. Es esencial la calidad del ovocito para el éxito de esta técnica. Según Martínez (2013) los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: estado nuclear, características citoplasmáticas, aspecto de la corona radiata y expansión o distribución de las células del cúmulus (Chen y col., 2001), así como el diámetro de los ovocitos que condiciona su capacidad para madurar (Sato y col., 1990) de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110µm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar. La morfología del citoplasma y las células del cúmulus (Figura 4) son los primeros criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario. La calidad de las células que rodean al ovocito y la apariencia homogénea del citoplasma son los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar *in vitro* (Leibfried-Rutledge y col., 1986). Las células del cúmulus son poblaciones de células de la granulosa que aportan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto y col., 1996). Fukui y Sakuma (1980) encontraron grandes diferencias en las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos con y sin presencia de células del cúmulus.

La capacidad de un ovocito maduro para superar las etapas de fecundación, el desarrollo del embrión preimplantacional y la implantación se denomina: capacidad de desarrollo del ovocito, y es una medida intrínseca de la calidad del mismo (Hyttel y col., 1997). Los ovocitos madurados *in vitro* poseen baja capacidad de desarrollo comparados con los ovocitos madurados *in vivo*, en parte debido al inadecuado ambiente *in vitro* en el que se lleva a cabo el completo desarrollo de la maduración (Greve y col., 1987,1993; Rizos y col., 2002; Sutton y col., 2003).

La adquisición de la capacidad de desarrollo por parte de los ovocitos madurados *in vitro* es un factor limitante para que se puedan alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario (Eppig y col., 1994). Esta diferenciación de los ovocitos es dirigida por una interacción compleja entre

factores de crecimiento y citoquinas que permiten la maduración nuclear y citoplasmática (Blondin y col., 1995; Boelhauve y col., 2005).

A medida que un ovocito crece y madura, adquiere la capacidad de reanudar y completar la meiosis, lograr con éxito la fecundación, e iniciar y mantener el desarrollo embrionario. En el curso de adquisición de estas capacidades se producen cambios citoplasmáticos que incluyen procesos celulares como la transcripción del ARNm, traducción de las proteínas, modificación post-traduccional de las mismas y cambios ultraestructurales. Existen casos específicos de proteínas generadas en la maduración citoplasmática que intervienen en la reanudación meiótica como por ejemplo el factor promotor de la maduración (FPM) (Krisher, 2004).

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es afectada por muchos factores, como el tiempo y la temperatura de transporte desde el matadero hasta el laboratorio (Park y col., 2005), el tamaño del folículo (Krisher, 2004; Pavlok y col., 1992), la etapa de desarrollo del ovocito (Hagemann y col., 1999), el diámetro del ovocito (Hyttel y col., 1997), la composición del medio (Lonergan y col., 1997), el tiempo de maduración (Park y col., 2005), las hormonas (Sirard y col., 2006; Zuelke y col., 1990), y los sueros (Park y col., 2005).

Durante la maduración *in vitro*, la extrusión del primer corpúsculo polar indica el éxito de la maduración, alcanzando el estadio de metafase II, que ocurre durante las 18-24 horas después de comenzar la maduración. Existe la evidencia de que algunos ovocitos maduran rápidamente, observándose el primer corpúsculo polar a las 16 horas. Sin embargo, un período de cultivo es necesario antes de la fecundación, para que se pueda alcanzar la capacidad de desarrollo del ovocito (Dominko y col., 1992; Hyttel y col., 1997; Lonergan y col., 1997; Ward y col., 2002).

Luego de la maduración y para poder evaluar la viabilidad del ovocito mediante monitoreo de clivaje y desarrollo embrionario es necesario realizar una fertilización *in vitro* (FIV) o activación partenogenética. La primera consiste en la interacción entre los componentes del ovocito y los del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito y la restauración del número cromosómico del futuro individuo. La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al ovocito, y el pronúcleo masculino se forma de 3 a 5 horas (Gordon y col., 1990). La concentración espermática en la FIV es de 0.5 a 1 millón de espermatozoides por mililitro (Gordon y col., 1990) y para lograr un buen porcentaje de fertilización hay que incubar por 24 horas después de la maduración y fertilización (Gordon y col., 1990). Si se observan los 2 cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevó a cabo la fertilización (Martínez, 2013). La utilización de la FIV para la producción de embriones bovinos permite numerosas aplicaciones prácticas (Herradón y col., 2007):

- Aumento del rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento

combinado con aspiración transvaginal ecoguiada (OPU) (Herradón y col., 2007) permite obtener ovocitos en vaquillonas de más de 6 meses de edad y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> semana del posparto (Galli y col., 2001).

- Bajo costo de producción de embriones, lo que permite transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría o utilizarlos para tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz. Permite trabajar simultáneamente con distintos embriones, obteniendo mayores réplicas, imitando las condiciones naturales desde un mismo lugar, optimizando de esta manera tiempos y costos (Clement-Sengewald y col., 1993).
- Reducción en el número de hembras donantes dado que es posible utilizar ovocitos provenientes de frigorífico, a nulo o muy bajo costo, que permiten la producción de embriones *in vitro* a gran escala al igual que el testeo de nuevas tecnologías (Universidad Laval).
- Obtención de descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis, BSE).
- Aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.
- Mayor facilidad en la utilización de semen sexado.

Alberio y Zakhartchenko (2001) describen a la activación como un proceso que se inicia normalmente en el ovocito al momento de ser penetrado por el espermatozoide durante la fecundación elevándose en forma breve y periódica los niveles del calcio intracelular (Tanaka, 1997). En la mayoría de los mamíferos, el ovocito recién liberado del folículo está detenido en metafase II debido a los altos niveles citoplasmáticos del factor promotor de la maduración (FPM). Una vez que se han fusionado el espermatozoide y el ovocito, la liberación de calcio intracelular produce entre otros eventos la inactivación del FPM y el consecuente reinicio y término de la meiosis hasta la extrusión del segundo corpúsculo polar (Williams, 2002). La activación química o partenogenética de ovocitos se realiza con el objetivo de imitar en el ovocito los efectos que desencadena la penetración del espermatozoide para estimular el desarrollo de un embrión *in vitro* (González, 2007). Por esta razón, esta técnica es una buena herramienta para evaluar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* (Gasparrini y col., 2004).

#### 2.2.5 Clonado, congelación y transferencia de embriones

El clonado de embriones permite aumentar el número de terneros por embrión, y a través de la micromanipulación se puede recombinar material genético. La

congelación permite formar bancos de embriones, confiere facilidad de transporte y posibilidad de comercio del material genético internacionalmente. La transferencia embrionaria aumenta el progreso genético, porque a través del aumento del número de embriones y terneros el potencial genético de la hembra puede reproducirse y emplearse con mayor eficacia (Clement-Sengewald y col., 1993).

### **3. Materiales y métodos**

El estudio se realizó en el laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Pontificia Universidad Católica Argentina, ubicada en la calle Capitán General Ramón Freire 183, (1426) Buenos Aires, Argentina, y se organizó en forma de réplicas semanales, según la disponibilidad de ovarios, obteniéndose un total de 19 réplicas. La jornada de trabajo se inició los días martes de cada semana, por un período de 6 meses.

El trabajo se dividió en dos experimentos:

**Experimento 1:** evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en el número y la calidad de ovocitos recuperados.

**Experimento 2:** evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en la maduración *in vitro* y desarrollo embrionario luego de la activación partenogenética.

El trabajo constó de las siguientes etapas:

1. Faena de hembras bovinas en frigorífico y obtención de ovarios
2. Obtención de ovocitos
3. Selección de ovocitos y clasificación por calidad
4. Maduración *in vitro* de ovocitos
5. Activación partenogenética de ovocitos
6. Cultivo de ovocitos activados partenogenéticamente hasta el estadio de blastocistos

Se trabajó con 2.583 ovocitos provenientes de ovarios de vacas y vaquillonas en diferentes estados fisiológicos, sacrificadas en el frigorífico Penta situado en la localidad de Quilmes, provincia de Buenos Aires. Si bien se podría haber trabajado con hembras donantes y obtener los ovocitos por medio de punción ovárica transvaginal guiada por un ecógrafo (ovum pick up u OPU), la faena permite disponer de un mayor número de ovocitos de forma más fácil, rápida y económica (González, 2007).

La adecuada selección de los ovocitos para ser madurados en el laboratorio es crucial para el éxito de la fecundación y el desarrollo embrionario subsecuente (De los Reyes y col., 1999). Las características morfológicas del ovocito a madurar son importantes (Liebfried y col., 1986), ya que de ello dependerá que

pueda reiniciar la meiosis (Moor, 1990; Wassamar, 1994) así como la maduración citoplasmática (Barros, 1987).

El tiempo y la temperatura de transporte desde el matadero hasta el laboratorio (Park y col., 2005) son factores importantes en la calidad para el desarrollo ovocitario. El tiempo óptimo de trabajo y la temperatura durante el transporte de los ovarios hasta el laboratorio y el comienzo de la maduración de los ovocitos ha sido estudiado por Yang y col. (1990), quienes observaron que los ovarios pueden ser almacenados hasta 8 horas a 25°C sin una reducción en la tasa de fecundación o en la capacidad de desarrollo hasta estadio de blastocisto. En cambio, temperaturas extremas (4°C y 38°C) para el transporte de ovarios, resultaron en tasas de desarrollo embrionario menores a la obtenida manteniendo una temperatura de 23°C (Shioya, 1993). Schernthaner y col. (1997) indicaron que el almacenamiento de ovarios bovinos por 24 horas a temperaturas entre 15 y 21°C no tenía una influencia negativa sobre la producción *in vitro* de blastocistos. Existen resultados alentadores luego de un máximo de 11 horas de mantenimiento de los ovarios a temperaturas entre 18 y 20°C, obteniendo una tasa promedio de blastocistos de 27,9%. Esto posibilitaría un mayor uso potencial de la producción *in vitro* de embriones en programas comerciales, porque permitiría obtener ovarios provenientes de lugares más distantes del laboratorio (Aller y col., 2000). Basado en estas evidencias, los ovarios provenientes del frigorífico Penta fueron colocados en bolsas y transportados en termos adiabáticos plásticos Rubbermaid (fabricados con espuma hecha a base de uretano para una retención mayor de temperatura) hasta el laboratorio donde se realizaron los ensayos. El transporte procuró realizarse dentro de las 3 horas de faenados los animales (Varisanga, 1998) y su procesamiento posterior, dentro de las 8 horas post faena.

En este trabajo la temperatura promedio de transporte de los ovarios fue de 25 °C y el tiempo de procesamiento desde el arribo de los ovarios al laboratorio hasta su ingreso en incubadora para maduración fue en promedio 2 hs 14 min.

Evitar contaminaciones es esencial para el éxito del trabajo, para ello es necesaria la limpieza y desinfección rutinaria de las zonas y elementos a utilizar. De este modo, previo a cada sesión de trabajo la primera tarea en realizarse fue la higiene y limpieza del área de trabajo con una solución de alcohol 70% con tiempo suficiente para permitir que el alcohol se evapore antes de empezar a trabajar (Palasz y de La Fuente, 2007) y posteriormente se preparó el material esterilizado a utilizar (7. Anexo de imágenes):

1. Aceite mineral
2. Agua desmineralizada
3. Alcohol 70%
4. Baños termostáticos *Vicking modelo Masson D*, para el atemperado de los ovarios
5. Cabina de flujo *Filtrar* para trabajo en medio descontaminado
6. Eppendorfs
7. Estufa *F.B.R.*
8. Filtros

9. Gradillas para manipulación de los tubos Falcon en la preparación de medios
10. Guantes de latex *NP*
11. Hojas de papel
12. Incubadora *Thermo Scientific*
13. Jeringas *Darling* y agujas *Arista*
14. Lupa *Nikon SMZ645*
15. Medios de cultivos
16. Mesadas de trabajo
17. Microscopio *Nikon*
18. Papel de aluminio
19. Pipetas de Pasteur, de vidrio, para manipulación de los ovocitos
20. Pipetas *Thermo Scientific/Accumax Smart* y tips *Thermo Scientific*
21. Placas de Petri *Nunclon*
22. Portatubos eléctrico *Microvisión* para mantener atemperado el material de punción
23. Solución fisiológica (NaCl 0.9%)
24. Termo plástico *Rubbermaid* para el transporte de los ovarios desde el frigorífico hasta el laboratorio
25. Tubos Falcon *Corning*, graduados, para preparación de medios y recolección de material de punción
26. Uniforme de trabajo (guardapolvo, gafas, barbijo)
27. Vasos de precipitado para colocar los ovarios
28. Vortex *Decalab Fbr*

Además de la higiene y desinfección del área y los elementos de trabajo es de suma importancia controlar los factores fisiológicos: temperatura, pH, concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), osmolaridad, % de humedad de la atmósfera donde están los medios, así como los factores hormonales, para lograr el éxito de los experimentos (Palasz y de La Fuente, 2007; Martínez, 2013).

En cuanto a la temperatura es de gran importancia recordar que la temperatura corporal de la vaca es cercana a los 39°C (Palasz y de La Fuente, 2007) por lo que en este trabajo se decidió mantener una temperatura de incubación de 38,5 °C similar a la temperatura fisiológica del bovino.

La adición de rojo fenol a los medios permite la visualización de una posible desviación del pH (Palasz y de La Fuente, 2007) y es lo que le confiere la coloración rojiza al medio de maduración TCM utilizado. Una concentración de 5% de CO<sub>2</sub> mantiene el pH en valores alrededor de 7.4 (Palasz y de La Fuente, 2007). Carney y Bavister (1986) sostienen que el CO<sub>2</sub> resulta necesario para la regulación del pH intracelular.

La suplementación de los medios de maduración de los ovocitos bovinos con hormonas tales como LH, FSH y estradiol 17β ha demostrado que ofrecen efectos beneficiosos sobre el porcentaje de complejos ovocito-cúmulus (COCs) que son capaces de completar la maduración meiótica con el consecuente desarrollo *in*

*in vitro* (Sirard, 1988; Saeki y col., 1991). En este trabajo se decidió añadir FSH con una concentración de 2.000 ng/ml en el medio de maduración TCM.

Aproximadamente una hora antes del arribo de los ovarios se realizó el atemperado de los baños de agua termostáticos y tubos Falcon que contenían Phosphate buffered saline (PBS+. Figura 04) a 30-31°C, para la punción folicular. El PBS+ se compone de 46,5 ml de PBS, 1 ml del antibiótico gentamicina (1µg/ml), y 2,5 ml de suero fetal bovino. También se preparó el medio de maduración (TCM. Figura 04) y se lo llevó a la incubadora de manera tal que se equilibrara su pH en 7,4 y temperatura en 38,5 °C, con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% y 95-100% de humedad (De los Reyes, 1999; Palasz y de La Fuente, 2007).

El medio de maduración TCM se preparó en el laboratorio en un tubo Falcon esterilizado teniendo en cuenta las siguientes proporciones:

| TCM completo       | 5 ml | Unidades | Concentración |
|--------------------|------|----------|---------------|
| Medium 199 (TCM)   | 4,46 | Ml       |               |
| Suero fetal bovino | 0,5  | Ml       | 10%           |
| FSH (stock 2)      | 5    | µl       | 2.000 ng/ml   |
| Cisteamina         | 25   | µl       | 100µM         |
| Gentamicina        | 2,5  | µl       | 0,1%          |

Tabla 01. Composición del medio de maduración TCM.

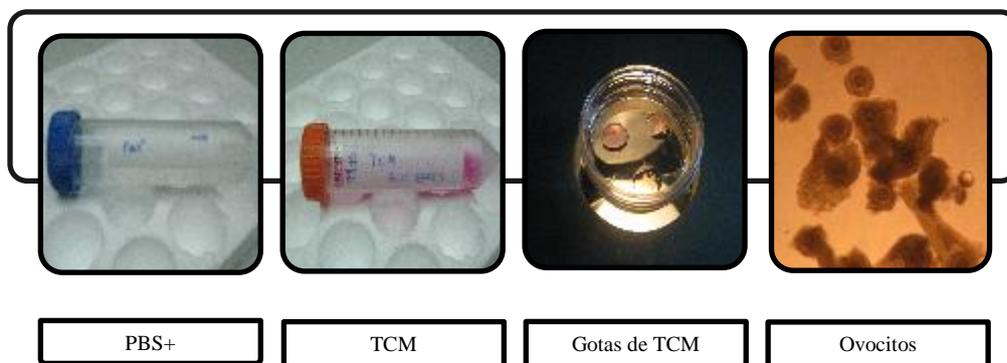


Figura 04. De izq. a der.: medios para punción y maduración, gotas de TCM completo donde se alojan los ovocitos para madurar, foto bajo lupa de ovocitos previa maduración (aumento 40x).

Al llegar los ovarios al laboratorio de Producción Animal se procedió a su lavado con solución fisiológica (NaCl 0.9%).

Se clasificó a los ovarios en tres categorías para luego verificar si existe influencia por parte de alguna de ellas, en la aptitud para el desarrollo ovocitario *in vitro* (Varisanga, 1998; Chian y col., 2002) (Figura 05):

- CL: con un cuerpo lúteo presente, folículos presuntamente en una etapa de atresia y regresión, de diámetro  $\leq 8$  mm.
- PRO: en etapa de proestro, cuyos folículos en crecimiento se encuentran presuntamente atravesando las ondas foliculares para

evolucionar hasta que alguno se convierta en folículo de Graaf dominante, todos los folículos presentan diámetro  $\leq 8$  mm, ausencia de CL o folículo dominante.

- DOM: con un folículo dominante de diámetro  $\geq 15$  mm presente, previo a ovular, el resto de los folículos se encuentran presuntamente en atresia.

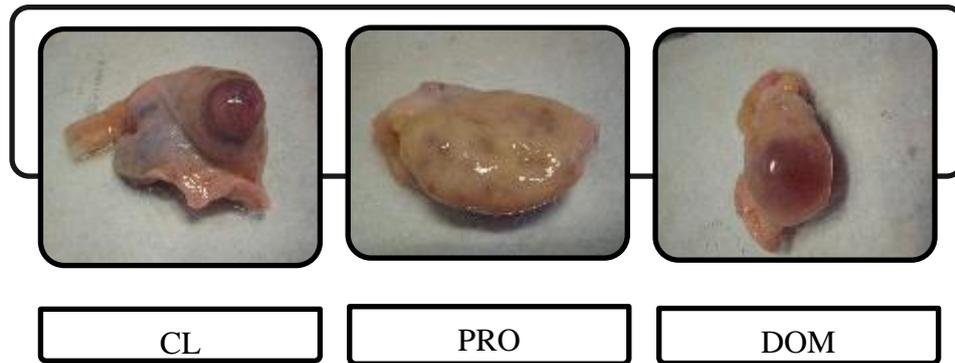


Figura 05. Clasificación ovárica utilizada para el trabajo: categorías CL, PRO y DOM.

Los ovarios con cuerpos extraños (cicatrices, folículos quísticos, etc.) se eliminaron de la muestra.

Se colocó un número de ovarios similar en cada uno de los tres grupos en forma aleatoria, en promedio 9 ovarios por categoría. De este modo la población media de trabajo fue de 27 ovarios.

Martínez (2013) define en uno de sus estudios un rango de temperatura de punción de ovarios de 30-38°C para la viabilidad de los ovocitos. De este modo, luego de clasificar los ovarios se atemperaron (Figura 06) en vasos de precipitado de tamaño adecuado con solución fisiológica cubiertos con papel de aluminio, dentro del baño de agua termostático procurando una temperatura de 30-31°. Mientras tanto, se prepararon las gotas de maduración (Figura 04) con el medio de maduración TCM completo. Se armaron 4 microgotas de 45µl cada una por placa de Petri circular, cubiertas de 3 ml de aceite mineral para evitar su evaporación, y se colocaron dentro de la incubadora.

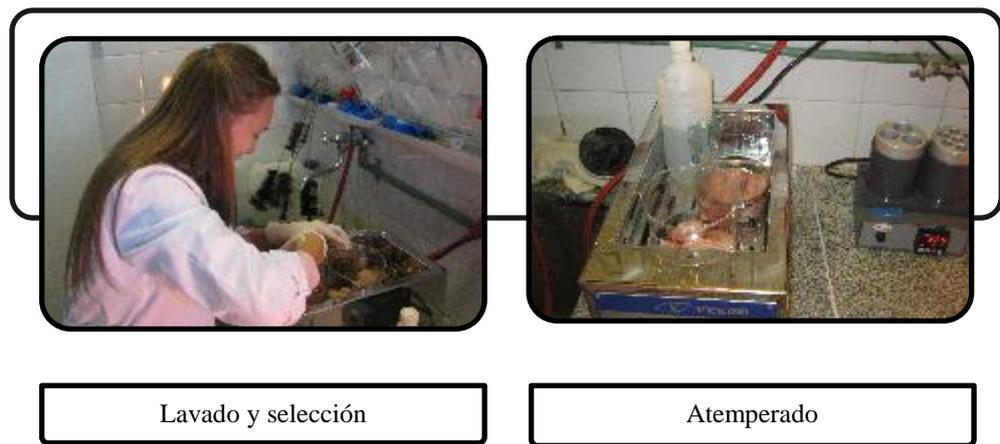


Figura 06. Clasificación de ovarios y atemperado.

Posteriormente se realizó la punción de los ovarios para la recuperación de los complejos ovocito-cúmulus (COCs). Un objetivo importante en el método de recuperación ovocitaria es que maximice el número de ovocitos por ovario que pueden ser utilizados para maduración, fertilización y cultivo *in vitro* (Carolan, 1994). Basado en la literatura existente al momento (Gómez y col., 2012; Carolan, 1994; Hamano, 1993), se seleccionó el método de aspiración folicular con jeringas y agujas descartables 40 x 12 (18 G x 1,1/2) (Varisanga, 1998), fundamentado en que no existen diferencias significativas en la calidad ovocitaria y producción de blastocistos con otros métodos de punción folicular, de modo que la aspiración con aguja se adecua en cuanto a practicidad y rapidez permitiendo garantizar la viabilidad de los ovocitos. La eficiencia de la punción basada en el número de ovocitos obtenidos por el número de folículos aspirados varía según el tamaño del ovario y la experiencia del operador. Los valores varían entre 50% y 60% según Palma (2001). La recolección de los ovocitos se realizó según las tres categorías nombradas anteriormente, utilizando un tubo Falcon esterilizado y distinto para cada una de ellas.

Los COCs fueron aspirados junto con parte del líquido folicular y se dejaron decantar en los tubos de recolección por aproximadamente 10 minutos. Luego se eliminó parte del líquido sobrenadante y se tomó el decantado con 2 a 5 ml de líquido folicular con ayuda de una pipeta de Pasteur para depositarlo sobre una placa de Petri de manera de iniciar la búsqueda de los ovocitos. Se procuró que la placa permaneciera tapada siempre que no se llevara a cabo la búsqueda de los ovocitos para evitar contaminaciones. La exposición excesiva de los ovocitos en el líquido folicular a temperatura ambiente puede provocar la formación de redes de fibrina entre los ovocitos lo que inutiliza la placa, para lo cual es necesario realizar la búsqueda en el menor tiempo posible o en caso de presentarse coágulos de fibrina se puede utilizar heparina para su disolución (Avery y col., 2003).

Una vez obtenidos los ovocitos se procedió a su recuento y clasificación bajo lupa en función de la calidad ovocitaria. La clasificación que se consideró en este trabajo fue basada en la calidad citoplasmática y las capas de células del cúmulus que rodean al ovocito mediante un patrón de clasificación no invasivo estableciendo categorías que permitan identificar mejor a aquellos gametos que se

vayan a utilizar y puedan tener mejores probabilidades de manipulación y maduración en cultivo (De los Reyes y col., 1999). Los resultados obtenidos por varios grupos de trabajo indican que sólo los ovocitos que cuentan con un cúmulus completo y compacto poseen la capacidad de completar la maduración *in vitro* (Liebfried y First, 1979; Süß y Madison, 1983) y alcanzar el completo desarrollo esperado (Staigmiller y Moor, 1984). En este trabajo se realizó una clasificación ovocitaria en 5 grados (Figura 07):

GRADO 1: ovocitos de mejor calidad, citoplasma homogéneo, cúmulus con capas múltiples, más de 5, compacto pero traslúcido.

GRADO 2: ovocitos de citoplasma compacto, pero de granulación más gruesa, cúmulus de entre 2-5 capas, menos traslúcido.

GRADO 3: ovocitos con sólo una capa de células del cúmulus.

GRADO 4: ovocitos desnudos, es decir con ausencia de células del cúmulus.

GRADO 5: ovocitos atréticos, con anomalías, inviables, con cúmulus expandido, pignóticos.

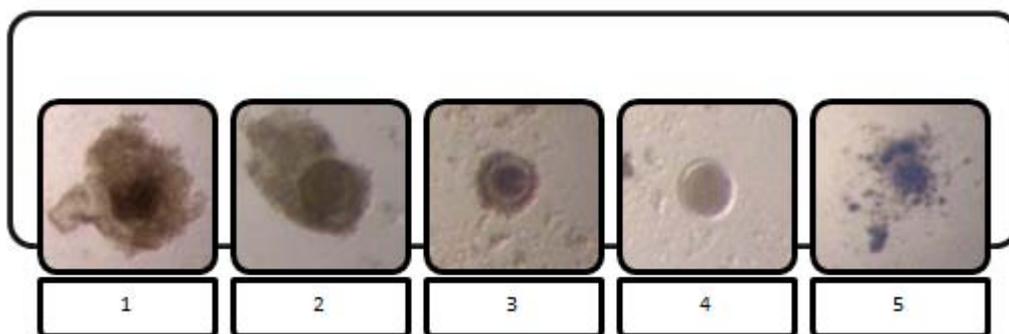


Figura 07. Grados de clasificación ovocitaria. Aumento en lupa 40x.

En el estudio llevado a cabo por De Los Reyes y col. (1999) se demostró que la selección de los ovocitos previo a su cultivo, mediante técnicas no invasivas, incrementaría la tasa de maduración *in vitro*. En este sentido, un citoplasma homogéneo y la presencia de varias capas compactas de células del cúmulus alrededor del ovocito, fueron las características morfológicas que más influyeron en la selección de los ovocitos para la etapa de maduración.

Existe una relación directa entre el desarrollo del ovocito y el número de células que lo rodean. Ovocitos competentes requieren de las células del cúmulus que lo rodean y secretan sustancias para su correcto desarrollo, siendo la correcta comunicación entre ambos el punto de principal interés (Krisner, 2004).

Ovocitos desnudos, aislados de folículos antrales y cultivados solos o sobre una monocapa de células de la granulosa tienen un desarrollo deficiente (Eppig, 1997) o degeneran después de la fertilización (Osaki y col., 1987). Hawk y col.

(1994) observaron que ovocitos con 3 capas desarrollaron significativamente menos al estadio de blastocisto (23%) que los que poseían mayor número de capas (40%), estos resultados fueron todos obtenidos en laboratorio tras punción de ovarios post-mortem (Martínez, 2013).

Para este trabajo se seleccionaron los ovocitos de grados 1 y 2, con citoplasma homogéneo y más de 2 capas de células del cúmulus que se utilizaron como co-cultivo para su maduración *in vitro*. El resto de las categorías fueron descartadas debido a su menor potencial de desarrollo *in vitro*.

Se identificaron placas para cada grupo de ovarios (CL, PRO y DOM) y con una micropipeta o pipeta de Pasteur se introdujeron los ovocitos en las gotas, aproximadamente 5 en cada una de ellas. Se destinaron gotas distintas para el grupo 1 y el 2 de ovocitos.

Se llevaron las placas a la incubadora nuevamente durante 22-24 horas, tratando de imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, con una concentración de CO<sub>2</sub> de 5%, humedad relativa de 95-100%, osmolaridad de los medios de 290 mOsm, PH de 7,4, y temperatura tanto de procesamiento como de cultivo de 38,5 °C (Varisanga, 1998; Martínez, 2013).

Aponte y col. (2010) señalan que la competencia para el desarrollo de ovocitos bovinos se ve afectada por la duración de la maduración *in vitro*. Un tiempo inapropiado de maduración puede generar la formación anormal de la cromatina (Dominko y col., 1997) y el envejecimiento del ovocito (Hunter y col., 1997) comprometiendo el desarrollo del mismo (Sirard y col., 2006). Se observó que luego de 27 horas de maduración *in vitro* la tasa de maduración ovocitaria disminuía y aumentaba la proporción de ovocitos degenerados (Aponte y col., 2010).

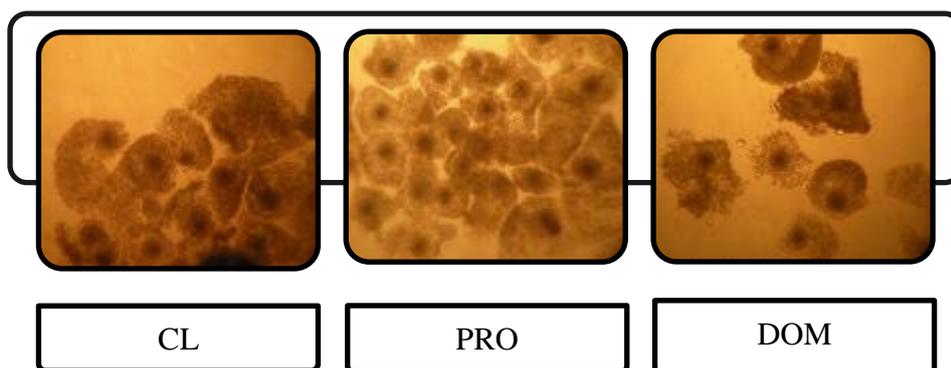


Figura 08. Ovocitos luego de 22-24 horas de maduración *in vitro* en incubadora. Células del cúmulus expandida. Aumento en lupa 40x.

La activación partenogénica se ha usado preferentemente para estudiar los mecanismos de activación ovocitaria y desarrollo embrionario temprano, ya que los embriones producidos por este método no son capaces de terminar la gestación (González, 2007).

En este trabajo, se optó por realizar activación partenogenética, a fin de eliminar del error experimental la variabilidad del espermatozoide. Para ello, luego de las 22-24 horas de incubadora se extrajeron los ovocitos de las gotas, observándose la expansión de las células del cúmulus y constatando la homogeneidad del citoplasma, y se los colocó en un tubo Falcon con 15 ml de hialuronidasa para denudarlos mediante acción enzimática y agitación mecánica con un Vortex durante 3' a velocidad media.

Posteriormente se vació el contenido del tubo en una placa con Tyrodes albumin lactate pyruvate (TALP) donde se clasificó a los ovocitos denudados según si se observaba extrusión del primer corpúsculo polar o no. Esta es una característica distintiva de los ovocitos maduros de animales domésticos y es indicadora de la detención del gameto femenino en metafase II de la meiosis. La extrusión del corpúsculo polar se registra en el bovino a partir de las 16 horas de iniciada la maduración *in vitro* alcanzando su máximo nivel entre las 22-24 horas (Martínez, 2013).

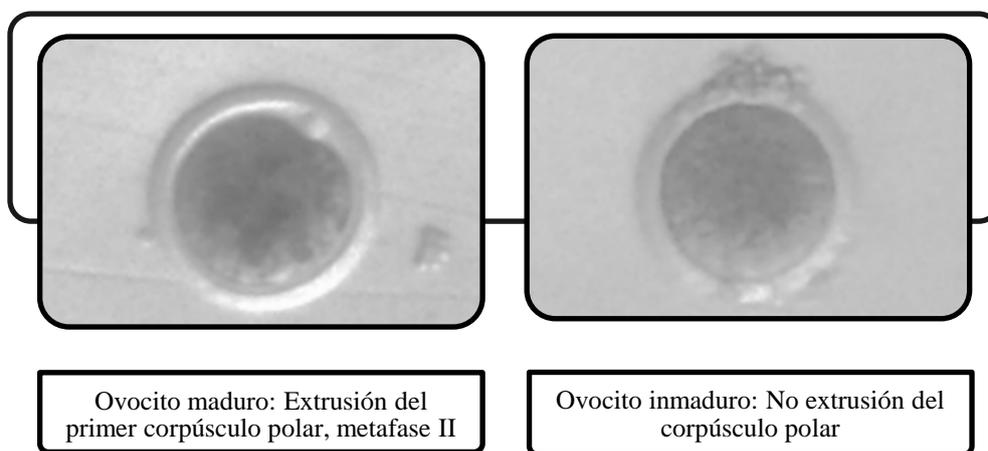


Figura 09. Visualización de ovocitos maduros e inmaduros post activación partenogenética bajo lupa 40x.

Una vez clasificados, se devolvieron los ovocitos a las gotas manteniéndolos en incubadora hasta el momento de su activación partenogenética. Mientras tanto, se prepararon los enjuagues con TALP y un ionóforo (Ionomycin calcium salt de *Streptomyces conglobatus*) que se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ , debe atemperarse en estufa y protegerse de la luz por ser fotosensible. Además se preparó un medio denominado fluido oviductal sintético (SOF) y con él se formaron gotas para colocar los ovocitos luego de haber sido enjuagados, para su maduración a blastocistos.

Luego de tres horas en incubadora, se repitieron los enjuagues y se devolvieron los ovocitos a las gotas de SOF para luego de 48 horas evaluar su evolución (Rizos y col., 2002). Transcurrido este tiempo se realizó el recambio de medio, y se controló el estado de los ovocitos:

- Clivados
- No clivados

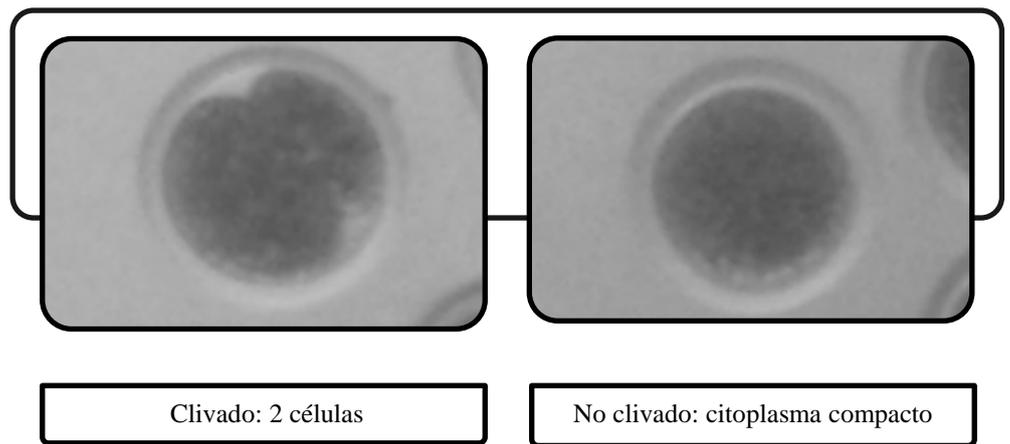


Figura 10. Ovocitos luego de 48 horas de cultivo in vitro, observados bajo lupa 40x.

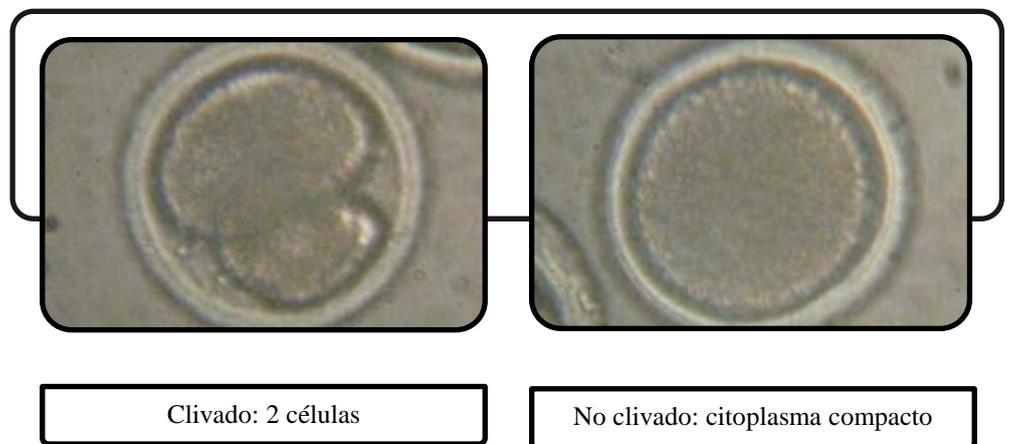


Figura 11. Ovocitos luego de 48 horas de cultivo in vitro, observados bajo microscopio 40x, magnificación 400.

Se pudo distinguir entre los ovocitos clivados en los cuales se observó bajo lupa la presencia de dos células ovales y aquellos no clivados (Figuras 10 y 11), que fueron descartados.

A los 3-4 días se identificó el estadio de mórula con 16-32 células (Noakes, 2001).

A lo largo de los 7 días posteriores al clivaje continuaron las observaciones para determinar la presencia o ausencia de blastocistos.

El día 7 u 8 se pudieron observar aquellos ovocitos que habían evolucionado a blastocistos (Figura 12). Estos se caracterizan por presentar entre 100 y 200 células, y se diferencia el trofoblasto de la masa celular interna (Clement-Sengewald y col., 1993).

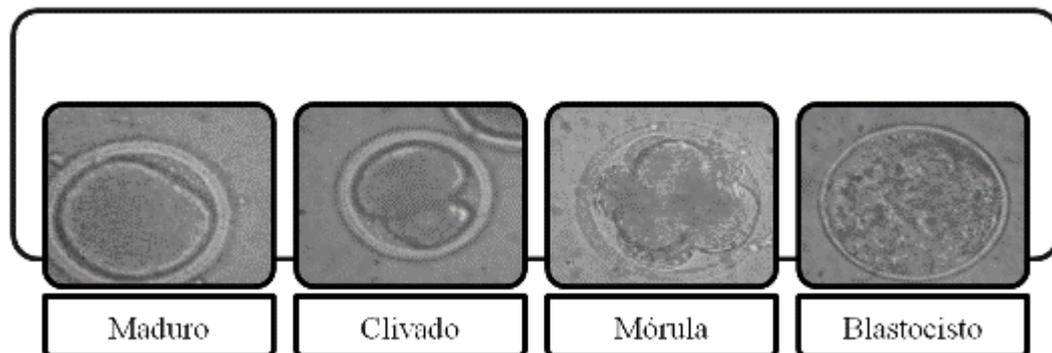


Figura 12. Diferentes estadios ovocitarios post activación partenogénica, observados bajo microscopio 40x, magnificación 400.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Infostat versión 2013 estudiantil cuyo manejo se aprendió en la Cátedra de Métodos de Investigación, a cargo de la profesora Adriana Pérez, quien supervisó este trabajo. Se utilizó el análisis de la varianza en bloques al azar y la prueba de Tukey, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05.

#### 4. Resultados

##### 4.1. Experimento 1 a. Evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en el número de ovocitos recuperados.

A través de un análisis de la varianza en bloques al azar y de la prueba de Tukey, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05, se obtuvieron evidencias significativas para justificar que la recuperación ovocitaria en la categoría ovárica PRO difiere del resto de las categorías ( $P < 0,0001$ ); superando en 31% el valor de la categoría CL y en 23% el de la categoría DOM.

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

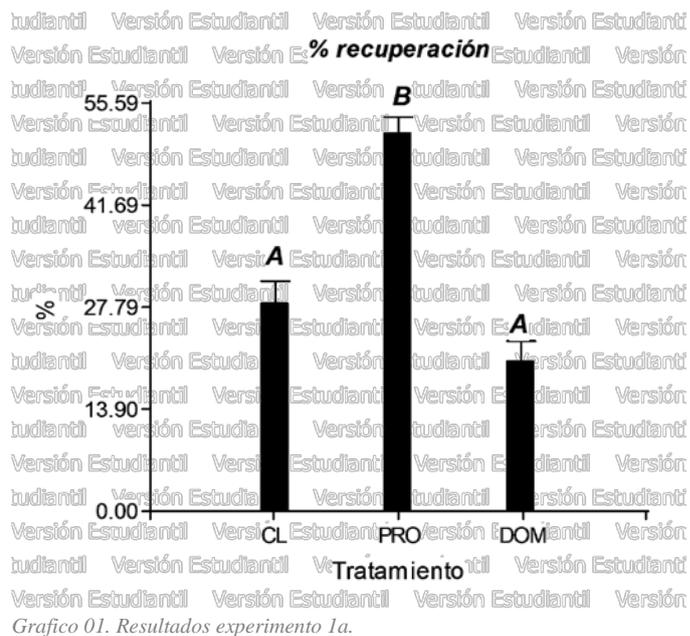
| F.V.        | p-valor |
|-------------|---------|
| Modelo      | 0.0108  |
| Experimento | >0.9999 |
| Tratamiento | <0.0001 |

##### Test: Tukey ( $\alpha=0.05$ )

| Tratamientos | Medias          | n  | E.E. |
|--------------|-----------------|----|------|
| DOM          | 20.32% <b>A</b> | 17 | 3.39 |
| CL           | 28.24% <b>A</b> | 17 | 3.39 |
| PRO          | 51.44% <b>B</b> | 17 | 3.39 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Error: 195.7172 gl: 32.

Tabla 02. Resultados experimento 1a.



Se obtuvo un rendimiento promedio de 5 ovocitos/ovario, resultados similares a los obtenidos por Gordon y Lu (1990) quienes obtuvieron 4,0 y 5,1 ovocitos/ovario empleando las técnicas de disección ovárica y aspiración folicular respectivamente.

| Categoría    | N° ovarios | N° ovocitos  | Ovocito/ovario |
|--------------|------------|--------------|----------------|
| CL           | 172        | 740          | 4,3            |
| PRO          | 205        | 1.356        | 6,6            |
| DOM          | 139        | 487          | 3,5            |
| <b>Total</b> | <b>516</b> | <b>2.583</b> | <b>5,0</b>     |

Tabla 03. Rendimiento promedio de ovocitos por ovario (Gordon y Lu, 1990).

#### 4.2. Experimento 1 b. Evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en la calidad de ovocitos recuperados, grados 1 y 2.

A través de un análisis de la varianza en bloques al azar y de la prueba de Tukey, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05, se obtuvieron evidencias significativas para justificar que el porcentaje de ovocitos de mayor calidad, grados 1 y 2, proveniente de la categoría ovárica PRO difiere del resto ( $P = 0,0001$ ); superando en 13% el valor de la categoría CL y en 14% el de la categoría DOM.

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.        | p-valor |
|-------------|---------|
| Modelo      | <0.0001 |
| Experimento | 0.0002  |
| Tratamiento | 0.0001  |

**Test: Tukey ( $\alpha=0.05$ )**

| Tratamientos | Medias          | n  | E.E. |
|--------------|-----------------|----|------|
| DOM          | 52.20% <b>A</b> | 16 | 2.26 |
| CL           | 53.23% <b>A</b> | 16 | 2.26 |
| PRO          | 66.33% <b>B</b> | 16 | 2.26 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Error: 81.5315 gl: 30.

Tabla 04. Resultados experimento 1b.

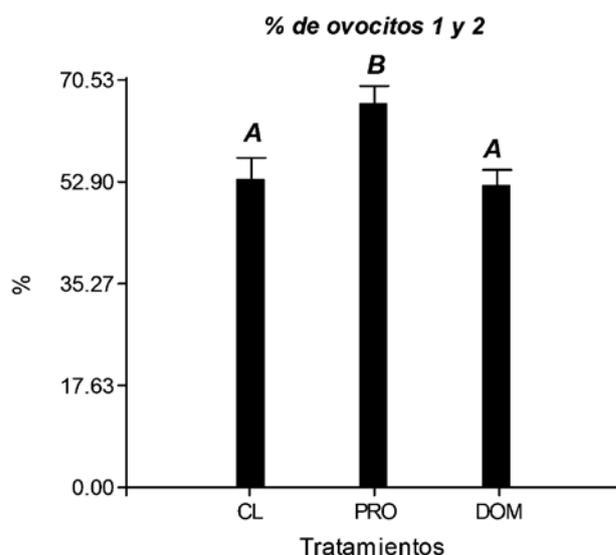


Grafico 02. Resultados experimento 1b.

**4.3. Experimento 2 a. Evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en la maduración *in vitro*.**

A través de un análisis de la varianza en bloques al azar y de la prueba de Tukey, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05, se obtuvieron evidencias significativas para justificar que no se observaron diferencias en el porcentaje de maduración de las tres categorías ováricas analizadas ( $P = 0,1739$ ).

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | p-valor |
|-------------|---------|
| Modelo      | 0.1117  |
| Experimento | 0.1230  |
| Tratamiento | 0.1739  |

**Test: Tukey ( $\alpha=0.05$ )**

| Tratamientos | Medias   | n  | E.E. |
|--------------|----------|----|------|
| CL           | 51.45% A | 11 | 5.04 |
| DOM          | 63.11% A | 11 | 5.04 |
| PRO          | 63.87% A | 11 | 5.04 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Error: 279.0750 gl: 20.

Tabla 05. Resultados experimento 2a.

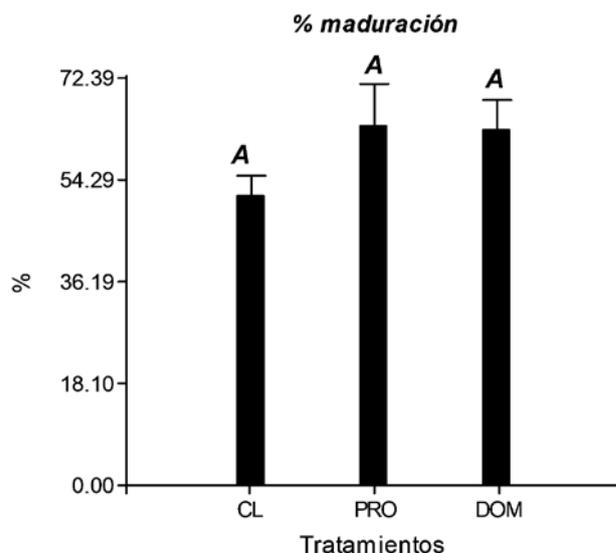


Grafico 03. Resultados experimento 2a.

**4.4. Experimento 2 b. Evaluación del efecto de la clasificación anatómica del ovario en el desarrollo embrionario luego de la activación partenogenética.**

A través de un análisis de la varianza en bloques al azar y de la prueba de Tukey, con un nivel de significación  $\alpha$  de 0,05, se obtuvieron evidencias significativas para justificar que el porcentaje de blastocistos en la categoría ovárica PRO difiere de la categoría DOM ( $P = 0,0563$ ) superando el valor de dicha categoría en un 16%.

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | p-valor |
|-------------|---------|
| Modelo      | 0.0592  |
| Experimento | 0.0974  |
| Tratamiento | 0.0563  |

### Test: Tukey ( $\alpha=0.05$ )

| Tratamientos | Medias           | n  | E.E. |
|--------------|------------------|----|------|
| DOM          | 8.83% <b>A</b>   | 10 | 4.32 |
| CL           | 17.23% <b>AB</b> | 10 | 4.32 |
| PRO          | 24.74% <b>B</b>  | 10 | 4.32 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Error: 186.6449 gl: 18.

Tabla 06. Resultados experimento 2b.

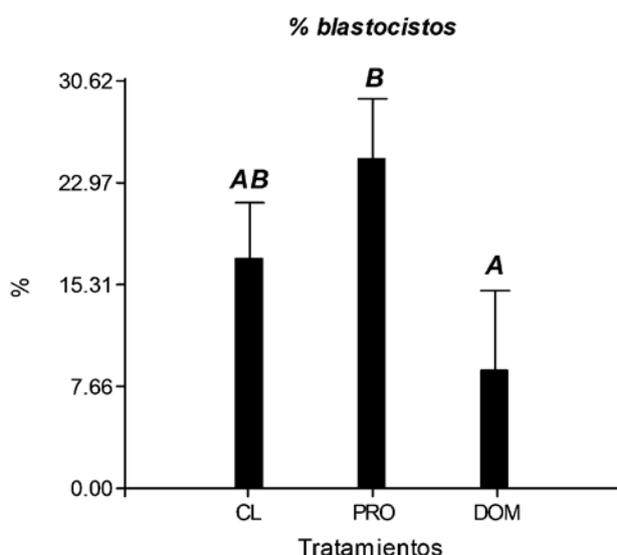


Grafico 04. Resultados experimento 2b.

## 5. Discusión

Chian y col. (2002) señalan que el número de ovocitos obtenidos de ovarios en fase temprana, coincidente con la categoría ovárica PRO de este trabajo, fue significativamente mayor que el resto de las categorías. Se estima que la categoría PRO se ubica dentro de la fase folicular, en el estadio de proestro del ciclo estral, donde se han sucedido un mayor número de ondas foliculares respecto de la categoría CL (fase luteal del ciclo estral), pero aún no se ha alcanzado la etapa de selección del folículo preovulatorio. Los ovocitos recolectados de los ovarios PRO se encuentran atravesando la fase de crecimiento folicular, con un tamaño  $\leq$  a 8 mm de diámetro.

Durante la fase de dominancia del folículo de Graaf el número de ovocitos provenientes de folículos de tamaño medio y la capacidad de desarrollo de ovocitos provenientes de folículos pequeños disminuye (Machatkova y col., 2004). En la última onda folicular el folículo seleccionado se hace dominante e inhibe el crecimiento de otros folículos ováricos, los cuales sufren un proceso de atresia (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988; Takagi y col., 1998; Díaz, 1999; Smith y col., 1993; Chian y col. 2002) debido al posible efecto de la inhibina secretada por el folículo dominante que actúa sobre el eje hipotálamo-

hipofisario, y en consecuencia inhibe el crecimiento del resto de los folículos. De esta manera, los ovarios DOM presentarían un menor número de ovocitos de calidad grado 1 y 2, es decir aquellos que presentan un citoplasma homogéneo y COC compacto formado por varias capas (Blondin y Sirard, 1995).

Durante el proceso de foliculogénesis existen numerosos factores en estudio, involucrados en el desarrollo del folículo. Factores como nutrientes, citoquinas, neuropéptidos, hormonas (Van den Hurk et al., 1997). El factor de crecimiento epidérmico (EGF), la proteína c-kit, la hormona antimülleriana (AMH), el factor de transcripción  $FIG\alpha$ , el factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF-9), por nombrar algunos ejemplos, permiten la evolución del folículo primordial a folículo en crecimiento (primario y secundario) (Picton, 2001).

Según Hyttel y col. (1997) la fase de crecimiento folicular requiere de una serie de organelas y un período de transcripción, los cuales son necesarios para que el ovocito adquiera la capacidad meiótica y su desarrollo. El proceso de transcripción de ARN se activa en el folículo secundario y continúa hasta el estadio de folículo terciario de aproximadamente 3 mm de diámetro, momento a partir del cual el ovocito adquiere la capacidad de llevar adelante la meiosis y el desarrollo embrionario. Durante el estadio de folículo dominante, el ovocito sufre modificaciones ultraestructurales y adquiere la capacidad plena para el desarrollo a través de un proceso denominado capacitación. La etapa final de la maduración del ovocito hasta metafase II luego del pico pre-ovulatorio de LH permite culminar los procesos anteriores y otorgarle al ovocito las características o herramientas necesarias para la fertilización y posterior desarrollo embrionario.

Estudios señalan que no se encontraron diferencias significativas en la tasa de maduración de ovocitos recolectados provenientes de ovarios en diferentes fases del ciclo estral tanto para folículos de diferentes tamaños como con presencia o ausencia de cuerpo lúteo o folículo dominante (Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; Chian y col., 2002).

La maduración meiótica (extrusión del primer corpúsculo polar) ocurre de manera espontánea cuando ovocitos bovinos son extraídos de sus folículos y cultivados *in vitro* (Pincus y Enzmann, 1935). Este fenómeno natural ha facilitado el uso de ovocitos madurados *in vitro* para FIV y producción de embriones. Sin embargo, la capacidad de desarrollo ovocitaria presenta limitaciones a pesar de las mejoras en medios de cultivo y condiciones *in vitro* que se han desarrollado para la maduración ovocitaria y producción de embriones (Loneragan y col., 1994). Gordon y Lu (1990) sostienen que los ovocitos recuperados de ovarios provenientes de frigorífico presentan alta heterogeneidad en cuanto a calidad y capacidad de desarrollo.

Se han publicado resultados diversos en relación a la progresión meiótica de ovocitos madurados *in vitro*, encontrándose en la literatura que las tasas de maduración oscilan entre un 50% y un 80% (Martino y col., 1994; Hurtt y col., 2000; Luna y col., 2001). En este experimento se encontró dentro del rango mencionado. El éxito limitado en el presente trabajo responde a una combinación

de variables, pudiendo deberse a los medios utilizados, ya que las condiciones *in vitro* no llegan a ser completamente adecuadas para un desarrollo ovocitario óptimo (Izadyar y col, 1998; Aponte y col., 2010).

Autores sostienen que tan solo un tercio del pool de ovocitos seleccionados para maduración y cultivo *in vitro* resultan en embriones viables y la calidad de los embriones obtenidos *in vitro* es menor que la obtenida *in vivo* (Lonergan y col., 1994; Martínez, 2013). La calidad intrínseca del ovocito es el factor determinante del % de ovocitos que desarrollarán al estadio de blastocistos (Sirard y Blondin, 1996).

El desarrollo de ovocitos bovinos hasta el estadio de blastocisto o blastocisto expandido mediante maduración, fertilización y cultivo *in vitro* durante 6-7 días se ve limitado a tasas del 25%-40% (Rizos y col., 2002; Martínez, 2013).

## **6. Conclusiones**

El mayor porcentaje de recuperación ovocitaria (51,44%) se obtuvo en los ovocitos provenientes de ovarios categoría PRO, así mismo dicha categoría demostró el mayor porcentaje de ovocitos grado 1 y 2 (66.33%), es decir los de mejor calidad, citoplasma compacto, mayor número de capas de células del cúmulus.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas respecto del porcentaje de maduración entre las tres categorías ováricas.

Finalmente, sí se observaron diferencias en el desarrollo a blastocistos. La categoría PRO fue significativamente mayor respecto de la categoría DOM, no habiendo diferencias entre dichas categorías y la categoría CL.

Se pudo demostrar que, si bien no hubo diferencias significativas en la maduración entre las tres categorías ováricas, bajo las mismas condiciones de cultivo, la calidad de los ovocitos para desarrollarse hasta blastocistos en ovarios con un folículo dominante es inferior a la de los ovocitos en un ovario en proestro, pudiendo deberse al efecto inhibitorio que ejerce el folículo dominante sobre el resto de los folículos.

## 7. Anexo de imágenes



*Imagen 01. Laboratorio de producción animal – sector de punzado.*



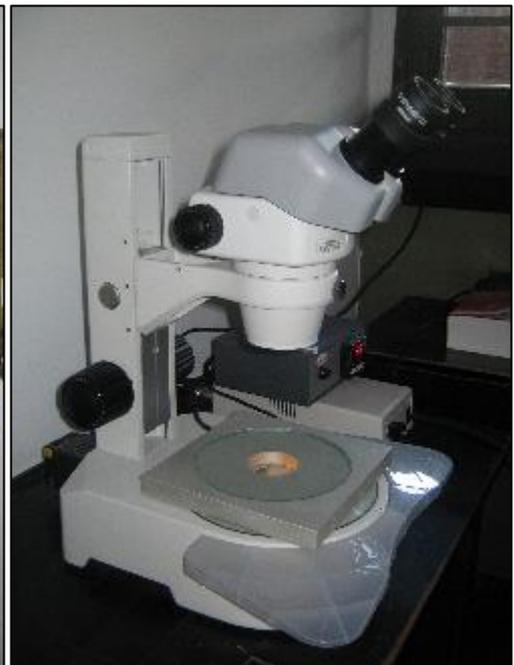
*Imagen 02. Laboratorio de producción animal – sector de preparación de medios y cultivo.*



*Imagen 03. Cabina de flujo Filtrar (izq) e incubadora Thermo Scientific (der).*



*Imagen 04. Estufa F.B.R.*



*Imagen 05. Lupa Nikon SMZ645*



*Imagen 06. Microscopio Nikon*



*Imagen 07. Vortex Decalab Fbr*



*Imagen 08. Baño termostático Vicking Masson D (izq.) y portatubos Microvisión (der.)*



Imagen 09. Indumentaria de trabajo.



Imagen 10. Termo de recolección (izq.) y jeringas + agujas de punzado (der.)

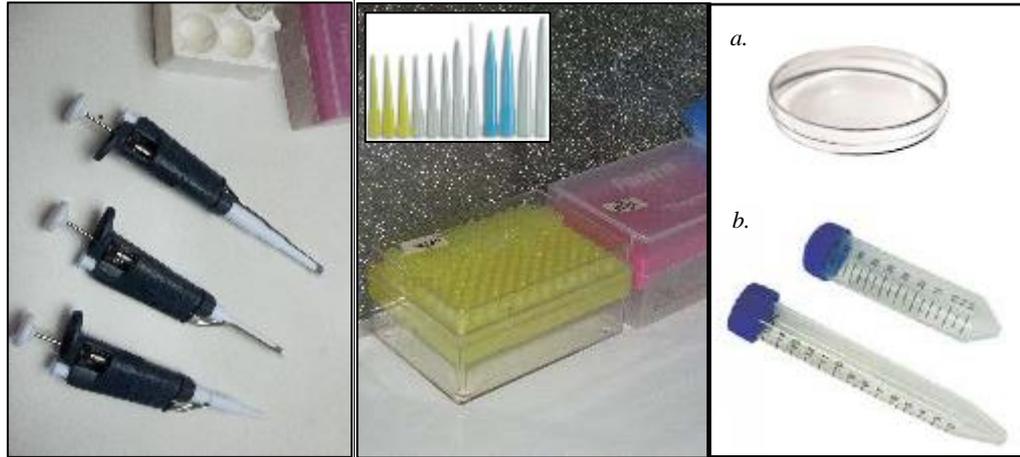


Imagen 11. Pipetas Accumax Smart (izq.), tips Thermoscientific (cent.), placa de petri (a) y tubos Falcon (b)

## **8. Agradecimientos**

A Dios por permitirme concretar esta etapa de mi vida, por la familia que me dio y las excelentes personas que he conocido.

A mis padres por brindarme la posibilidad de estudiar en esta Universidad y por su apoyo incondicional.

A mi directora de tesis Marina Sansiñena, por su acompañamiento y enseñanzas a lo largo de todo este trabajo, que me permitieron crecer intelectual y personalmente.

Al equipo de Producción Animal Silvia Márquez, Guillermo Taminelli, Javier Jarazo y Margarita Solivella con quienes compartí y aprendí mucho.

A la Lic. Adriana Pérez, por su dedicación, paciencia y tiempo para responder todas mis consultas sobre el diseño estadístico.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, a sus profesores, compañeros de clase y directivos.

A mi prima Roberta Sciurano por su ayuda y tiempo.

A mis hermanos, familiares, amigos y novio por estar siempre a mi lado.

## 9. Bibliografía

### Libros

- Caravaca Rodríguez, F., Castel Genís, J., Guzmán Guerrero, J., Delgado Pertínez, M., Mena Guerrero, Y., Alcalde Aldea, M., González Redondo, P. *Bases de la Producción Animal*. España, Universidad de Sevilla, 2003, pág. 58.
- Clement-Sengewald, A., Palma, G., Brem, G. *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Argentina, Hemisferio Sur, 1993, págs. 1-291.
- Dyce, K., Sack W., Wensing C. *Textbook of Veterinary Anatomy*. Philadelphia, Saunders, 3ª edición, 2002, chapter 29 (The pelvic and reproductive organs of the female ruminants).
- Frandson, R.D. *Anatomía y fisiología de los animales domésticos*. México, Interamericana McGraw Hill, 4ª edición, 1988.
- Gordon, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, United Kingdom, CAB International, 2ª edición, 2003.
- Hafez, E. *Reproduction in farm animals*. Philadelphia, Lea & Febiger, 6ª edición, 1993, pág 20-188, y 461-502.
- Hafez, E., Hafez, B. *Reproduction in farm animals*. USA, Lippincott Williams & Wilkins, 7ª edición, 2000, págs. 13-29.
- Noakes, D. *Fertilidad y obstetricia del ganado vacuno*. España, ACRIBIA, 2ª edición, 1999, págs. 3-31.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G., Arthur, G. *Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics*. USA, Sounders, 8ª edición, 2001, págs. 3-53.
- Palma, G. *Biotecnología de la reproducción*. Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2001, págs. 1-237.
- Palma, G. *Biotecnología de la reproducción*. Mar del Plata, Reprobiootec, 2ª edición, 2008, págs. 225-294.
- Reece, W. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. USA, Wiley-Blackwell, 4ª edición, 2009, pág. 458.
- Senger, P. *Pathways to Pregnancy and parturition*. Washington, Pullman, 2ª edición, 2003, págs. 10-43.

### Artículos de revistas

- Aller, J.F., Alberio, R.H., Palma, G.A. (2000). Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. EEA INTA, Argentina. 1 (32).
- Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L., Leibfried-Rutledge, M.L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 5 (45): 943-956.
- Avery, B., Strøbech, L., Jacobsen, T., Brück Bøgh, I., Greve, T. (2003). *In vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*. (59): 987–999.
- Balasubramanian, S., RHO, G. (2007). Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science*. (98): 282-292.
- Barros, C. (1987). Sperm chromatin decondensation after fertilization. *Revista Microscopía electrónica y biología celular*. Argentina. (11): 15-26.
- Berdugo Gutiérrez, J., Bueno Sánchez, J. (2000). Partenogénesis: Un modelo para el estudio de los eventos tempranos del desarrollo mamífero. *Iatreia Revista médica, Universidad de Antioquia, Antioquia*. 1 (13): 40-45.
- Blondin, P., Sirard, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. (41): 54-62.
- Blondin, P., Sirard, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Université Laval, Canada. *Molecular reproduction and development*. (41): 54-62.
- 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. Retrieved June 17, 2014.
- Boelhaave, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paulalopes, F. (2005). Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*. (73): 737-744.

- Buccione, R., Schroeder, A., Eppig, J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. (43): 543-547.
- Byskov, A. (1978). The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biology of Reproduction*. (19): 720-735.
- Carney, E., Bavister, B. (1986). Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 34 (1): 199.
- Carolan, C., Monaghana, P., Gallagher, M., Gordona, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology, Ireland*. 5 (41): 1061-1068.
- Carrascal-Triana, E., Zolini, A., Ruiz, A., Penitente-Filho, J., Torres, Block, J. (2015). 33 post-thaw viability of bovine embryos produced *in vitro* following treatment with ascorbic acid, dithiothreitol, and caspase-3 inhibitor during cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*. 28(2) 146-147.
- Charmandarian, A., Krupick, M., Muñoz, G. (2005). Anatomía del aparato reproductor femenino. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Rosario (UNR). Rosario.
- Chen, S., Lien, Y., Cheng, Y., Chen, H., Yang, Y. (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction, Oxford Journals*. (16): 2350-2356.
- Chian, R., Chung, J., Downey, B., Seang Lin, T. (2002). Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine, Canada*. 2 (4): 127-132.
- Chian, R., Chung, J., Downey, B.R, Lin Tan, S. (2002). Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*. 4(2):127-132. Retrieved December 7, 2014.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. (103): 293-298.

- De Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T., Kruip, T. (1991). Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*. (28): 255-259.
- De los Reyes, M., Aguayo, J.P., Del Campo, H., Barros, C. (1999). Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avances en ciencias veterinarias, Chile*. 1-2 (14): 42-53.
- Díaz, T. (1999). Dynamics of the ovarian follicular development during the estrous cycle in cattle. *Revista de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Universidad Central de Venezuela, Venezuela*. 40 (1): 3-18.
- Dominko, T., First, N. (1992). Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotropins. *Theriogenology*. (37): 203.
- Dominko, T., First, N.L. (1997). Timing of meiotic progression in bovine oocyte and its effect on early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*. (47): 456-467.
- Eppig, J., Downs, S. (1984). Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. (30): 1-11.
- Eppig, J., Schultz, R., O'Brien, M., Chesnel, F. (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. (164): 1-9.
- Eppig, J.J. (1979). A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cell-oocytes junctional contact maintained *in vitro* *Journal of Experimental Zoology*. 209 (2): 345-53.
- Eppig, J.J., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J. (1992). Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of Reproduction and Fertility*. (95): 119-127.
- Esslemont, R. J., Bryant, M. J. (1974). Economic and husbandry aspects of the manifestation and detection of oestrus in cows. *A.D.A.S. quarterly review*. (12): 175.
- Evans, A., Adams, G., Rawlings, N. (1994). Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Development*. (102): 462-470.

- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*. (42): 437-442.
- Fukui, Y., Sakuma, Y. (1980). Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells'. *Biology of Reproduction*. (3): 669-673.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. (59): 599-616.
- Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Donadeu, F., Kot, K. (2001a) Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*. (65): 638-647.
- Ginther, O., Beg, M., Bergfelt, D., Kot, K. (2001b). Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biology of Reproduction*. (65): 345-50.
- Gordon, I., Lu, K.H. (1990), Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. (33): 77-87.
- Gordon, I., Lu, K.H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. (33): 77-87.
- Greve, T., Avery, B., Callesen, H. (1993). Viability of *in vivo* and *in vitro* produced embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 3 (28): 164-169.
- Greve, T., Xu, K., Callesen, H., Hyttel, P. (1987). *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer*. (4): 281-285.
- Hagemann, L.J., Beaumont, S.E., Berg, M., Donnison, M.J., Ledgard, A., Peterson, A., Schurmann, A., Tervit, H.R. (1999). Development during single ivp of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction and Development*. (53): 451-458.
- Hamano, S., Kuwayama, M. (1993). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology, Japón*. (39): 703-712.
- Hawk, H.W., Wall, R.J., (1994). Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*. 41 (8): 1571-1583.

- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S., Fernandez, M. (2007). Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. (15) 1.
- Hunter, H.F., Greve, T. (1997) Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. Reproduction in Domestic Animals. (32): 137-142.
- Hurnik, J. F., King, C. J., Robertson, H. A. (1975). Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. Applied Animal Ethology. (2): 55.
- Hurt, A., Ladim-Alvarenga, F., Seidel, G., Squires, E. (2000). Vitriification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. Theriogenology. (54):119-128.
- Hyttel, P., Fair, T., Callsen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology. (47): 23-32.
- Ireland, J.J., Roche, J.F. (1987). Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche J.F., O'Callaghan D. (eds). Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Michigan State University, USA. (39): 1-18.
- Izadyar, F., Hage, W.J., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (1998). The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. Molecular Reproduction and Development. (49): 444-453.
- Krisher, R. (2004). The effect of oocyte quality on development. Journal of Animal Science, West Lafayette. (82): E14-E23.
- Landínez Aponte, J.A., Villamediana, P.C., Hernández Fonseca, H.J., Soto Belloso, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Revista científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. (20): 659-664.
- Leibfried, L., First, N.L. (1979), Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. Journal Animal Science. (48): 76-86.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., First, N. L. (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biology of Reproduction. (35):850-857.

- Lonergan, P., Khatir, H., Carolan, C., Mermillod, P. (1997). Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *Journal of Reproduction and Fertility*. (109): 355-365.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Bagusi, A., Boland, M., Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. (37): 48-53.
- Luna, H.S., Ferrari, I., Rumpf, R. (2001). Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Animal Reproduction Science*. (68): 23-28.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., Tomanek, M. (2004). Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 61(2-3):329–35. Retrieved June 7, 2014
- Martino, A.; Mogas, T.; Palomo, M.J.; Paramio, M.T. (1994) Meiotic competence of prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*. 41:969-980.
- Matsushita, S.; Tani, T.; Kato, Y., Tsunoda, Y. (2004) Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science, USA*. (84): 293-301.
- Matton, P.; Adlakoun, V.; Countr, Y.; Dufour, J.J. (1981) Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *Journal of Animal Science, USA*. 52(4):813-20.
- Moor, R. M. (1990). Oocyte maturation. In: *Fertilization in mammals*. Serono Symposia, USA. Bavister, B.J., Cumminis, J., Roldan, E.R. (eds). 1-4.
- Osaki, S., Matsumura, K. Yamamoto, K., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S. (1997), Fertilization of bovine oocytes grown *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. (9): 781-787.
- Palasz, A.T., de La Fuente, J. (2007). Cultivo de embriones bovinos: Efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos *in vitro*. Parte (II). Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA, Madrid. *CYS B*. (8): 36-47.
- Palasz, A.T., de La Fuente, J. (2007). Cultivo de embriones bovinos: Esterilización y control de calidad y toxicidad en los laboratorios de

producción de embriones. Parte (I). Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA, Madrid. CYS B. (8): 36-40.

- Park, Y., Kim, S., Kim, J., Park, H., Byun, M. (2005). The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*. (64): 123-134.
- Pavlok, A., Kucas-Hahn, A., Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. (31): 63-67.
- Picton, H. M. (2001). Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology*. 55(6):1193–1210.
- Pierson, R. A. and Ginther, O. J. (1988). Follicular populations during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. *Animal Reproduction Science*. (16): 81.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J. (1987). Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Animal Reproduction Science, USA*. (15): 53-60.
- Pincus, G., Enzmann, E.V. (1935). The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*. (62): 665.
- Pryor, J. H., Hasler, J. F., Strøbech, L., Avery, B., Hashem, N., Menges, S., Long, C. R., Shewfelt, G., Looney, C. R. (2015). 86 improved bovine embryo production using novel *in vitro* culture systems. *Reproduction, Fertility and Development*. 28 (2), 172.
- Rahman, A., Khandoker, M., Asad, L., Saha, S., Paul, R., Debnath, S. (2015). *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes cultured in media supplemented with bovine serum albumin. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. Iran. 5 (3): 545-551.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*. (61): 234-248.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo

development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*. (61):234-248.

- Rodríguez, M., Vallejo, A., Batista, P., Espasandin, A. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. *Revista Cangüe, Uruguay*. (31): 44-50.
- Ruiz, J., Correa, J., Martínez, M. (2010). Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones. *Archivos de Medicina Veterinaria, Valdivia*. 1 (42): 79-83.
- Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L., First, N.L. (1991). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of Reproduction*. (44): 256-260.
- Sato, E., Matsuo, M., Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocyte *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 1. *Journal of Animal Science*. (68): 1182-1187.
- Savio, J., Boland, M., Roche, J. (1990). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. (88): 581.
- Scherthner, W., Schmoll, F., Brem, G., Schellander, K. (1997). Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21°C does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology*. (47): 297.
- Sekine J., Sakurada, T., Oura, R. (1992). Optimum temperature of ovarian transportation for *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Veterinary record*. (131): 372.
- Shioya, Y. (1993). Calf production by *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *JARQ*. (26): 287-293.
- Sirard, M.; Richard, F., Blondin, P., Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. (65): 126-136.
- Sirard, M.A., Blondin P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. (42): 417-426.
- Sirard, M.A., Parrish, J.J., Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L., First, N.L. (1988). The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction*. (39): 546-552.

- Sirois, J., Fortune, J. E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*. 39 (2): 308.
- Staigmiller, R.B., Moor, R.M. (1984), Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research*. (9): 221-229.
- Süß, U., Kassner, J., Wüthrich, K., Stranzinger, G. (1990). Cúmulus expansion, *in vitro* fertilization and embryonic development after *in vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of follicle stimulating or luteinizing hormone. *Reproduction in Domestic Animals*. (25): 3-13.
- Sutton, M., Gilchrist, R., Thompson, J. (2003). Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cúmulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update, Oxford Journals*. (9): 35-48.
- Takagi, M., Choi, Y.H., Kamishita, H., Acosta, T.J., Wijayagunawardane, M.P., Miyamoto, A., Miyazawa, K., Sato, K. (1998). Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow. *Animal Reproduction Science* 3 (51):195–203.
- Tsafiriri, A., Dekel, N., Bar-Ami, S. (1982). The role of oocyte maturation inhibition in follicular regulation of oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*: (64): 541-551.
- Varisanga, M., Sumantri, C., Murakami, M., Fahrudin, M., Suzuki, T. (1998). Morphological classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology, Japón*. 7 (50): 1015-1023.
- Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., Lonergan, P. (2002). Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. (57): 2105-2117.
- Wassarman, P.M. (1994). The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. (eds). *The physiology of reproduction*. Reven Press, New York. (1): 69-103.
- Watson, P. (1986) Problems in the cryopreservation of mammalian spermatozia. *Cryobiology*. (23): 547.
- Webb, R., Campbell, B. K., Garverick, H. A., Gong, J. G., Gutierrez, C. G. and Armstrong, D. G. (1999). Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility*. (54): 33-48.

- Wishart, D. F. (1972). Observations on the oestrous cycle of the Friesian heifer. *Veterinary Record*. 90 (21): 595-597.
- Yang, N.S., Lu, K.H., Gordon, I. (1990). *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*. (33): 352.
- Zuelke, K.A., Brackett, B.D. (1990). Luteinizing hormone enhanced *in vitro* maturation of bovine oocyte with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction*. (43): 784-787.

Páginas de internet:

- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/medium-199.html>
- <http://reproduccionbovina-mrgg.blogspot.com.ar/p/ciclos-reproductivos.html>
- [http://www.reprobiotec.com/libro\\_rojo/capitulo\\_07.pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_07.pdf)
- <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/20201/20201-1.html>
- <http://www.sateweb.com.ar/> Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias

Tesis y trabajos de investigación:

- Perry, G. (2013). Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. IETS (International Embryo Transfer Society). Data Retrieval Committee annual report. Págs. 1-13.
- Perry, G. (2012). IETS (International Embryo Transfer Society). Data Retrieval Committee annual report. Págs. 1-23.
- González P. (2007). Desarrollo de embriones bovinos partenogénéticos y fecundados *in vitro* cultivados *in vitro* e *in vivo* en oviducto de coneja. Universidad Austral de Chile, facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de reproducción animal. Chile. Págs. 1-40
- Martínez Martínez, Y. (2013). Análisis de la morfología ovocitaria bovina previa a fecundación un vitro. Máster Universitario en Biología y Tecnología de la reproducción, Universidad de Oviedo, España. Págs. 1-36.