



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“NO DIFFERENCE IN MATURATION CAPACITY, IN VITRO
FERTILIZATION AND PREGNANT RATE OF OOCYTES OBTAINED BY
ULTRASOUND-GUIDED OVUM PICK-UP FROM PREGNANT DAIRY
COWS AND HEIFERS”

**ARTÍCULO ESPECIALIZADO PARA PUBLICAR
EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

GLORIA PATRICIA ZAVALA GONZÁLEZ

ASESORES

DR. NAZARIO PESCADOR SALAS
DRA. YAZMÍN ELIZABETH FELIPE PÉREZ

REVISORES

MVZ. EPO. BULMARO VALDEZ RAMÍREZ
M en C. GERARDO JARAMILLO ESCUTIA



Toluca, Estado de México, Mayo de 2018.

Dedicatoria

A mis padres por todo el apoyo incondicional que me han brindado ya que sin ellos no hubiese podido lograrlo.

Agradecimientos

Son diversas las personas y entidades que han estado involucradas directa e indirectamente en este trabajo a todas ellas les agradezco su confianza y apoyo incondicional para hacer posible la culminación del presente, en especial a:

- In vitro Brasil México, en especial a Luiz quien me facilitó los datos y a Bertha por su ayuda y amistad durante mi estancia.
- M. en C. Adrián Nava Mondragón que me ofreció el tema de este proyecto y me permitió utilizar los datos del estable.
- Dr. Nazario Pescador y a la Dra. Yazmín E. Felipe quienes me ayudaron a redactar, corregir y plasmar los resultados obtenidos en este trabajo, así como en la traducción del artículo del español a inglés.
- A mis revisores el MVZ EPO. Bulmaro Valdez y al M en C. Gerardo Jaramillo quienes me hicieron las correcciones necesarias para concluir este trabajo.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
1. Introducción.....	1
2. Revisión de literatura.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Aspiración folicular y maduración de ovocitos.....	4
2.3 Eficiencia reproductiva y producción de embriones.....	6
2.4 Producción de embriones y estrés calórico.....	7
3. Justificación.....	8
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivos.....	11
5.1 Objetivo general.....	11
5.2 Objetivos específicos.....	11
6. Material y método.....	12
6.1 Animales.....	12
6.2 Preparación de la donadora, aspiración folicular y recolección de ovocitos.....	12
6.3 Evaluación de los ovocitos	13
6.4 Fertilización y cultivo <i>in vitro</i>	13
6.5 Preparación de receptoras, transferencia de embriones y diagnóstico de gestación.....	13
6.7Análisis estadístico.....	14
7. Límite de espacio.....	15
8. Límite de tiempo.....	16
9. Resultados y discusión	17
10. Conclusiones.....	19
11. Literatura citada.....	20

Anexo artículo: No difference in maturation capacity, *in vitro* fertilization and pregnant rate of oocytes obtained by ultrasound-guided ovum pick-up from pregnant dairy cows and heifers..... 26

1. INTRODUCCIÓN

El potencial reproductivo de una vaca está limitado, en el mejor de los casos, a una gestación por año. Si consideramos que la vida productiva promedio de las vacas lecheras es de 2.7 lactaciones (Orrego *et al.*, 2003), en condiciones intensivas, una vaca de gran calidad dejaría solo 2 descendientes, de los cuales se asume que la mitad son machos (generalmente enviados a engordas y sacrificados).

La aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido, la maduración y la fertilización *in vitro*, son técnicas que pueden acelerar el progreso genético aumentando la cantidad de crías producidas a partir de las hembras élite (Meuwissen., 1991; Kruij *et al.*, 1994; Hansen., 2014).

En este sistema, los ovocitos de las donantes se obtienen a una edad temprana, usando la recolección de óvulos, siendo estos fertilizados en el laboratorio, a menudo con semen sexado y cultivados para producir embriones genéticamente superiores, que son transferidos a las hembras receptoras.

En fechas recientes se han desarrollado técnicas de obtención de ovocitos inmaduros, a partir de ovarios de matadero y mediante la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido (OPU; ovum pick up, por sus siglas en inglés), actualmente este es el método de elección para recuperar ovocitos inmaduros de vacas donantes de gran valor genético para la producción de embriones *in vitro* (Cavalieri *et al.*, 2017).

Los mayores obstáculos en la aplicación comercial generalizada de los sistemas de Producción *in vitro* y Transferencia de Embriones (IVP-ET por sus siglas en inglés), han sido la baja eficiencia en su producción a nivel de laboratorio (Chaubal *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2010), alto costo en la producción de embriones transferibles

(Hansen y Block, 2004; Wilson *et al.*, 2006), y menor capacidad de supervivencia de embriones y terneros derivados del sistema IVP-ET (Bonilla *et al.*, 2014).

La cantidad y calidad de los ovocitos aspirados son esenciales para el éxito de la producción *in vitro*, así como el uso adecuado de medios de cultivo, tiempo y condiciones ambientales que simulen el escenario real de la producción natural de embriones en la madre (Cavalieri *et al.*, 2017).

Con el avance en biotecnologías reproductivas, se espera que la aspiración folicular y transferencia de embriones tomen un mayor auge en la próxima década debido a las mejoras en la fertilidad (Chowdhury *et al.*, 2017).

En esta propuesta, se compararon los resultados de la aspiración folicular, maduración del ovocito, desarrollo embrionario y gestación después de la transferencia de embriones de ovocitos obtenidos de vacas y vaquillas gestantes mediante el uso de la OPU.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

La industria lechera en el siglo XX fue revolucionada por la tecnología reproductiva, que pretende obtener una mayor descendencia de las vacas de élite. Moore y Hasler (2017), hacen un excelente recuento de 100 años de desarrollo de tecnologías reproductivas en **la ganadería lechera**. **Brevemente**, la primera biotecnología reproductiva en la gran lista de desarrollos fue la inseminación artificial que se aplicó con éxito al ganado a principios de 1900s. Los siguientes grandes logros involucraron la adición de antibióticos al semen y los diluyentes o extensores del mismo, y la crioconservación del esperma con glicerol. La década de 1950 y los años 60 fueron particularmente productivos con el desarrollo de protocolos para la superovulación de ganado tanto con gonadotropina sérica de yegua preñada como con FSH y la primera transferencia de embriones bovinos, el descubrimiento de la capacitación espermática, y la fertilización *in vitro*.

Así mismo Moore y Hasler (2017), incluyen los éxitos de los años 70, iniciando con el cultivo *in vitro* de embriones, terneros nacidos después del sexado cromosómico de embriones, la división del embrión que resulta en el nacimiento de gemelos y el análisis de semen asistido por computadora. La década de 1980, trajo la separación de espermatozoides portadores de cromosomas X y Y, por citometría de flujo, clones producidos por transferencia nuclear de células embrionarias y recolección de óvulos a través de aspiración folicular guiada por ultrasonido. El siglo 20 terminó con el nacimiento de terneros producidos a partir de IA con semen sexado de clones bovinos producidos por transferencia nuclear de células somáticas adultas, y el nacimiento de terneros clonados transgénicos. Moore y Hasler (2017), terminan su revisión con el siglo XXI con dos de las biotecnologías más poderosas, el análisis genómico mediante el uso del polimorfismo de un nucleótido y la edición del genoma, lo que está revolucionando la industria ganadera.

2.2 Aspiración folicular y maduración de ovocitos

A la técnica OPU, se le considera una alternativa más eficiente a la ovulación múltiple bovina en los programas de transferencia de embriones, ya que se aplica independientemente del estado reproductivo de la donante (Boni., 2012), puesto que se ha demostrado que no hay daño en el desarrollo del feto en vacas y vaquillas en primer tercio de gestación (Takuma *et al.*, 2010).

Desde la introducción de la tecnología OPU-IVP, se han realizado esfuerzos generalizados para mejorar la eficiencia de la producción de embriones. De hecho, muchas de las condiciones ambientales para gametos y embriones en sistemas de IVP, por ejemplo, composición de medios, pH, calidad del agua y del aire, temperatura y composición atmosférica, han sido relativamente estandarizadas.

Si bien las sesiones de OPU se realizan en condiciones de campo, los ovocitos recolectados deben ser transportados a laboratorios especializados para generar embriones en un ambiente controlado. Habitualmente, los ovocitos inmaduros se transportan en medios de maduración en incubadoras portátiles, manteniendo la temperatura y la atmósfera bajo control (Alm *et al.*, 2008). Sin embargo, esto da como resultado que los ovocitos que llegan al laboratorio, en etapas de maduración muy diferentes afectando significativamente la programación del procedimiento de IVP subsiguiente.

En folículos pequeños, las células de la granulosa y *cumulus* activan la producción *in vivo* de factores inhibidores de la maduración, como el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), que se transfieren a través de uniones gap, manteniendo los ovocitos en la profase de la meiosis I (Tanghe *et al.*, 2002). Cuando los ovocitos de mamífero se extraen del folículo, se pierde la conexión con estas células foliculares y el contacto con el líquido folicular que contiene los inhibidores. Normalmente, la progresión meiótica se inicia inmediatamente después de la recolección de ovocitos

(Bilodeau-Goeseels., 2011). Sin embargo, los resultados finales de IVP dependen del tiempo estricto entre la maduración del ovocito y la fertilización (Blondin., 2017). Debido a la gran cantidad de tiempo entre la primera y la última colección de ovocitos de una sesión de OPU, la maduración de los ovocitos está finalizando en tiempos diferentes, puesto que el trabajo de laboratorio posterior, como la fertilización, tiene que tener lugar en momentos específicos, esta asincronía en la maduración puede producir malos resultados.

Por lo tanto, la producción de embriones *in vitro* de bovinos requiere mantener ovocitos inmaduros después de la técnica OPU en tubos de transporte, que contienen un medio comercialmente disponible y capaz de mantener a los ovocitos en arresto meiótico, mientras se mantienen las competencias de desarrollo.

En el ganado vacuno, los medios que contienen inhibidores meióticos se han evaluado para mantener los ovocitos inmaduros, para mejorar su capacidad de desarrollo (Lonergan *et al.*, 2000), sin embargo, no se recomiendan debido a su limitada disponibilidad y toxicidad potencial, lo que permite que solo personal especializado trabaje con estos compuestos. Alm *et al.*, en 2008 demostraron que los ovocitos bovinos inmaduros se mantuvieron durante 16 a 18 horas a temperatura ambiente (RT, room temperature, por sus siglas en inglés), en ausencia de inhibidores meióticos, convirtiéndose en blastocistos, pero la cinética de los ovocitos se modificó a medida que maduraron.

Por otra parte, el estrés oxidativo debido a los niveles supra fisiológicos de oxígeno, puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que pueden comprometer el cultivo de ovocitos y embriones, los sistemas IVP se han centrado en una reducción del nivel de oxígeno. Sin embargo, las ROS también se pueden liberar durante el metabolismo oxidativo normal en la célula, debido a un desequilibrio del potencial redox intracelular (Balaba *et al.*, 2005).

Los niveles altos de ROS, pueden afectar a los componentes celulares por la peroxidación de lípidos, la modificación de proteínas y el daño al ADN que alteran la función celular y posteriormente pueden afectar la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario adicional. Sin embargo, se considera que un cierto nivel de ROS es fisiológicamente importante en procesos como la fecundación (De Lamirande *et al.*, 1997), y en el inicio de la transcripción génica cigótica (Goto *et al.*, 1993).

2.3 Eficiencia reproductiva y producción de embriones

Los embriones se pueden producir usando 2 técnicas diferentes, ya sea por superovulación y producción *in vivo* o utilizando la técnica OPU y la IVP. Ambas técnicas y sus múltiples protocolos, han sido descritos por muchos autores desde la disponibilidad comercial de la superovulación y la transferencia de embriones en la década de 1970 (Farin *et al.*, 2007; Machaty *et al.*, 2012; Hasler, 2014). Sin embargo, la comparación del número de embriones producidos por las diferentes técnicas en las mismas donantes, son limitadas.

Por otra parte, los embriones pueden ser producidos por ovocitos provenientes de bovinos que van desde los 7 meses de edad, usando cualquiera de las dos técnicas arriba descritas.

2.4 Producción de embriones y estrés calórico

Igualmente es conocido el efecto del medio ambiente sobre la reproducción, estudios con producción de embriones *in vitro* en donadoras bajo estrés calórico, han demostrado que se obtienen menos embriones viables, así como una mayor proporción de embriones con retraso en el desarrollo (Paula- Lopes *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2008). Colectivamente, parece que la producción y calidad de los embriones, así como la producción láctea, se ve afectada por la categoría de la donadora y el estrés calórico.

3. JUSTIFICACIÓN

La transferencia de embriones ha tomado auge en las últimas décadas, debido a que se puede obtener más de una cría al año por hembra élite. Las nuevas biotecnologías reproductivas aplicadas en la industria lechera como la aspiración folicular (OPU) y la producción de embriones *in vitro* (IVP-ET), han permitido obtener un mayor número de embriones, gracias a que los ovocitos aspirados son de mejor calidad debido al mínimo manejo dado al ganado el cual produce menos estrés y puede usarse en vaquillas y vacas en cualquier etapa del ciclo estral, durante el primer tercio de gestación y vacas secas, por lo que no se requiere ningún tratamiento hormonal. No obstante, son pocos los estudios realizados que comparen los resultados de estas técnicas entre vacas y vaquillas, especialmente durante los meses más calurosos del año.

Estudios revelan que existe disminución en la eficiencia reproductiva en vacas lecheras de alta producción (Royal *et al.*, 2000; Lucy, 2001; Washburn *et al.*, 2002). Por ejemplo, se han reportado tasas de concepción (CR, conception rate, por sus siglas en inglés), para vacas lecheras en lactación > 50% en los años 1940 y 1950 (Barrett y Casida, 1946; Casida, 1961; Mares *et al.*, 1961), ~ 50% en la década de 1970 (Macmillan y Watson, 1975; Spalding *et al.*, 1975; Washburn *et al.*, 2002), y 40% o menos en la década de 1990 (Schmitt *et al.*, 1996; Pursley *et al.*, 1997a; Butler, 1998).

Si bien, la relación entre la producción de leche y la fertilidad todavía produce controversia, la producción de leche por vaca aumentó sustancialmente desde la década de 1950 a la década de 1990 (2600 a ~ 8000 kg / lactancia [USDA, 1978; USDA, 2001]), sugiriendo una posible asociación entre la producción de leche y CR (Silvia, 1998). De particular importancia es que, la CR en las vaquillas se han mantenido en alrededor del 70% durante este tiempo (Foote, 1975, Spalding *et al.*,

1975; Pursley *et al.*, 1997b), y evaluaciones dentro del hato, constantemente muestran una menor CR en vacas lactantes que en vaquillas (Pursley *et al.*, 1997b).

Varios estudios han demostrado que la ET puede aplicarse en hatos lecheros para mejorar la fertilidad en comparación con la inseminación artificial (IA), particularmente, durante los meses calurosos del año (Rodrigues *et al.*, 2007; Drost *et al.*, 1999). Además, la transferencia de embriones rinde resultados satisfactorios, obteniéndose gestaciones especialmente en las hembras clasificadas como repetidoras (Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2007), es decir, hembras con cuatro o más IA. Por lo tanto, el resultado de las gestaciones después de la ET de acuerdo a la estación del año y / o la calidad de la receptora, ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, pocas investigaciones (Chebel *et al.*, 2008; Hasler *et al.*, 1987; Hasler., 2001), se han centrado en el efecto de la categoría de las donantes de embriones (vaca o vaquilla), como un factor potencial que afecta a las receptoras, especialmente cuando se trabaja estrictamente con hembras Holstein.

Es por lo anterior, que este estudio contempla además del efecto vaca/ vaquilla, la evaluación de los resultados de la técnica OPU, en época de calor de acuerdo con la región del estudio.

4. HIPÓTESIS

Los embriones transferidos, obtenidos de ovocitos de vaquillas, tienen mejor calidad que los obtenidos de vacas, obteniéndose mejores tasas de concepción cuando se utilizan embriones de vaquillas que de vacas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar los resultados de la aspiración folicular, maduración del ovocito, fertilización, desarrollo embrionario y gestación después de la transferencia de embriones de ovocitos obtenidos de vacas y vaquillas gestantes mediante el uso de la OPU.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar y comparar los resultados del número de ovocitos obtenidos mediante la técnica OPU, entre vaquillas y vacas, durante la época de calor de acuerdo con la región del estudio.
- ✓ Comparar las diferencias entre vaquillas y vacas por el número de embriones producidos.
- ✓ Evaluar la maduración, la fertilización y el desarrollo de ovocitos y embriones obtenidos de vacas en lactación y vaquillas nulíparas.
- ✓ Evaluar la eficiencia de la gestación con los embriones transferidos, que se obtuvieron de vaquillas y vacas.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Animales

Para el experimento se eligieron vacas y vaquillas donadoras del Establo la Luna, ubicado en el Km 10 Carretera La Popular-La Esmeralda. Gómez Palacio, Durango, Méx. Fueron seleccionadas 112 vacas Holstein preñadas, agrupándose por lactación y número de partos (2, 3 y 4), días de preñez (60-120 días) y LV/DU (leche vida/días útiles), con un promedio mayor a 32 litros de leche; y 39 vaquillas Holstein preñadas, siendo hijas de las vacas anteriores, encontrándose en una preñez entre 82 y 120 días, de acuerdo al protocolo establecido en In Vitro Brasil México (IVB México, 2018).

Los criterios de selección para las vacas y vaquillas receptoras fueron la presentación de celo 8 días antes de la transferencia dejándolo pasar, se tomó en cuenta la condición corporal, número de lactancias, producción lechera, número de servicios, días en leche en las vacas (DEL) y la presencia de cuerpo lúteo, según los protocolos establecidos por IVB México.

6.2 Preparación de la donadora, aspiración folicular y recolección de ovocitos.

La aspiración folicular y recolección de ovocitos se realizó a través de la técnica OPU de acuerdo al protocolo establecido por Cavalieriet *al.*, en 2017, se aplicó anestesia epidural (clorhidrato de lidocaína al 2%; .2 mg/kg) a la donadora, teniendo como propósito insensibilizar el aparato reproductor y disminuir los movimientos peristálticos, facilitando la localización y manipulación de los ovarios.

Se procedió con la técnica de aspiración folicular usando un escáner de ultrasonido en modo B en tiempo real Mindray 2200; (MindrayBio-Medical Electronics, Shenzhen, China) equipado con un transductor micro convexo de 5 MHz modelo

Mindray 65C15EAV, (MindrayBio-Medical Electronics, Shenzhen, China), el cual fue insertado vía transvaginal y acoplado a una guía de aspiración folicular con una aguja de calibre 18 G desechable y una guía de acero inoxidable conectada a un tubo cónico plástico de 50 ml (Corning, Acton, MA, EE. UU), el cual contiene solución PBS y heparina, usando una bomba de vacío modelo WTA BV-003, Watanabe (Tecnología Aplicada, São Paulo, Brasil), con presión negativa ajustada entre 80 y 120 mmHg .

Después de la OPU de ambos ovarios, el sistema de aspiración se lavó con medio PBS para recuperar el máximo número de ovocitos, que fueron llevados al laboratorio (IVBMex).

6.3 Evaluación de los ovocitos

Los ovocitos se clasificaron de acuerdo con su morfología (número de capas de las células del cúmulo y aspecto del citoplasma), en GI, GII, GIII, citoplasma irregular y desnudos, se llevaron al laboratorio para el proceso de maduración y fertilización *in vitro*.

6.4 Fertilización y cultivo *in vitro*

Los procedimientos de fertilización y cultivo *in vitro* se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el laboratorio de reproducción IVB México.

6.5 Preparación de receptoras, transferencia de embriones y diagnóstico de gestación

Se transfirieron 113 embriones a 99 vacas y 14 vaquillas receptoras, con los criterios anteriormente descritos, se aplicó anestesia epidural (clorhidrato de lidocaína al 2%; .2 mg/kg) y se procedió con la transferencia, solo a aquellas receptoras que presentaban cuerpo lúteo; a los 45 días post transferencia se realizó

el diagnóstico de gestación con un ecógrafo (modelo SUIU CTS-800, China), con una sonda rectal lineal estándar L65/5.0 MI-1.

6.7 Análisis estadístico

La cantidad total de ovocitos recuperados por OPU, se editó empleando el criterio de restricción de resultados biológicamente anormales. Por lo tanto, los datos de clivaje y la tasa de desarrollo de blastocistos que fueron inferiores al 10% se excluyeron del análisis final. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el análisis de varianza de una vía de la aplicación, Sigma Plot (SigmaPlot V12.5 for Windows, Systat Software, Inc.). Las variables evaluadas fueron el número ovocitos recuperados, tasa de clivaje (número de cigotos escindidos entre el número total de ovocitos recuperados), tasa de blastocisto (número de blastocistos producidos entre el número total de ovocitos recuperados), tasa de preñez (número de gestaciones entre el número total de blastocistos transferidos). Los datos continuos fueron analizados para su normalidad mediante la prueba de *Shapiro-Wilk* (SigmaPlot V12.5 para Windows) y transformados cuando fue necesario. Las diferencias estadísticas fueron consideradas significativas cuando el nivel de significancia, P presentó un valor menor de 0.05.

7. LÍMITE DE ESPACIO.

El proyecto se llevó a cabo en la región de México denominada la Laguna; ubicada a $25^{\circ} 39'49.3''$ N; $103^{\circ} 28'43.1''$ O; con altitud de 1139 m; con un tipo de clima desértico semicálido y seco, con temperaturas extremas, las precipitaciones se producen en verano con una precipitación anual de 250 mm, y una humedad relativa media anual del 50% (SMN, 2018).

8. LÍMITE DE TIEMPO

El estudio se realizó durante la primavera de 2017 (del 02-05-2017 al 07-07-2017), Lo animales se encontraban gestantes, con una preñez entre 60 y 120 días, las vacas con un promedio mayor a 32 litros días leche vida/días útiles.

9. Resultados y discusión

El número de ovocitos recuperados y usados para la maduración in vitro mediante el procedimiento establecido en el laboratorio, fue mayor en el grupo de vacas de segunda lactancia, encontrándose diferencia significativa solo entre este grupo y las vacas de tercera lactancia (550 vs 338; $P < 0.002$; Cuadro 1). En la literatura se informa que el número de ovocitos recuperados mediante la técnica OPU puede variar entre razas, edad y frecuencia de las sesiones, sin embargo, no todos han reportado diferencia estadísticamente significativa en esta variable (Barceló *et al.* 2015), tal como ocurrió en el presente estudio. Incluso es sabido (IVB México, datos no publicados), que en las razas de bovinos productores de carne, el número de ovocitos recuperados mediante OPU es superior que en razas lecheras. Si bien la tasa de clivaje fue mayor para el grupo de las vaquillas (63.5%), no se estableció ninguna diferencia entre los grupos ($P > 0.45$). Así mismo, la tasa de embriones transferibles fue similar entre los grupos del estudio ($P > 0.19$). La tasa de preñez de los embriones transferidos (número de gestaciones a los 45 días entre el número de embriones transferidos), no mostró diferencia entre grupos, a pesar de que se observó un diferencial del 10% menor para uno de los grupos de vacas. Sin embargo, debido al bajo número de donadoras usadas por grupo, el resultado de embriones transferibles y tasa de preñez, podría ser debido al efecto toro sobre el sistema de IVF (Barceló *et al.* 2011).

Cuadro 1. Comparación del desarrollo de ovocitos *in vitro*, porcentaje de embriones obtenidos y tasa de preñez, entre vaquillas y vacas.

Grupo	Donadoras por OPU (n)	IVM (n)	% Clivaje	% Blastocitos	%P/ET
Vaquilla	39	444 ^{ab}	63.5%	13.3%	42.9%
Vaca 2 th	34	550 ^a	38.0%	10.0%	-----
Vaca 3 th	39	338 ^b	58.5%	16.0%	29.5%
Vaca 4 th	39	515 ^{ab}	48.0%	12.0%	42.1%

Literales distintos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$); 2th, 3th and 4th = lactancia. OPU = técnica de aspiración folicular transvaginal, guiada por ultrasonido; IVM = número de ovocitos obtenidos por maduración *in vitro*; %P/ET = Porcentaje de Preñez obtenido por transferencia de embriones.

En el análisis del desarrollo de los ovocitos madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* solo mostró diferencia significativa entre el grupo de vacas de segunda lactancia contra los otros grupos de animales (53.4%; $p < 0,002$). Sin embargo, este hecho no influyó en la tasa de preñez de los embriones transferidos de esa categoría.

Cuadro 2. Comparación de la calidad de los embriones producidos al día 8, entre vaquillas y vacas.

Grupo	Total embriones (n)	%MO	%BE	%BL	%BX
Vaquilla	59	---	10	78.0	12.0 ^b
Vaca 2 th	54	4.7	---	42.5	53.4 ^a
Vaca 3 th	54	2.0	27.7	59.2	11.1 ^b
Vaca 4 th	62	8.1	16.1	67.7	8.1 ^b

Literales distintos muestran diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$); 2th, 3th y 4th = lactancia. MO = Mórula; BE= Blastocito temprano; BL = Blastocito tardío; BX = Blastocito expandido.

10. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que el número de ovocitos recuperados mediante la técnica OPU, la tasa de clivaje, la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario, en ganado lechero gestante, son similares entre vaquillas y vacas. Por otra parte, en el grupo de vacas de segunda lactancia, se obtuvo una mayor tasa de embriones de máxima calidad (BX, blastocisto expandido), sin embargo, este hecho no influyó sobre la tasa de preñez.

11. Literatura citada.

- Alm H., Choi Y., Love L., Heleil B., Torner H., Hinrichs K. (2008) Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: kinetics of in vitro maturation and effect on blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*; 70, 1024–1029.
- Balaba R. S., Nemoto S., Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*; 120:483–95.
- Barceló, F. M., Campos, C. L. F., Seidel, G. E. Jr. (2011). In vitro fertilization using nonsexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim*; 46: 495-502.
- Barceló, F. M., Campos, C.L.F., Mtango N.R., Altermatt, J., Bonilla, L., Koppang, R., Verstegen, J.P. (2015). Improving in vitro maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO₂ gas phase. *Theriogenology*; 84: 109-117
- Barrett, G. R., and L. E. Casida. 1946. Time of insemination and conception rates in artificial breeding. *J. Dairy Sci.* 29:556.
- Bilodeau-Goeseels S. (2011) Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*; 78, 734–743.
- Block, J., L. Bonilla, and P. J. Hansen. (2010). Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J. Dairy Sci*; 93:5234–5242
- Blondin P. (2017) Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod Fert Dev*; 29, 32–36.
- Boni R. (2012) Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. *Anim Reprod*; 9, 362–369.
- Bonilla, L., J. Block, A. C. Denicol, and P. J. Hansen. (2014). Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *J. Dairy Sci*; 97:229–239.

- Butler, W. R. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2533–2539.
- Casida, L. E. (1961). Present status of the repeat-breeder cow problem. *J. Dairy Sci.* 44:2323–2329.
- Cavalieri F. L. B., Morotti F., Seneda M. M., Colombo A. H. B., Andreatzi M. A., Emanuelli I. P., Rigolon L.P. (2017). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*.
- Chaubal, S., J. Molina, C. Ohlrichs, L. Ferre, D. Faber, P. Bols, J. Riesen, X. Tian, and X. Yang. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*; 65:1631–1648.
- Chávez R. J. (2017) Evaluación retrospectiva (2014-2016) de los parámetros reproductivos en cuatro unidades de producción de leche de la comarca lagunera. Tesis para obtener el título de médico veterinario zootecnista.
- Chebel R. C., Demétrio D. G. B., Metzger J. (2008) Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*; 69:98–106.
- Chowdhury M. M. R., Choi B-H., Khan I., Lee K-L., Mesalam A., Song S-H., Xu L., Joo M-D., Afrin F., Kong I-K. (2017). Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. *Theriogenology*
- De Lamirande E., Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*; 2:48–54.
- Drost M., Ambrose J. D., Thatcher M. J., Cantrell C. K., Wolfsdorf K. E., Hasler J. F., (1999). Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*; 52:1161–7.
- Farin, P. W., K. Moore, and M. Drost. (2007). Assisted reproductive technologies in cattle. *Large Animal Theriogenology*. Saunders Elsevier, St Louis, MO; 496-508.
- Foote, R. H. 1975. Estrus detection and estrus detection aids. *J. Dairy Sci.* 58:248–256.

- Goto Y., Noda Y., Mori T., Nakano M. (1993) Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*; 15:69–75.
- Hansen P. J., Aréchiga C. F. (1999). Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J Anim Sci*; 77:36–50.
- Hansen, P. J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. Pages 1–22 in *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production*. Vol. 752. G. C. Lamb and N. DiLorenzo, ed. 1st ed. Springer, New York, NY.
- Hansen, P. J., and J. Block. (2004). Towards an embryocentric world: The current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reprod. Fertil. Dev*; 16:1–14.
- Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81:152–169.
- Hasler, J. F. (2001). Factors affecting frozen and fresh frozen embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401–1415.
- Hasler, J. F., A. D. McCauley, W. F. Lathrop, and R. H. Foote. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27:139–168.
- IVB. (2018). Etapas del proceso de FIV. 12-01-2018. Disponible en <http://www.invitrobrasil.com/es/productos/fiv-ganado-leche>.
- Kruip, Th. A. M., R. Boni, Y. A. Wurth, M. W. M. Roelofsen, and M. C. Pieterse. (1994). Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675–684.
- Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Yang X., Boland M. (2000) Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev*; 57, 204–209.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84:1277–1293.

- Machaty, Z., J. Peippo, and A. Peter. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology* 78:937–950.
- Macmillan, K. L., and J. D. Watson. (1975). Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. *Anim. Prod.* 21:243–249.
- Mares, S. E., A. C. Menge, W. J. Tyler, and L. E. Casida. (1961). Genetic factors affecting conception rate and early pregnancy loss in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 44:96–103.
- Meuwissen, T. (1991). Expectation and variance of genetic gain in open and closed nucleus and progeny testing schemes. *Anim. Prod.* 53:133–141
- Moore S. G., Hasler J. F. (2017). *A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science.* *J. Dairy Sci.* 100:10314–10331
- Paula-Lopes F. F., Hansen P. J. (2002) Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod*; 66:1169–77.
- Pursley, J. R., M. C. Wiltbank, J. S. Stevenson, J. S. Ottobre, H. A. Garverick, and L. L. Anderson. (1997b). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80:295–300.
- Pursley, J. R., M. R. Kosorok, and M. C. Wiltbank. (1997a). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80:301–306.
- Rodrigues C. A., Ayres H., Ferreira R. M., Teixeira A. A., Mancilha R. F., Oliveira M. E. F. (2007) Conception rate after artificial insemination and embryo transfer in high producing Holstein cows. *Acta Sci Vet*; 35:1254.
- Rodrigues C. A., Ayres H., Reis E. L., Nichi M., Bo G. A., Baruselli P. S. (2004) Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein (repeat breeder) breedings. *Acta Sci Vet*; 32:219.
- Royal, M. D., A. O. Darwash, A. P. F. Flint, R. Webb, J. A. Woolliams, and G. E. Lamming. (2000). Declining fertility in dairy cattle: Changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim. Sci.* 70:487–501.

- Schmitt, E. J., T. Diaz, M. Drost, and W. W. Thatcher. (1996). Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.* 74:1084–1091.
- Silvia, W. J. (1998). Changes in reproductive performance of Holstein dairy cows in Kentucky from 1972 to 1996. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl.1):244.
- Spalding, R. W., R. W. Everett, and R. H. Foote. (1975). Fertility in New York artificially inseminated Holstein herds in Dairy Herd Improvement. *J. Dairy Sci.* 58:718–723.
- Takuma, T., Sakai, S., Ezo, D., Ichimaru, H., Jinnouchi, T., Kaedi, Y., Nagai, T., Otoi, T. (2010). Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *J. Reprod. Dev.* 56: 55-59.
- Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. (2002). Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*; 319 61, 414–424.
- Torres-Júnior J. R., Pires M., de Sá W. F., Ferreira A., Viana J. H. M., Camargo L. S. A. (2008) Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 69:155–66.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2001). Milk production, disposition and income-suppl. (PMB-BB). <http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/dairy/pmppbbm/>. Accessed Oct. 28, 2001.
- United States Department of Agriculture (USDA); Economics, Statistics and Cooperatives Service. (1978). Dairy Situation (DS-369). United States Government Printing Office, Washington, DC.
- Washburn, S. P., W. J. Silvia, C. H. Brown, B. T. McDaniel, and A. J. McAllister. (2002). Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.* 85:244–251.

- Washburn, S. P., W. J. Silvia, C. H. Brown, B. T. McDaniel, and A. J. McAllister. (2002). Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.* 85:244–251.
- Wilson, R. D., P. M. Fricke, M. L. Leibfried-Rutledge, J. J. Rutledge, C. M. Penfield, and K. A. Weigel. (2006). In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology*; 65:1007–1015.
- Orrego A. J., Delgado C. A. and Echevarría C. L. (2003). Vida productiva y principales causas de descarte de vacas holstein en la cuenca de lima. *Rev Inv Vet Perú* 2003; 14 (1): 68-73.

ANEXO: ARTÍCULO

ANEXO ARTÍCULO

No difference in maturation capacity, *in vitro* fertilization and pregnant rate of oocytes obtained by ultrasound-guided ovum pick-up from pregnant dairy cows and heifers

Gloria Patricia Zavala-González¹, Yazmín Elizabeth Felipe-Pérez¹, Luiz Gustavo Pessoa-Rocha², Adrián Nava-Mondragón³, Antonio Nogueira², Rafael Cano-Torres¹, Nazario Pescador¹

¹ Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del estado de México. Carretera Toluca-Tlachaloya s/n, El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México, Méx.

² In Vitro Brasil México, S.A de C.V. Boulevard Independencia, 746 Ote., interior 6, Colonia Nueva los Ángeles, Torreón, Coahuila, Méx.

³ Establo la Luna, Grupo Tricio Haro, Carretera La Popular-La Esmeralda Km 10. Gómez Palacio, Durango, Méx.

Corresponding author: N. Pescador; Calle Melchor Ocampo No 25 interior 1, barrio Espíritu Santo, Metpec, México, CP 52140. Cell phone: +5217223946975. Email: npescadors@uaemex.mx

Article type: Applied Research

Running title: Oocytes and embryos from dairy cows and heifers

Abstract

Several lines of evidence assign to the ovarian follicular microenvironment the disparity between the fertility of dairy cows and heifers. This work evaluated the difference in maturation and subsequent embryonic development and pregnancy rate of oocytes from pregnant cows and heifers, during the spring season in a hot-desert weather location in Mexico. The oocytes were obtained from 112 ovum pickup technique (OPU) sessions, from Holstein pregnant cows, which were transported and matured for 24 hours using a shipping and maturation commercial medium (SMM), fertilized and incubated *in vitro* (IVP-ET) evaluating number of oocytes obtained and embryoproduction. In the same way, oocytes obtained from 39 OPU sessions, from Holstein pregnant heifers, were exposed to the same protocol as the cows, and compared embryoproduction. Sexed frozen semen was used for both experiments. The 113 embryos obtained from cows and heifers were transferred, until reaching gestation diagnostic at day 45. Results showed significant differences in the number of oocytes obtained between cows of second and third lactation; however, no difference was shown among the number of embryos produced. While, for development of matured, fertilized and cultured oocytes, there was only significant difference in cows of second lactation, however, there was not an influence on the pregnancy rates. Although, the cleavage rate was higher for the group of heifers (63.5%), no difference was observed between groups. Also the pregnancy rate of transferred embryos, showed no difference between groups. We conclude that the number of recovered oocytes, the rate of cleavage, oocyte maturation and embryonic development through the

OPU technique in pregnant dairy cattle are similar to what is obtained from pregnant heifers.

Key words:OPU,IVP-ET, cows, heifers.

Introduction

Reproductive biotechnologies such as the transfer of embryos produced in vitro (IVP-ET) and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (OPU) can accelerate genetic progress by increasing the number of offspring produced from elite females (Meuwissen, 1991; Kruip et al., 1994; Hansen, 2014), the latter being the method of choice for the recovery of immature oocytes by repeating donors without reducing fertility (Cavalieri et al., 2017), but the results of these techniques are altered by physiological characteristics of the animal, as well as by the quantity and quality of the recovered oocytes (Watanabe et al., 2017).

In this system, donor oocytes are obtained at an early age, being fertilized in the laboratory, often with sexed semen and cultured to produce genetically superior embryos (Cavalieri et al., 2017), it is considered a more efficient alternative to multiple bovine ovulation in embryo transfer programs, since it applies regardless of the reproductive status of the donor since it has been shown that there is no damage in the development of the fetus in cows and heifers in the first third of gestation (Boni, 2012; Takuma et al., 2010).

However, the number of follicles varies depending on the season of heat or cold. It has been shown that the rate of IVP-ET decreases when the oocytes recover from cows previously

exposed to heat, although it can also be related to the reproductive phase this is only observed in empty cows (Takuma et al., 2010).

The quantity and quality of the aspirated oocytes are essential for the success of in vitro production, as well as the adequate use of culture media, time and environmental conditions that simulate the real scenario of the natural production of embryos of the mother (Cavalieri et al. al, 2017). Some papers have reported that cow ovaries provide a lower number of oocytes than heifer ovaries. Studies on the effect of age on the performance of IVP -ET after MIV, IVF and IVC by Mermillod et al. (1992) showed a greater yield in the donors between 1 and 3 years than the older animals. However, there are occasional reports of higher quality oocytes from cows (Rizos et al., 2005).

In this proposal, the results of follicular aspiration, oocyte maturation, embryonic development and gestation were compared after the transfer of oocyte embryos obtained from cows and pregnant heifers through the use of the OPU technique during the spring season in a desert and warm locality of Mexico.

Materials and Methods

Materials

All materials used in these experiments sourced from In vitro Brasil Mexico; unless otherwise specified.

Methods

Study site

The project was carried out during the spring and early summer season (from 02-05-2017 to 07-07-2017), in a region of Mexico (25 ° 39 '49.3'' N; 103 ° 28' 43.1 " W; altitude 1139 m) with a semi-warm dry desert climate type, with extreme temperatures, rainfall occurs in summer with an annual rainfall of 250 mm, with an annual average relative humidity of 50 % (SMN, 2018).

Animals

For the experiment, 112 pregnant Holstein cows were selected and grouped by lactation (2, 3 and 4), number of births, days of pregnancy (60-120 days) and ML / UD (milk life / useful days), with an average greater than 32 liters of milk; and 39 pregnant Holstein heifers being daughters of the previous cows with a pregnancy between 82 and 120 days, according to the protocol established by In Vitro Brasil México.

The selection criteria for the recipients cows (99n) and heifers (14n) were the heat observation 8 days before the transfer (allowing it to pass), body condition, number of lactations, milk production, number of artificial inseminations, days in milk (DIM) and the presence of the corpus luteum.

Preparation of the donor, follicular aspiration and oocytes collection

Follicular aspiration and oocyte collection was performed through the OPU technique, which was carried out in farm. The OPU was performed by veterinarians trained in assisted reproductive technologies according to the protocol established by Cavalieri et al., In 2017, epidural anesthesia (2% lidocaine hydrochloride; 0.2 mg / kg) was applied to the donor cow, with the purpose of desensitizing the reproductive system and reducing the peristaltic movements facilitating the location and manipulation of the ovaries.

We proceeded with the follicular aspiration technique using a real-time B-mode ultrasound scanner Mindray 2200; (Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China) equipped with a 5 MHz micro convex transducer which will be inserted via transvaginal model Mindray 65C15EAV, (Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, China) and coupled to a follicle aspiration guide with a disposable 18G needle and a stainless steel guide connected to a 50ml plastic conical tube Corning, Acton, MA, USA UU which contains PBS solution and heparin, using a vacuum pump model WTA BV-003, Watanabe (Applied Technology, São Paulo, Brazil) with negative pressure adjusted between 60 and 80 mmHg. After the OPU of both ovaries, the aspiration system was washed with PBS medium to recover the maximum of oocytes.

Oocyte evaluation

The oocytes were classified according to their morphology (number of cells of the clusters and aspect of the cytoplasm) GI, GII, GIII, irregular cytoplasm and naked, they were taken to the laboratory.

Fertilization and in vitro culture

The fertilization and in vitro culture procedures were carried out according to the IVB Mexico laboratory protocol.

Statistic analysis

The total number of oocytes retrieved by OPU was edited using the criterion of restricting biologically abnormal results. Therefore, the data of clivage and development of blastocysts rate minors than 10% were excluded from the final analysis. Statistical analyzes were performed using the one-way analysis of variance of the Sigma Plot application (SigmaPlot V12.5 for Windows, Systat Software, Inc.).

The variables evaluated were the number of recovered COCs, segmentation rate (number of zygotes divided by the total number of COCs recovered), blastocyst rate (number of blastocysts produced by the total number of recovered COCs), pregnancy rate (number of gestations by total number of transferred blastocysts). The binomial distribution was assumed for categorical response variables. The continuous data were tested for normality by the Shapiro-Wilk test (SigmaPlot V12.5 for Windows) and transformed when necessary. The statistical differences were considered significant with a value of $P < 0.05$.

Results

The number of COCs recovered and used for in vitro maturation by the procedure established in the laboratory was higher in the group of second lactation cows, finding significant difference only in this group and third lactation cows (550 vs 338; < 0.002 , Table 1). As for the rate of cleavage was higher for the group of heifers (63.5%), neverthelessno

difference was established between the groups ($P > 0.45$). Likewise, the rate of transferable embryos was similar among the study groups ($P > 0.19$).

The pregnancy rate of the transferred embryos (number of pregnancies at 45 days between number of embryos transferred) showed no difference between groups, in spite of a 10% lower differential was observed for one of the groups of cows.

The analysis of the development of matured, fertilized and in vitro cultured oocytes only shows a significant difference between the group of second lactation cows against the other groups of animals (53.4%, $p < 0.002$). However, this fact did not influence the pregnancy rate of the transferred embryos of that category.

Discussion

In the literature it is reported that the number of oocytes retrieved by the OPU technique can vary between races, age and frequency of sessions, however, not all have reported a statistically significant difference in this variable (Barceló et al., 2015), as it happened in our study. It is even known (IVB Mexico, unpublished data) that in the breeds of beef cattle the number of oocytes retrieved by OPU is higher than in dairy breeds.

However, due to the low number of donors used per group, the result of transferable embryos and pregnancy rate could be due to the bull effect on the IVF system (Barceló et al., 2011). However, this fact did not influence the pregnancy rate of the transferred embryos of that category.

We can conclude that the number of recovered oocytes, the rate of cleavage, oocyte maturation and embryonic development through the OPU technique in pregnant dairy cattle are similar to what is obtained from non pregnant heifers and correspond to what is reproduced in the literature about the results in synchronized and/or stimulated with FSH non pregnant cows. On the other hand, the group of cows of second lactation showed a higher rate of embryos of the highest quality, however this fact did not influence the pregnancy rate. The above could be attributed to the receiving effect or season of the year, because during the last days of the experiment the environmental temperature increased from 3 to 5 Celsius degrees (min 14 to 17 and max 30 to 35 Celsius degrees; SMN, 2018).

Aknowledgements

The authors thanks the Dairy Barn “*La Luna*”, and the Group “TricioHaro” for the animal facilities and In vitro Brasil Mexico for embryo production data and the provided materials.

References

Barceló, F. M., Campos, C. L. F., Seidel, G. E. Jr. (2011). In vitro fertilization using nonsexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *ReprodDomestAnim*; 46: 495-502.

Barceló, F. M., Campos, C.L.F., Mtango N.R., Altermatt, J., Bonilla, L., Koppang, R., Verstegen, J.P. (2015). Improving in vitro maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO₂ gas phase. *Theriogenology*; 84: 109-117.

Boni R. (2012) Ovum pick-up in cattle: a 25 year retrospective analysis. *AnimReprod*; 9, 362–369.

Cavalieri F. L. B., Morotti F., Seneda M. M., Colombo A. H. B., Andreatzi M. A., Emanuelli I. P., Rigolon L.P. (2017). Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*.

Chowdhury M. M. R., Choi B-H., Khan I., Lee K-L., Mesalam A., Song S-H., Xu L., Joo M-D., Afrin F., Kong I-K. (2017). Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. *Theriogenology*

Hansen, P. J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. Pages 1–22 in *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production*. Vol. 752. G. C. Lamb and N. DiLorenzo, ed. 1st ed. Springer, New York, NY.

Kruip, Th. A. M., R. Boni, Y. A. Wurth, M. W. M. Roelofsen, and M. C. Pieterse. (1994). Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675–684.

Mermillod P, Wils C, Massip, A., Dessy F. (1992). Collection of oocytes and production of blastocysts in vitro from individual, slaughtered cows. *J ReprodFertil*. 96:717–723.

Meuwissen, T. (1991). Expectation and variance of genetic gain in open and closed nucleus and progeny testing schemes. *Anim. Prod.* 53:133–141

Moore S. G., Hasler J. F. (2017). *A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science*. J. DairySci. 100:10314–10331

SMN (2018). Servicio Meteorológico nacional. Información climatológica por estado. 20-02-2018. Disponible en <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=dgo>.

Takuma, T., Sakai, S., Ezoë, D., Ichimaru, H., Jinnouchi, T., Kaedi, Y., Nagai, T., Otoi, T. (2010). Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. J. Reprod. Dev. 56: 55-59.

Watanabe, Y. F., De Souza, A. H., Mingoti, R. D., Ferreira, R. M., Santana, B. O. E., Dayan, A., Watanabe, O., Meirelles, V. F., Nogueira, G. M. F. Serman, F. J. B., Baruselli, P. S. (2017). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relation with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. Anim. Reprod; 14: 635.644.

Zhang L, Denniston RS, Bunch TD, Godke RA. (1991). Cows vs. heifers for the production of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized (IVF) embryos. J AnimSci 69:49 (abstract).

Table 1. Development of in vitro oocytes, percentage of embryos obtained and pregnancy rate per group.

Group	OPU	IVM	% Clivage	% Blastocyst	%P/ET
Heifer	39	444 ^{ab}	63.5%	13.3%	42.9%
Cow 2 th	34	550 ^a	38.0%	10.0%	-----
Cow 3 th	39	338 ^b	58.5%	16.0%	29.5%
Cow 4 th	39	515 ^{ab}	48.0%	12.0%	42.1%

Column with different script are statistically significant (P <0.05); 2th, 3th and 4th = lactations

P/ET = Pregnancy per embryo transfer

Table 2. Quality of embryos per group produced on day 8.

Group	Total embryos	%MO	%BI	%BL	%BX
Heifer	59	---	10%	78.0%	12.0%
Cow 2 th	54	4.7%	---	42.5%	53.4% ^a
Cow 3 th	54	2.0%	27.7%	59.2%	11.1%
Cow 4 th	62	8.1%	16.1%	67.7%	8.1%

Column with different script are statistically significant (P <0.05); 2th, 3th and 4th = lactations

MO = Morula; BI= Early Blastocyst; BL = Blastocyst; BX = Expended Blastocyst