



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes - Argentina

Trabajo Final de Graduación

-Módulo de intensificación práctica-

Opción Producción Animal

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR SUCESIVA
EN HEMBRAS BOVINAS DE LA RAZA BRANGUS.**

TUTOR EXTERNO: Dr. César Joaquín Arreseigor.

TUTOR INTERNO: Mgter. Pablo Maldonado Vargas.

ALUMNO: Ana Del. Pilar Toledo Gómez.

Corrientes, 2020.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Nordeste por darme la oportunidad de estudiar.

A mis docentes por la dedicación y la paciencia que me brindaron durante los años de mi formación académica.

A mi tutor interno Mgter. Pablo Maldonado Vargas por su apoyo incondicional y el valioso tiempo dedicado en pos de mi formación integral.

A mi tutor externo Dr. César Joaquín Arreseigor por su buena predisposición y entrega desde el llamado a acompañarme en este proyecto.

A mis amigos de la facultad con quienes compartimos momentos de estudio y por estar siempre cuando lo necesité.

A mis amigos de toda la vida quienes en momentos difíciles se hacían presente de una u otra manera.

A mi familia por la confianza y el acompañamiento.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
DONANTES DE OVOCITOS.....	6
ASPIRACIÓN FOLICULAR.....	6
LAVADO, CLASIFICACIÓN Y TRANSPORTE.....	7
MADURACIÓN IN VITRO	9
FERTILIZACIÓN IN VITRO.....	10
CULTIVO IN VITRO	10
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIÓN	20
BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

La aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU) y la fertilización *in vitro* (FIV) son técnicas utilizadas como alternativa para la producción de embriones bovinos. La OPU es una técnica que puede ser utilizada en hembras prepúber, vaquillas, vacas adultas, y no menos importante, en hembras con problemas reproductivos adquiridos e inclusive en vacas preñadas hasta el tercer y el sexto mes de gestación. La OPU-FIV presenta resultados muy variables en cuanto a número de folículos aspirados, el número de ovocitos recuperados, viabilidad de los mismos y la producción de blastocitos. Este trabajo tiene como objetivo evaluar la eficiencia productiva de la aspiración folicular sucesiva en hembras de la raza Brangus. Con ese fin se evaluaron 95 aspiraciones foliculares de 13 hembras Brangus con siete y ocho punciones sucesivas con un intervalo aproximado de 1,5 mes entre cada una donde se analizan ovocitos totales, clivaje y producción total de embrión. La media para las siguientes variables fue total de ovocitos (29,57), cultivo *in vitro* (17,59), clivados (13), porcentaje de clivaje (63,92%), total de embriones (5,25) y porcentaje de embriones (25,48%). Las donantes evidenciaron tras el procedimiento una correlación lineal negativa tanto en la obtención de ovocitos totales, clivaje y producción de embrión total y por vaca examinada. Considerando los resultados del presente estudio, se concluye que dichas variables a medida que se realizan las sesiones va bajando su producción, lo cual en términos generales se observa de la primera a la séptima u octava aspiración folicular.

INTRODUCCIÓN

El uso y desarrollo de biotecnologías de reproducción animal son condiciones indispensables para aumentar la eficiencia productiva. En este sentido, especialmente con respecto a los rumiantes domésticos, se han utilizado con éxito biotecnologías como la inseminación artificial (IA), la fertilización *in vitro* (FIV) y la transferencia de embriones (TE) (Figueredo et al., 2007)

Los avances obtenidos a lo largo de los años han permitido una mayor participación de la hembra bovina en el proceso de mejora genética del rodeo, ya que el número de descendientes que dejó una sola hembra a lo largo de su vida reproductiva ha aumentado significativamente con las técnicas de transferencia y producción de embriones *in vitro* (PIV) (Gonçalves et al., 2007).

Las hembras bovinas han sido objeto de varias investigaciones, lo que hizo posible el uso más racional de sus gametos. Según Hafez y Hafez (2000), la hembra bovina tiene, en el momento de la pubertad, aproximadamente 70.000 a 100.000 ovocitos en sus ovarios, lo que por medios naturales puede generar cerca del 0,01% de productos viables, es decir, un número cercano a diez descendientes a lo largo de su vida reproductiva (Bols et al., 1997).

Entre las alternativas propuestas para vacas y vaquillas, destacamos la TE, que se ha utilizado con éxito desde 1951, cuando Willet et al. (1951) hicieron el primer informe de un producto nacido por esta técnica.

La aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal para posteriormente ser llevados a la maduración, fertilización, cultivo *in vitro* hasta blastocisto (Solis Corrales, 2011).

Dicha técnica fue utilizada inicialmente asegura Palma (2008), en ginecología humana y empleada en ganado bovino por primera vez a finales de la década de los 80, posteriores ensayos llevaron, a principios de los 90 hasta un método poco invasivo y con alta eficacia para la recolección repetida de ovocitos de vacas donantes vivas (Solis Corrales, 2011).

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía se adoptó para ser utilizada de forma repetida en vaquillas seleccionadas, vacas de alto mérito genético (Kruip et al., 1994), vacas preñadas hasta el 3er mes de gestación (Nibart et al., 1995) e inclusive de hembras prepúberes (Nava y Hernández, 2005) para producir gran

cantidad de terneros con cualidades productivas conocidas y acortar el intervalo generacional en los programas de producción de ganado (Palma, 2008).

Dado que, por cría natural o IA, se puede obtener solo un ternero por vaca al año, la aplicación de nuevas biotecnologías es ideal para acelerar el proceso de mejora genética. Entonces, con el advenimiento de superovulación y posterior transferencia de embriones (SOV-TE), fue posible obtener una producción promedio de 25 embriones por año, totalizando alrededor de 100 embriones en la vida reproductiva de una vaca (Saumande et al., 1984).

La brecha generacional es uno de los elementos clave en cualquier enfoque sobre la cría de animales (Betteridge et al., 1989). El desarrollo de folículos antrales en terneros a partir de las 2 semanas de edad, conocimiento de las ondas foliculares y la capacidad de sobre estimular el desarrollo folicular en esta categoría de animales, ofrece la posibilidad de utilizar animales pre púberes para la recuperación de ovocitos (Adams et al., 1994). Dichos ovocitos tienen la misma competencia para la PIV en comparación con los obtenidos de animales adultos (Armstrong et al., 1994), pero el número de ovocitos recuperados de terneras tiende a ser del 20% más pequeño (Nibart et al., 1995).

Katska y col. (1984), observó que cuanto mayor era el animal, menor era la actividad ovárica, presentando menos folículos a aspirar. Por lo tanto, las vacas pueden producir crías, prácticamente desde el nacimiento hasta su senilidad. Su importancia también radica en que existen muchos casos de cambios en la fertilidad debido a problemas adquiridos, tales como quistes, adherencias ováricas y uterinas, metritis, infecciones crónicas, infecciones de trompas y otras patologías (Looney et al., 1994). La OPU-FIV permite la producción de progenie de animales con tales enfermedades (Kruip et al., 1994), ya que no necesita el resto del sistema reproductivo, si el ovario tiene folículos de tamaño suficiente para ser aspirado.

La aspiración folicular es una técnica muy reciente, desde el nacimiento del primer ternero producido por FIV que tuvo lugar en 1981 (Bracket et al., 1982) y el primer ternero nacido por OPU-FIV en el año 1988 (Pieterse et al., 1988). Por tanto, la OPU-FIV presenta resultados muy variables en cuanto a número de folículos aspirados, el número de ovocitos recuperados, viabilidad de los mismos y la producción de blastocistos.

El éxito de la técnica OPU-IVP depende del tamaño de la población folicular antral (AFP) (Boni et al., 1997) y diferentes factores que influyen directa o indirectamente en la eficacia de la maduración, fertilización y cultivo de embriones

(Hendriksen et al., 2004). El tamaño del folículo antral aspirado tiene una gran relevancia (Lonergan et al., 2002 y Bagg et al., 2007), como el desarrollo del ovocito, ya que la competencia continúa aumentando a medida que crece el tamaño del folículo y se acerca a la ovulación (Hyttel et al., 1997). Por lo tanto, el diámetro del folículo ovárico en el momento de la sesión OPU es uno de los criterios más importantes utilizados para mejorar la eficacia de los sistemas de PIV (Vassena et al., 2003).

Los ovocitos recuperados de los folículos antes de la fase de desviación han dado mayor capacidad de desarrollo in vitro para alcanzar la etapa de blastocisto (Hendriksen et al., 2004; Hagemann et al., 1999; Machatkova et al., 2004). En este sentido, los ovocitos aspirados de folículos de 6 mm de diámetro tienen mayor competencia en comparación con los ovocitos de <4 mm de folículos (Lequarre et al., 2005) y son más propicios para alcanzar la etapa de blastocisto (Lonergan et al., 1994). Por lo tanto, estrategias para estimular el crecimiento del folículo antes de la OPU puede incorporarse para programas OPU-IVP para Bos Taurus.

Aproximadamente el 80-90% de los ovocitos bovinos inmaduros experimentan maduración nuclear in vitro, aproximadamente 80% se somete a fertilización, 30-40% se desarrolla a la etapa de blastocisto, y alrededor del 50% de los embriones transferidos establecen un embarazo (Wrenzycki, 2016).

La mayoría de las vaquillas que se trabajan con frecuencia, comienzan con un alto número de ovocitos, pero el número de ovocitos disminuye con el tiempo. A pesar del mayor número de ovocitos producido por las novillas más jóvenes, la tasa de producción de embriones es menor que la de las vaquillas más viejas (21% vs 30%) (Demetrio, 2020).

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficiencia productiva de la aspiración folicular sucesiva en hembras Brangus.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar las hembras con 7 u 8 aspiraciones foliculares sucesivas de la base de datos que comprende registros OPU / FIV de Clientes de Bionorte S.A.
- Analizar los datos de ovocitos totales, clivaje y producción de embriones de las hembras Brangus.
- Utilizar la información obtenida del análisis para evaluar la eficiencia productiva de la aspiración folicular sucesiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio examinó los datos recopilados desde junio de 2017 hasta junio de 2018 en el centro de Embriones In Vitro de Bovinos Bionorte S.A., ubicado en Asunción, en el Departamento Central, Paraguay.

El procedimiento de aspiración folicular más la técnica de filtrado, selección, clasificación y lavado de ovocitos se realizó en el establecimiento ganadero Semon S.R.L. (donde se encuentran las donantes y receptoras), ubicada en San Cristóbal, Departamento de Alto Paraná, Paraguay en latitud 25°46'16.2"S y longitud 55°26'21.3"W, los cuales fueron transportados por una distancia de 300 km hasta el laboratorio Bionorte S.A., para la fertilización y posterior maduración del embrión.

- Donantes de ovocitos

Las donantes fueron 13 hembras de la Raza Brangus, con buen estado de salud y condición corporal, las mismas se encontraban en un sistema semi-intensivo, mantenidas exclusivamente con pastura *Brachiaria brizantha* más suplementación con sal mineral tortuga y agua a voluntad. Se realizaron en total 95 sesiones de OPU.

- Aspiración folicular

Todas las donantes al pasar por la manga recibieron anestesia epidural baja con 5 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (Kruip et al, 1994), y posteriormente la región perineal se lavó con agua. El procedimiento de aspiración folicular se realizó utilizando un equipo de ultrasonido Aloka SSD 500 con transductor microconvexo de 5 mHz (UST 974-5) conectado a una guía de aspiración WTA para ALOKA con sistema teflón (Figura 1). Las aspiraciones se realizaron con agujas nitro 18G x 1 1/2 (Cook VBOA 1855) y línea de aspiración (Cook VBOA 18L) en tubos de centrifuga de 50 ml. La presión de vacío se obtuvo con una bomba WTA, ajustada entre 72 y 78 mmHg. Inmediatamente después de la anestesia, se insertó el transductor hasta fondo de vagina y por manipulación rectal los ovarios fueron posicionados para obtener una buena visualización en la pantalla de ultrasonido y así ubicar los folículos mayores a 2 mm a ser aspirados (Nibart et al., 1995). El lavado de la aguja y los medios para recibir los ovocitos fue hecho con PBS (Nutricell) más 5 UI/ml de Heparina (Liquemine®), 50

mg/ml de Gentamicina (Gentocin®) y Suero Fetal Bovino al 1% (SFB Nutricell).



Figura 1. Equipo para Aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU), manipulada por el veterinario a cargo del procedimiento.

- Lavado, clasificación y transporte

En el laboratorio del establecimiento ganadero, donde se realizó la aspiración, el tubo con el contenido aspirado se vertió en el filtro de recolección de embriones (EmCom®), y se lavó con la misma solución utilizada para lavar la aguja. El sedimento restante en el filtro se observa en placas de Petri para realizar el recuento y la evaluación de la calidad de los ovocitos (Figura 2 y 3). Los ovocitos se clasificaron según su morfología (número de capas de las células del cúmulo y las características del citoplasma) Lonergan et al. (1994).

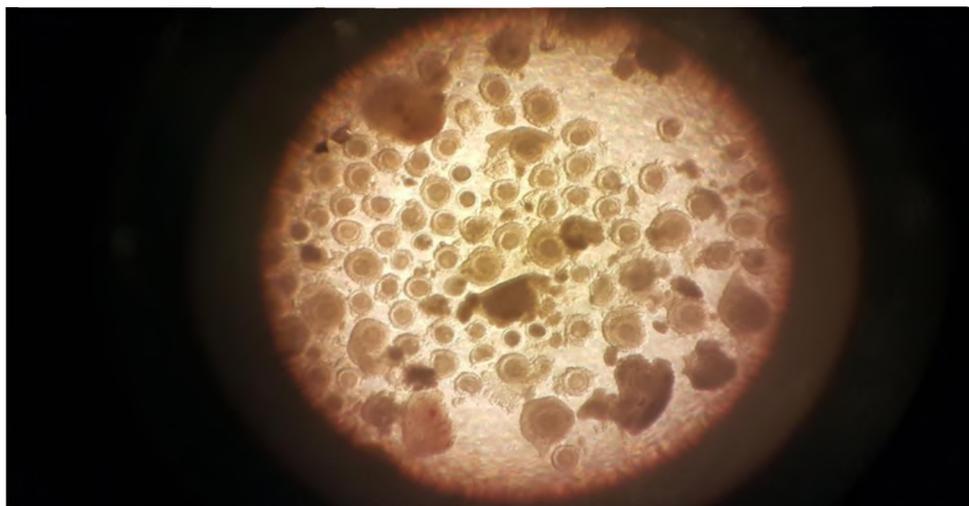


Figura 2. Ovocitos colectados de Donantes Brangus.



Figura 3. Proceso de búsqueda de ovocitos a campo.

Posteriormente fueron lavados en solución TCM 199 (Gibco) suplementado con 10% SFB (Gibco), transportado en criotubos (Corning) con la misma solución en baño maría, entre 30 y 34°C (Figura 4). El tiempo de transporte promedio varió entre 3 y 5 horas, desde la cabaña hasta la llegada al laboratorio BIONORTE S.A. (Figura 5).



Figura 4. Transportadores de ovocitos y colidón de gas mezcla para transporte y cultivo.



Figura 5. Laboratorio de producción de embriones.

- Maduración *in vitro*

Los ovocitos obtenidos fueron seleccionados según su grado de calidad, se utilizan ovocitos con o sin células del cúmulus, pero con aspecto de granulación citoplasmática homogénea, se descartaron los atrésicos y degenerados. Luego de la selección, fueron transferidos a las placas de maduración *in vitro* con microgotas de Medio TCM 199 suplementado con 10% de SFB, 5 $\mu\text{g/ml}$ de FSH, 50 $\mu\text{g/ml}$ de LH y 01 $\mu\text{g/ml}$ de Estradiol cubierto con Aceite Mineral de acuerdo con el protocolo de Watanabe et al. (1998) (Figura 6), allí permanecen incubando por 24 horas a 38,5 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂.



Figura 6. Maduración de ovocito previa a la fecundación.

- Fertilización in vitro

Para la FIV, se utilizó semen congelado de toros de la raza Brangus, el cual fue preparado mediante la técnica de Gradiente de Percoll que consiste en obtener espermatozoides móviles, eliminar el diluyente y el plasma seminal. La concentración se ajustó a 2×10^6 spermatozoides/ml. El medio utilizado en la FIV fue el medio Tiroides Modificado (TALP), más Penicilina, Hipotaurina, Epinefrina (PHE) y $10 \mu\text{g/ml}$ de Heparina. Los gametos fueron incubados en microgotas cubiertas con Aceite Mineral durante 18-20 horas a $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$, en una atmósfera de 5% de CO_2 .

- Cultivo in vitro

Pasado el tiempo de incubación de los gametos, las estructuras fueron transferidas al medio de cultivo microgotas (CR2 modificado, suplementado con 10% SFB), permaneciendo en este por un período de 6 a 8 días (C6 a C8) hasta que los cigotos alcanzan la etapa de mórula (Mo) y/o blastocisto (BI) (Figura 7) Se agregaron $30 \mu\text{l}$ de medio de cultivo fresco a las 48 horas posteriores a la inseminación (feeding).

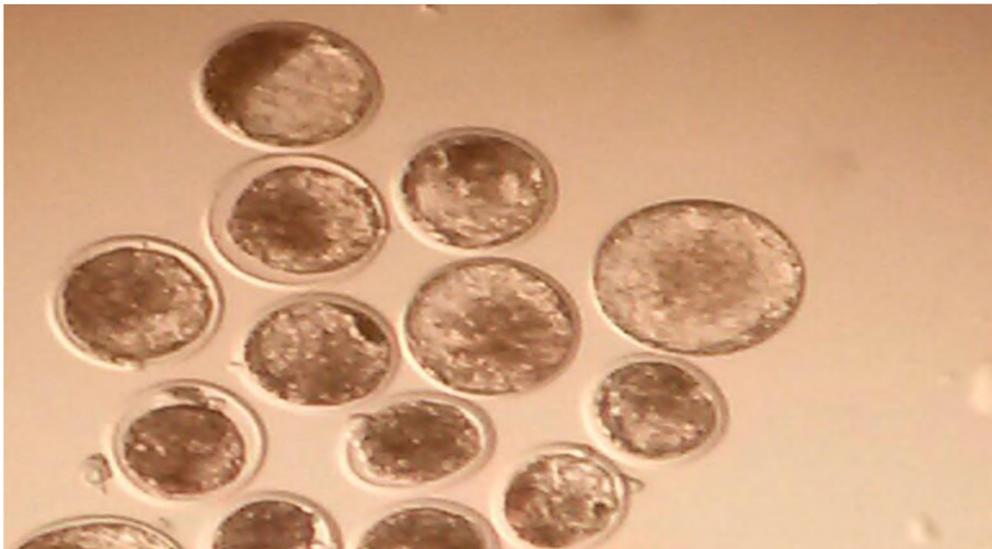


Figura 7. Embriones obtenidos por Fertilización *In Vitro* (FIV).

- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron escritos en planillas de excel y se realizaron medidas de resumen. A fin de evaluar la eficiencia de la técnica en las vacas a lo largo de las sucesivas punciones realizadas, se realizó análisis de correlación lineal de Pearson de la primera a la séptima u octava sesión para las variables de ovocitos totales colectados por OPU, porcentaje de clivaje y producción de embriones, mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo, 2020).

RESULTADOS

Del total de 95 OPU realizadas en 13 vacas (entre 7 y 8 punciones por vaca) se obtuvieron los siguientes datos presentados en la tabla 1.

Variable	n	Media	D.E.	Min	Max
TOTAL DE OVOCITOS	95	29,57	17,80	6,00	91,00
OVOCITOS CIV	95	17,59	13,32	0,00	71,00
CLIVADOS	95	13,00	10,60	0,00	63,00
% DE CLIVADOS	95	63,92	30,52	0,00	100,00
TOTAL DE EMBRIONES	95	5,25	5,34	0,00	22,00
% DE EMBRIONES	95	25,48	21,85	0,00	80,00

Tabla 1. Medidas de resumen de ovocitos totales, ovocitos cultivados in vitro (CIV), ovocitos clivados, porcentaje de clivaje, total de embriones producidos por OPU-FIV y porcentaje de embriones producidos.

La evaluación de la obtención de ovocitos totales se presenta en la figura 8, la misma resultó negativa ($p < 0,05$), donde se puede visualizar en el gráfico, que del primer procedimiento de OPU a la séptima u octava fecha de aspiración, la producción de ovocitos totales disminuye.

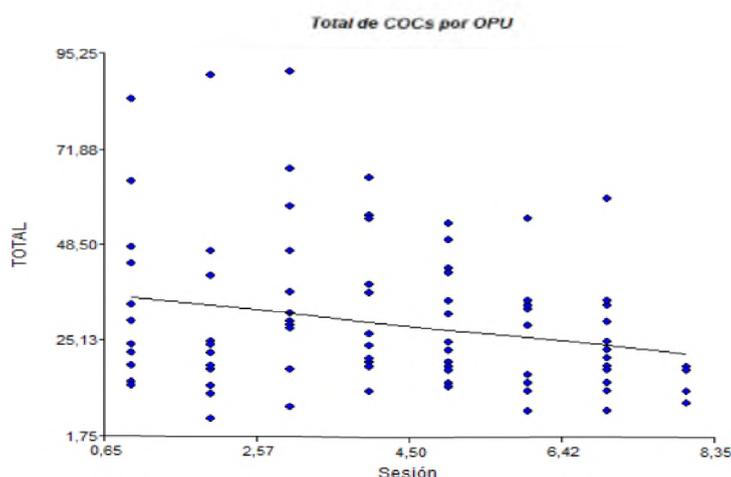


Figura 8. Ovocitos totales por punción folicular.

En la figura 9 se presenta la correlación lineal para el total de clivaje por sesión. La misma arroja resultado negativo ($p < 0,05$), observándose que existe menor tasa de clivaje a medida que se realizan los procedimientos.

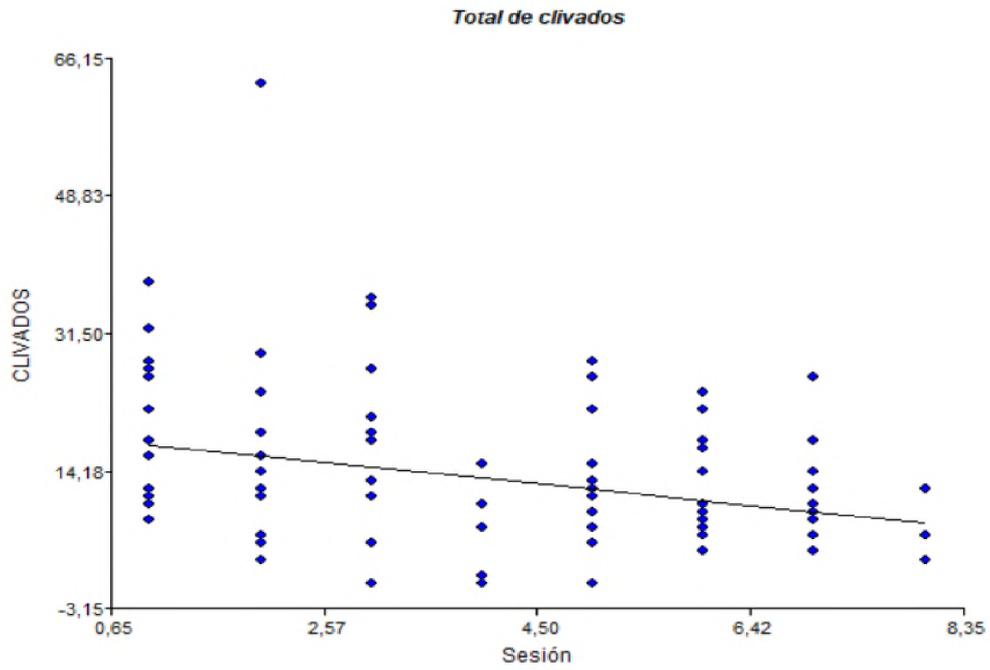


Figura 9. Total de clivados por sesión de OPU.

EL análisis de producción de embriones totales en repetidas sesiones para cada vaca, evidenciada en las figuras 10 a 22.

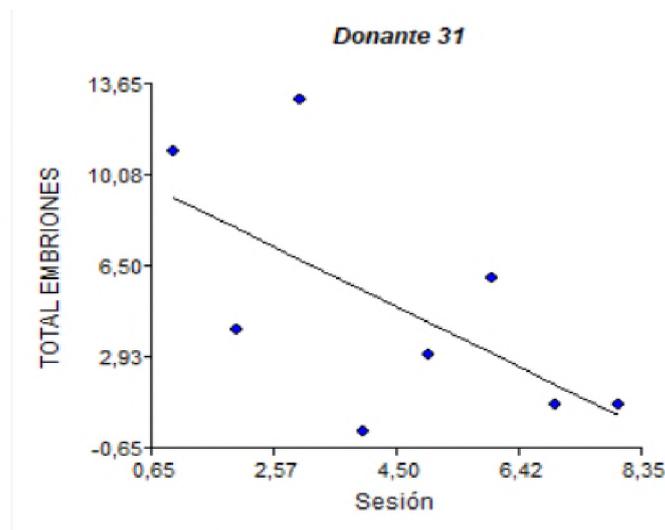


Figura 10. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 31.

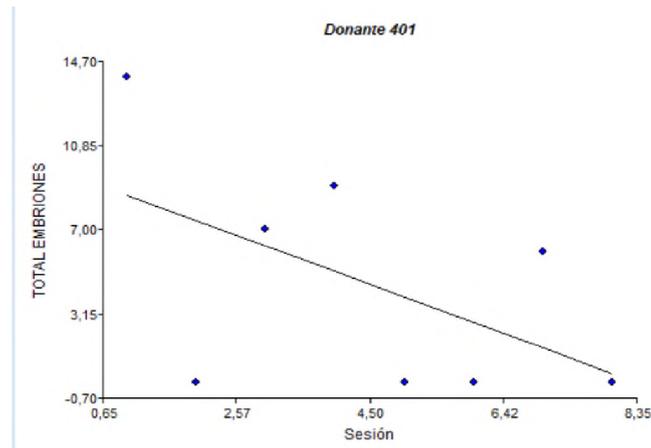


Figura 11. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 401.

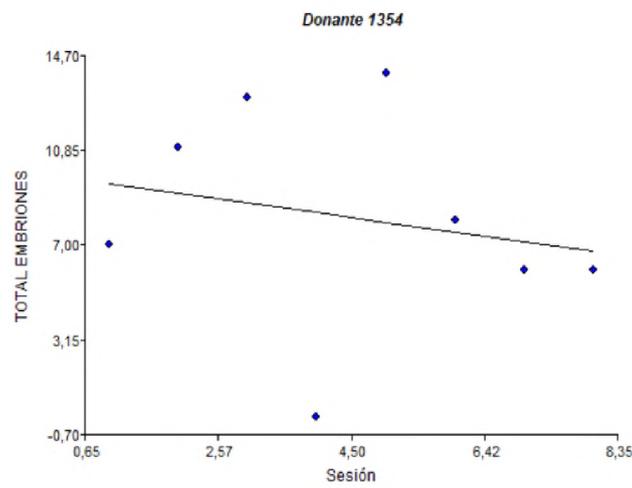


Figura 12. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 1354.

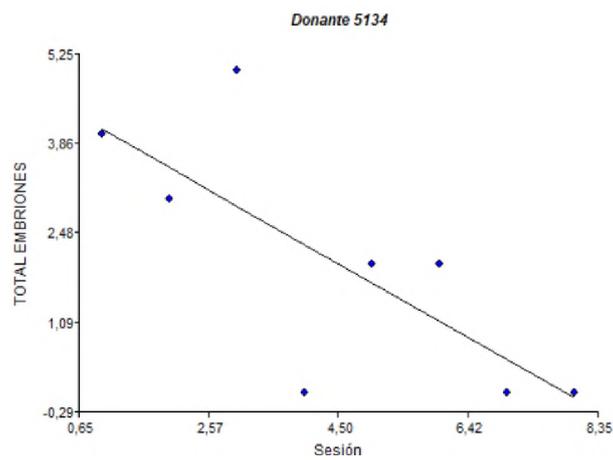


Figura 13. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 5134.

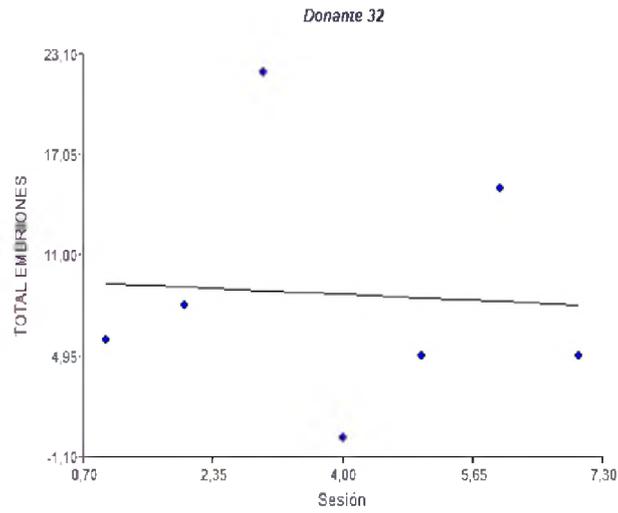


Figura 14. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 32.

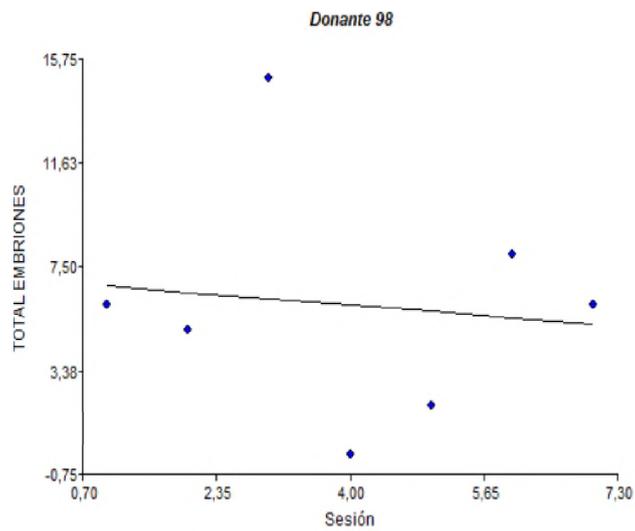


Figura 15. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 98.

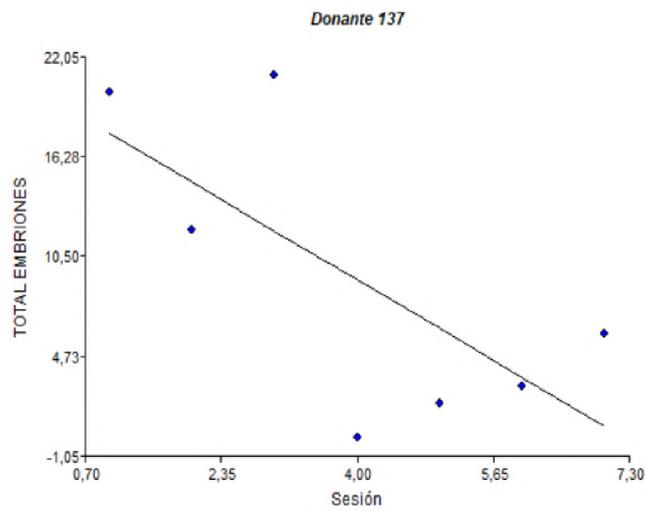


Figura 16. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 137.

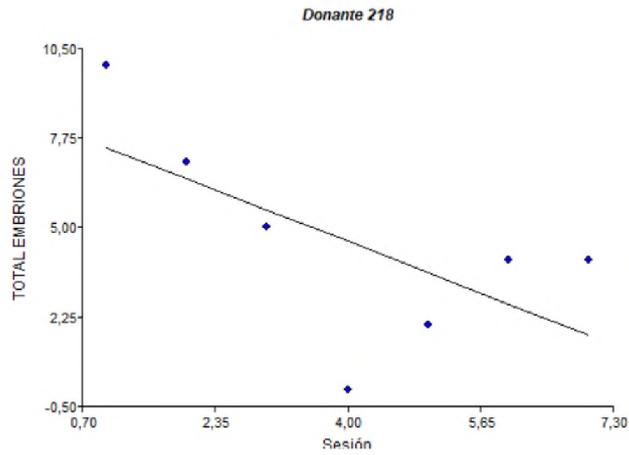


Figura 17. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 218.

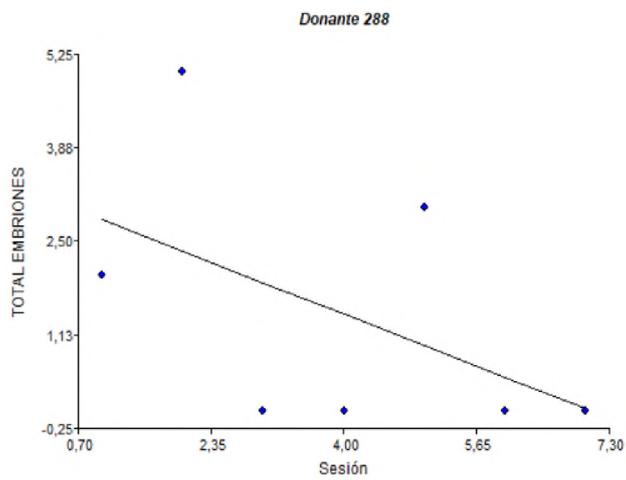


Figura 18. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 288.

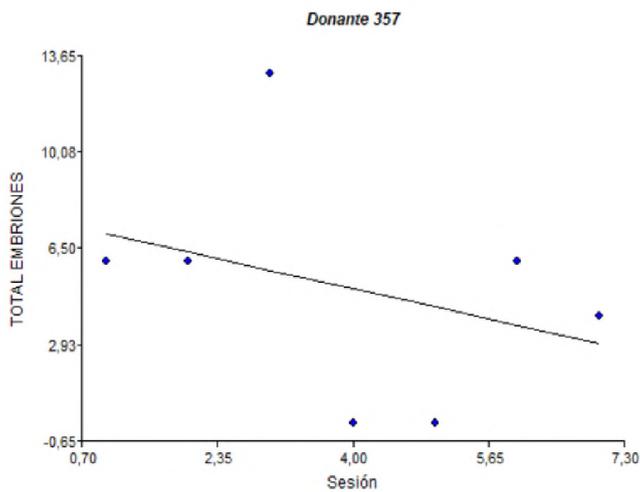


Figura 19. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 357.

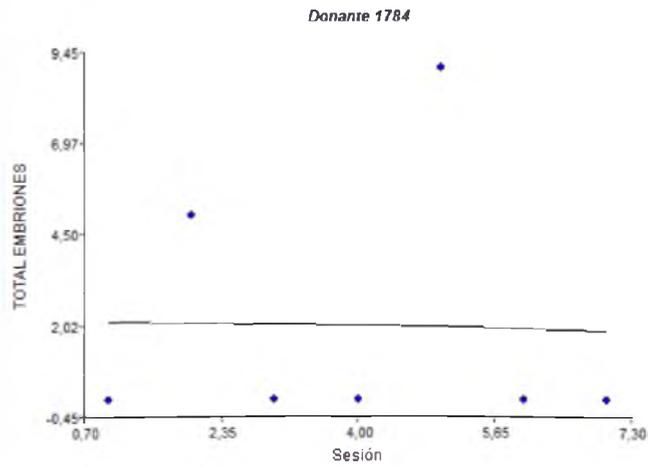


Figura 20. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 1784.

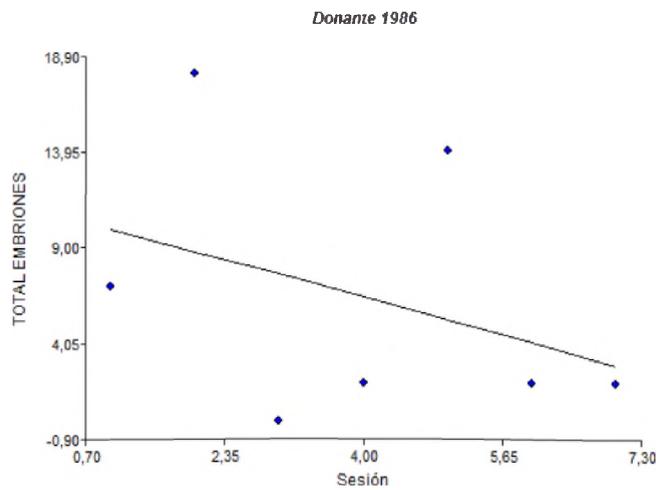


Figura 21. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 1986.

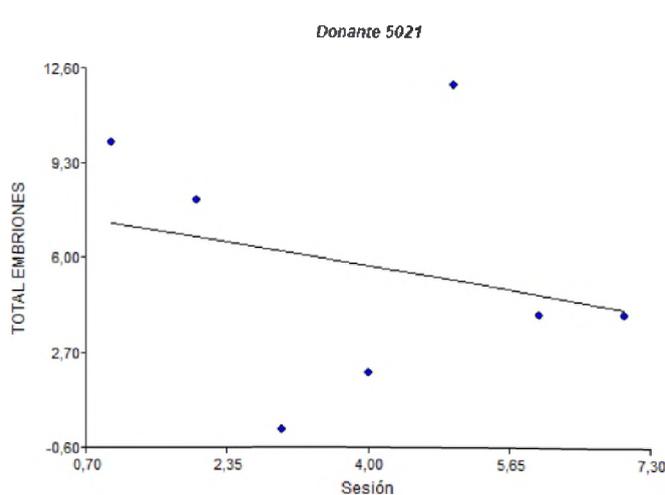


Figura 22. Total de embriones producidos por sesión de la donante RP 5021.

En el total de las donantes se observa una correlación lineal negativa ($p < 0,05$), con respecto a la producción de embriones en las sucesivas sesiones de OPU.

En la figura 23 se representa la correlación del total de embriones producidos en las diferentes sesiones de punciones.

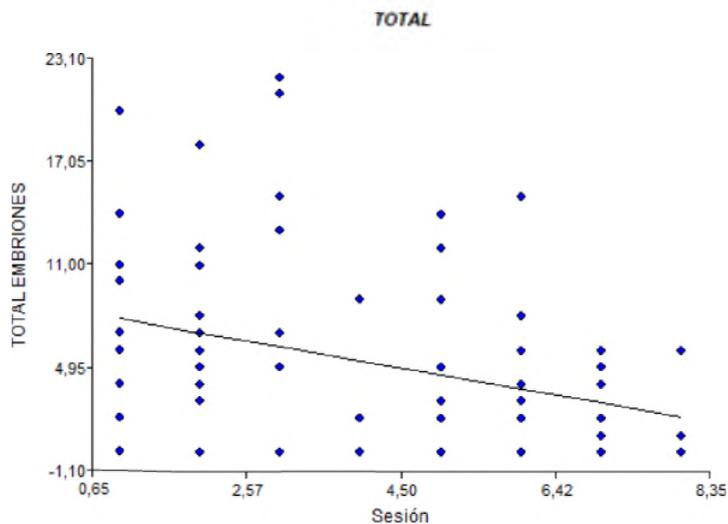


Figura 23. Total de embriones producidos en las distintas sesiones de OPU

Del total de embriones producidos en cada sesión de OPU también la correlación observada fue negativa ($p < 0,05$), a medida que se realizan las aspiraciones foliculares en las distintas fechas, cabe recalcar que los procedimientos fueron realizados desde junio 2017 a junio 2018, con un intervalo aproximado de 1,5 mes entre cada sesión.

DISCUSIÓN

Se ha informado que la utilización de OPU en combinación con la FIV mejora la eficacia de los PIVE en vacas *Bos taurus* (Blondin, 2016), aunque el programa PIVE derivado de OPU tiene algunos méritos para la propagación de la genética, el número de embriones transferibles es aún menor que los procedimientos de ovulación múltiple y transferencia de embrión (MOET) en vacas *Bos taurus* (Dieleman et al., 2002). En nuestro trabajo donde los embriones producidos fueron producto de OPU-FIV sin estimulación hormonal, se cree que puede ser una de las causantes de la baja PIVE, teniendo en cuenta que en otros trabajos donde la técnica fue complementada con superovulación se obtuvieron mejores resultados.

Igualmente, Boni (2012) realizó un análisis retrospectivo de 25 años y concluyó que la población folicular, etapa de crecimiento folicular y la calidad de los ovocitos son los factores principales que afectan la eficacia del programa PIVE en vacas *Bos taurus*. Por otro lado, Nibart et al. (1995) demostraron que la variabilidad en producción de ovocitos entre donantes es muy grande, debido a que los animales responden de manera diferente a la aspiración folicular y hasta en el mismo animal puede variar en la producción de ovocitos totales, viables y producción de blastocistos. Dayan et al. (1999), también reportaron, que factores como la presencia de CL interfiere con el resultado, así lo demostraron en 184 procedimientos donde las vacas sin el CL mostraron un mayor número de ovocitos. Sin embargo, datos no publicados mencionan que la competencia ovocitaria está dada por el tamaño de los folículos, dándole mayor capacidad ovulatoria a medida que aumentan de tamaño. En este trabajo consideramos que una de las variables que podría haber influido es la competencia ovocitaria, el cual es un proceso complejo que involucra la maduración integral (núcleo, citoplasma y expresión génica). Ya que se sabe, que la competencia ovocitaria es un concepto ampliamente usado para distinguir los ovocitos que son capaces de producir un embrión viable y transferible después de la fertilización (Duranthon y Renard, 2001).

Dayan et al. (2001) señala que obtuvieron una media de 14,29 ovocitos totales, resultando en 36,20% de embriones. Por su parte Kruip y col. (1994), obtuvo un promedio de 8 ovocitos por sesión de OPU, con un 16% desarrollándose en embriones transferibles. Ambos trabajos obtuvieron resultados menores al nuestro en cuanto a ovocitos totales, ya que obtuvimos una media de 29,57, sin embargo, el resultado de producción de embriones fue mayor al de Kruip et al (1994), pero menor a Dayan et al.(2001) con 25,48%.

Dayan et al. (2000a), informan que obtuvieron un promedio de 4,2 embriones por vaca, por sesión de OPU, resultado menor al nuestro que obtuvimos una media de 5,25.

Dayan et al. (2000b), mostraron gran variación en la producción de blastocitos, que varió entre 14 y 54%, comparando con los datos obtenidos en nuestro trabajo, la variación fue aún mayor de 0 a 80%.

Ferraz y col. (2000), informó que el primer procedimiento OPU presenta mejores resultados, igualando solo a intervalos superiores a 60 días. En nuestro trabajo en donde se realizó los procedimientos de OPU a un intervalo de 45 días aproximadamente, observamos que se mantiene una buena producción de ovocitos hasta la tercera aspiración, en cambio en la cuarta y/o quinta existe una baja colección y por lo tanto cero producción de embriones, para posteriormente mantener un nivel aceptable de producción tanto de ovocitos como embriones en las sesiones siguientes. Considerando lo antes dicho, Kruijff et al. (1994), menciona que la tasa de recuperación de ovocitos inmaduros aumenta si la recolección es repetida en el mismo animal durante un periodo de varios meses.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que la eficiencia de la técnica disminuye en repetidas sesiones de OPU.

Hay que tener en cuenta que existe muchos factores involucrados para obtener un ternero vivo de un embrión producido por FIV, prestar atención a los detalles en cada paso del proceso es crucial para el éxito, más todos los factores extrínsecos e intrínsecos que influyen para llegar a la obtención de un blastocisto transferible.

La aspiración folicular guida por ultrasonografía es una técnica bastante nueva, que está siendo estudiada a mayor profundidad por los beneficios que brinda a la hora de facilitar la obtención de ovocitos de una hembra bovina con alto mérito genético y estrechar la brecha generacional

En Paraguay su aplicación es más reciente aún y de uso poco masivo, por ende, seguir realizando investigaciones en pos de tener una mejor comprensión de todos esos factores que influyen tanto de forma negativa y/o positiva ayudaría a obtener mejores resultados en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams GP, Evans ACO, Rawlings NC. 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil*, v.100, p. 27-33.
2. Armstrong DT, Irvine B, Earl CR, Mclean D, Seaman RF. 1994. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, v.42, p. 1227-1236.
3. Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. 2007. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev.*, v.19, p. 797-803.
4. Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xy KP, King WA. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil*, v.38, p. 87-98.
5. Blondin P. 2016. Logistics of large-scale commercial IVF embryo production. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.29, p. 32-36.
6. Bols PEJ et al. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, Stoneham, v.47, p. 1221- 1236.
7. Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J, Kruip TAM. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)84075-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)84075-7)
8. Boni R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim. Reprod.*, v.9, p. 362-369.
9. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donarvick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, v.27, p. 147-158.
10. Dayan A, Watanabe MR, Lobo RB, Franceschini PH, Watanabe YF. 1999. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção in vitro de embriões em raças zebuínas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.27, n.1, p. 226.
11. Dayan A, Watanabe MR, Watanabe YF. 2000a. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, n.1, p. 181-

12. Dayan A, Watanabe MR, Meirelles FV, Lobo RB, Watanabe YF. 2000b. Bos indicus and Bos taurus in vitro produced embryos develop similarly in tropical conditions. *Theriogenology*, v.53, p. 348.
13. Dayan A. 2001. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, p. 32.
14. Demetrio DGB, Benedetti E, Demetrio CGB, Fonseca J, Oliveira M, Magalhaes A, Santos RM. 2020. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod.*, <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>
15. Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff PD, Thomsen P, Hyttel HM, Knijn C, Wrenzycki TAM, Kruip H, Niemann BM, Gadella MM, Bevers VP, Os PLAM. 2002. Effects of in vivo pre maturation and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p. 5–20.
16. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
17. Duranthon V, Renard JP. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, v.55, p. 1277-1289.
18. Ferraz ML, Dayan A, Watanabe MR, Watanabe YF. 2000. Influência da frequência de OPU-FIV em bovinos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, n.1, p. 251.
19. Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV. 2007. Importância da biotécnica de Moifopa para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p. 143-152.
20. Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. 2007. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.31, p.212-217.
21. Hafez ESE, Hafez B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In: *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,

Cap.5, p. 68-82.

22. Hagemann L, Beaumont S, Berg M, Donnison M, Ledgard A, Peterson A, et al. 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev.*, v.53, p. 451.
23. Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, et al. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00278-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00278-4).
24. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p. 23-32.
25. Katska L, Smorag Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.7 p. 451-460.
26. Kruip TAM et al. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, Stoneham, v.42, p. 675-684.
27. Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, et al. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>.
28. Lonergan P et al. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v.37, p. 48- 53.
29. Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. 2002. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev.*, v.41, p. 427.
30. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows., *Theriogenology* v.41 p. 73.
31. 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*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00216-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4).
32. Nava H y Hernández H. 2005. Aspiración folicular transvaginal. Universidad de Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela. [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros online/manualqanadena/sección 8/articulo3 s8 pdf](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros%20online/manualqanadena/secci3n%208/articulo3%20s8.pdf).

33. Nibart M, Silva Peiwer M, Thuard JM, Durant M, Guyader-Joly C, Ponchon S, Marquant-Le Guienne B, Humblot P. 1995. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: Réunion A.E.T.E., XI, Hannover, Proceedings, p. 216.
34. Palma GA. 2008. Biotecnología de la Reproducción, 2da. Edición, Mar del Plata, Argentina, p. 669.
35. Saumande J, Procureur R, Chupin D. 1984. Effect of injection time and antiPMSG antiserum on ovulation rete and quality of embryos in superovulated cow. *Theriogenology*, v.21, p. 727.
36. Solís Corrales AJ. 2011. Efecto de la sincronización de la onda folicular y la frecuencia de recolección sobre la obtención de ovocitos mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía en novillas Brahman. Trabajo de graduación sometido para optar por el título de maestro en ciencias pecuarias con énfasis en producción animal. Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. David Chiriquí, Panamá, p. 139.
37. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00101-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00101-8).
38. Watanabe YF, Watanabe MR, Dayan A, Vila RA, Lobo RB. 1998. Competência de oócitos, oriundos de diferentes fêmeas bovinas, na produção in vitro de blastocistos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.26, n.1, p. 384-385.
39. Willet EL et al. 1951. Successful transplantations of fertilized bovine ovum. *Science*, v.113, p. 247.
40. Wrenzycki C. 2016. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Anim Reprod.*, v.13, p. 279-82. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR869>.