



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**ALTA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA DURANTE EL  
DESARROLLO FOLICULAR MEJORA LA COMPETENCIA OVOCITARIA  
Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS**

**Federico Cuadro**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2018**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**ALTA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA DURANTE EL  
DESARROLLO FOLICULAR MEJORA LA COMPETENCIA OVOCITARIA  
Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS**

**Federico Cuadro**

---

**Alejo Menchaca**

**Director de Tesis**

---

**Martina Crispo**

**Codirectora**

**2018**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

Daniel Cavestany, DMV, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República – Uruguay

Felipe Perecin, MV PhD

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

Universidade de São Paulo – Brasil

Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan, MV MSc, PhD

Centro de Ciências Médicas, Faculdade Veterinária

Universidade Federal Fluminense – Brasil

# ACTA DEFENSA DE TESIS



## FACULTAD DE VETERINARIA Programa de Posgrados

### ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

#### DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

#### ALTAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR MEJORA LA COMPETENCIA OVOCITARIA Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS.

Por: Dr. José Federico CUADRO MARTÍNEZ

Director de Tesis: Dr. Alejo Menchaca

Codirectora de Tesis: Dra. Martina Crispo

#### Tribunal

Presidente: Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro: Dr. Felipe Perecin

Tercer Miembro: Dra. Joanna Gonçalves De Souza Fabjan

Anfiteatro de Anatomía  
Martes 30 de octubre de 2018

*Aprobado con mención*

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue un trabajo realizado en Fundación IRAUy y la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE), Instituto Pasteur de Montevideo, donde el apoyo de todos los integrantes de ambos grupos fue fundamental para que se pudiese llevar a cabo dicha maestría. El apoyo financiero para realizar mis estudios de posgrado fue gracias a una beca de maestría de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). El proyecto de investigación fue financiado por Union Agriculture Group (UAG) y Syntex Uruguaya.

Me gustaría expresar mi agradecimiento:

- A Alejo Menchaca, tutor y orientador durante el período de la maestría, por su apoyo y todas sus enseñanzas durante estos años.
- A Martina Crispo, por la codirección de la tesis y facilitar las instalaciones de la UATE para realizar mis experimentos.
- A Richard Núñez, Andrea Pinczak, Pedro Claudino, Natalibeth Barrera y Marcela Souza Neves compañeros de trabajo y amigos que la formación académica me regaló.
- A los compañeros de Fundación IRAUy, que se fueron uniendo en estos años: Diego Bosolasco, Victoria de Brun, Camila García-Pintos, Amanda Simões Brochado.
- A los tesisistas que colaboraron en el desarrollo de los experimentos: Hernán Arcaus, Diego Juanena, Rodrigo Perera, Ignacio Puerto y Ricardo López.
- A mi familia por el apoyo que me han dado durante toda la carrera universitaria y especialmente a Paola compañera de vida durante estos 14 años.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>PUBLICACIONES</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Dinámica folicular en ovejas .....	1
1.2 Dominancia folicular .....	2
1.3 El control de la primera onda folicular .....	3
<b>2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b> .....	3
2.1 Progesterona y fertilidad del ovocito.....	3
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	6
<b>4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	7
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>5.1 Experimento 1</b> .....	8
5.1.1 Tratamiento hormonal.....	8
5.1.2 Colecta embrionaria .....	10
5.1.3 Búsqueda y clasificación de embriones .....	11
5.1.4 Muestras de sangre para análisis de progesterona y estradiol .....	11
<b>5.2 Experimento 2</b> .....	11
5.2.1 Tratamiento hormonal.....	12
5.2.2 Aspiración folicular (LOPU) .....	12
<b>5.3 Experimento 3</b> .....	14
5.3.1 Tratamiento hormonal.....	15
5.3.2 Aspiración folicular (LOPU) .....	15
5.3.3 Maduración <i>in vitro</i> (MIV) .....	17
5.3.4 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) .....	18
5.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	18
<b>5.4 Análisis estadístico</b> .....	19
<b>6. RESULTADOS</b> .....	20
<b>6.1 Experimento 1</b> .....	20
6.1.1 Concentraciones séricas de progesterona y estradiol.....	20
6.1.2 Respuesta ovárica y producción embrionaria .....	21
<b>6.2 Experimento 2</b> .....	23

6.2.1 Respuesta ovárica .....	23
<b>6.3 Experimento 3</b> .....	24
6.3.1 Respuesta ovárica .....	24
6.3.2 Producción de embriones <i>in vitro</i> .....	25
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31

## **PUBLICACIONES**

La información generada en los experimentos de esta tesis fue publicada en dos artículos científicos:

Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Pinczak A, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. (2018). Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 196: 205-210.

Menchaca A, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, Bosolasco D, Barrera N, De Brum V, Crispo M. (2018). Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.* 195: 321-328.



## RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la progesterona durante el desarrollo folicular de la primera onda folicular del ciclo estral sobre la competencia ovocitaria y la producción de embriones en ovinos. Se realizaron tres experimentos en 266 ovejas multíparas durante la estación reproductiva, y en todos ellos se sincronizó la emergencia de la primera onda. En el Experimento 1, durante los tres días luego de la sincronización de la ovulación (durante el desarrollo de la primera onda) las ovejas fueron expuestas a bajas o altas concentraciones de progesterona utilizando o no un dispositivo intravaginal liberador de progesterona. Al mismo tiempo todas las ovejas recibieron un tratamiento de superovulación con 8 dosis de FSH. Luego del tratamiento las ovejas fueron inseminadas por vía intrauterina, a los 6 días se realizó la colecta de los embriones para evaluar su desarrollo en condiciones intrauterinas. En el Experimento 2 se evaluó la respuesta ovárica y ovocitaria, luego de sincronizar la ovulación. Durante la Onda 1 las ovejas se dividieron en cuatro grupos experimentales para recibir o no un tratamiento con progesterona por tres días y recibir o no una dosis de FSH al momento de iniciar el tratamiento con progesterona. Luego de tres días de exposición o no a la progesterona exógena se realizó la punción de los folículos guiada por laparoscopia y se determinó la población folicular y el número y calidad de los complejos cumulus ovocitos (CCOs). En el Experimento 3 se evaluó la competencia embrionaria en condiciones *in vitro*. Las ovejas fueron divididas en dos grupos experimentales para recibir o no un tratamiento con progesterona y todas fueron superovuladas con una dosis de FSH. Luego de tres días de exposición o no a la progesterona exógena, se realizó punción folicular guiada por laparoscopia y los CCOs Grado 1 y 2 fueron fertilizados y cultivados *in vitro*. Los resultados del Experimento 1 mostraron que el tratamiento con progesterona exógena aumentó las concentraciones séricas de esta hormona, pero esto no afectó la respuesta ovárica cuando se superovuló la Onda 1. Asociado a esto, en el Experimento 2 se encontró que la inducción de altas concentraciones de progesterona no tuvo efecto sobre la población folicular ni sobre el número de CCOs recuperados por aspiración folicular de la Onda 1. Sin embargo, en el Experimento 1 se demostró que la exposición a altas concentraciones de progesterona aumentó la tasa de fertilización luego de la inseminación intrauterina, y mejoró la cantidad y calidad de los embriones colectados. Asimismo, en el Experimento 3 se observó una mayor proporción de CCOs Grado 1 en las ovejas cuyos folículos se desarrollaron sobre altas concentraciones de progesterona, y la tasa de fertilización de los ovocitos fue superior con un incremento en el número y calidad de los embriones producidos *in vitro*. En conclusión, en esta tesis se demuestra que la progesterona juega un rol importante durante la fase de crecimiento folicular preovulatorio, mejorando la competencia ovocitaria y el desarrollo de los embriones.

*Palabras clave:* Ovario, Fertilidad, Protocolo Día 0, Ovocito, Calidad embrionaria.

## SUMMARY

The objective was to evaluate the effect of the progesterone during the follicular development of the Wave 1 and the influence on oocyte competence and embryo yield in sheep. Three experiments were performed on 266 multiparous ewes during breeding season. In Experiment 1, the ewes were exposed to low or high progesterone concentrations during the follicular development of the first follicular wave, all the ewes received a superovulation protocol with 8 doses of FSH. Six days after intrauterine insemination the embryos were collected and morphologically evaluated. In Experiment 2, ewes were divided in four experimental groups, the females received or not a progesterone treatment and received or not FSH administration. Three days later follicular aspiration was performed by laparoscopic ovum pickup, and follicular population, number and quality of the cumulus-oocyte complexes (COCs) were determined. In Experiment 3, oocyte competence was evaluated on *in vitro* conditions. Ewes were divided in two experimental groups, the females received or not a progesterone treatment and all of them were submitted to superstimulation with FSH. Three days later the follicles were aspirated and COCs Grade 1 y 2 were subjected to *in vitro* fertilization and culture. The results of Experiment 1 showed that the higher progesterone concentrations induced by the treatment did not affect the ovarian response of Wave 1. Furthermore, the higher progesterone levels had no effect on follicular population or the number of COCs recovered. However, the progesterone treatment in Experiment 1 increased the fertilization rate after intrauterine insemination and induced greater number and quality of the collected embryos. In Experiment 3, greater proportion of Grade 1 COCs was obtained in donors under high progesterone concentrations, and fertilization rate was increased resulting in an improvement on number and quality of the *in vitro* produced embryos. In conclusion, this thesis demonstrates that progesterone plays an important role during the preovulatory follicular development, improving oocyte competence and subsequent embryo development.

*Keywords:* Ovary, Fertility, Day 0 Protocol, Oocyte, Embryo quality.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Dinámica folicular en ovejas

Con la incorporación de la ultrasonografía transrectal para el estudio ovárico en pequeños rumiantes se demostró que el desarrollo folicular en ovejas ocurre bajo un patrón organizado en forma de ondas foliculares de crecimiento y regresión (Evans 2003). En ovejas y cabras, al igual que en vacas, existe abundante información de que ocurren ondas foliculares durante el ciclo estral (3 en ovejas y 4 cuatro en cabras) (Ginther et al. 1995; Rubianes et al. 1996; de Castro et al. 1999; Adams 1999; Evans et al. 2000), durante el anestro (Souza et al. 1996; Bartleswki et al. 1998; Evans et al. 2001), la gestación (Ginther et al. 1989; Pinczak et al. 2001) y la etapa prepuberal (Rawlings et al. 2003). Evans (2003) menciona que el crecimiento de los folículos está organizado en ondas foliculares similar a lo descrito en bovinos. El desarrollo de una onda folicular está dividido en tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia folicular. El reclutamiento folicular está determinado por el incremento en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) que promueve el crecimiento sincrónico de un pool de folículos antrales dando origen a dicha onda. Posteriormente, al menos uno de estos folículos es seleccionado y aumenta el número de receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa. De esta manera continúa su crecimiento sin necesidad del soporte de FSH, a esta etapa se la denomina selección folicular (Evans 2003). A diferencia de los bovinos, en ovinos uno o más folículos pueden ser seleccionados (Evans 2003). Estos folículos seleccionados crecen por 4 a 6 días con una tasa de crecimiento de aproximadamente 1 mm diario. El folículo seleccionado incrementa su secreción de estradiol e inhibina suprimiendo a nivel hipofisario la secreción de FSH (Scaramuzzi et al. 2011). De esta manera los folículos pequeños pierden el soporte gonadotrófico, no pudiendo mantener su crecimiento ya que a diferencia del folículo seleccionado no tienen receptores suficientes para LH, entrando en atresia. Este proceso se denomina dominancia folicular (Scaramuzzi et al. 2011). El folículo dominante continúa su crecimiento y en ausencia de progesterona (p. ej. en la fase folicular) aumenta la secreción de estradiol.

Además, comienzan a incrementar los pulsos de LH, pasan de 1 a 2 pulsos cada 6 h a 1 a 2 pulsos por hora. Dicho incremento dura entre 12 a 14 h produciéndose de esta manera el pico preovulatorio de LH desencadenando la ovulación y formación de un cuerpo lúteo (Rawlings & Bartlewski, 2006; Scaramuzzi et al. 2011).

Sin embargo, en presencia de progesterona (p. ej. durante la fase luteal o en la gestación) este mecanismo no ocurre debido al *feedback* negativo que ejerce la progesterona sobre la pulsatilidad de LH en esta etapa solo se registran de 1 a 2 pulsos de LH cada 6 h (Rawlings & Bartlewski, 2006). El folículo dominante frente a la baja pulsatilidad de LH alcanza un punto en que disminuye su secreción de estradiol e inhibina, frena su crecimiento y comienza luego la atresia, perdiendo la dominancia

(Evans 2003). De esta forma, la pérdida de la función esteroidogénica permite el aumento de FSH que dará lugar al inicio de una nueva onda folicular, produciéndose así el recambio folicular (Rawlings & Bartlewski, 2006).

Durante el anestro estacional, en ausencia de progesterona la pulsatilidad de LH también se ve disminuida, principalmente por el estradiol que ejerce un *feedback* negativo sobre esta gonadotropina (Seekallu et al. 2010a). En esta estación del año, el folículo dominante no llega a ovular y entra en atresia. Al perder dominancia nuevamente emerge una nueva onda tal como ocurre en estación reproductiva (Bartlewski et al. 1998).

## 1.2 Dominancia folicular

Dominancia folicular es el proceso en el cual un folículo antral excede a otros en tasa de crecimiento y tamaño, suprimiendo el desarrollo de los otros folículos dentro de la misma onda en ambos ovarios (Ginther et al. 1995). Por este motivo unos pocos folículos continúan creciendo mientras los otros regresan, si dicho fenómeno no existiera, por ejemplo, en la fase folicular todos los folículos crecerían hasta alcanzar la ovulación. En ovinos y otras especies con doble ovulación, la dominancia folicular puede ser menos absoluta de la observada en bovinos (Evans 2003), sin embargo, existe amplio acuerdo de que un folículo (o dos) es seleccionado y ejerce dominancia sobre los otros folículos (subordinados) de la misma onda (revisado por Evans 2003). Mediante monitoreo ecográfico diario se pudo observar que el número total de folículos pequeños disminuye en correlación con el desarrollo del folículo dominante de la misma onda (Menchaca et al. 2002; Evans et al. 2000; González-Bulnes et al. 2001; 1994; Rubianes et al. 1997).

En un estudio de superovulación en cabras se administró seis dosis decrecientes de FSH cada 12 h y el tratamiento comenzó inmediatamente luego de la ovulación, es decir, al Día 0 del ciclo estral (en ausencia de folículo dominante) o el tercer día después de la ovulación (en presencia de folículo dominante). En este experimento las cabras fueron monitoreadas por ecografía dos veces al día y se registró el número total de folículos mayores a 3 mm. En las cabras tratadas al Día 0, aplicar FSH promovió el aumento de folículos pequeños, lo cual estuvo correlacionado positivamente con el número de folículos medianos y grandes a las 36 y 84 h del Día 0 respectivamente. En contraste, la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento retrasó este patrón de reclutamiento folicular. Este estudio demostró que el reclutamiento folicular es afectado por la presencia de un folículo grande al inicio del tratamiento con FSH (Menchaca et al. 2002). En otro experimento conducido en ovejas monoovulares, se aspiró el folículo dominante de la primera onda del ciclo estral a los 4 días luego del celo (Evans et al. 2002). Al eliminar el folículo dominante inmediatamente incrementaron las concentraciones séricas de FSH. Aumentó en el tamaño y el tiempo de crecimiento del segundo folículo más grande de la misma onda y además aumentó

el número de pequeños folículos (Evans et al. 2002). En conclusión, estos hechos proporcionan evidencia sobre el fenómeno de dominancia folicular en ovejas.

### 1.3 El control de la primera onda folicular

Uno de los factores más importante que influye en la respuesta a la superovulación en ovinos es la presencia o ausencia de grandes folículos en crecimiento al inicio del tratamiento con FSH (Menchaca et al. 2010). Iniciar un tratamiento con FSH en presencia de folículos grandes contribuye a una gran variación del éxito de un programa de producción de embriones (Menchaca et al. 2007). Por otro lado, en ausencia de ellos el tratamiento de superovulación resulta en mejor reclutamiento folicular, tasa de ovulación y/o rendimiento de embrionario (Rubianes et al. 1995, 1997). Los tratamientos tradicionales consisten en colocar un dispositivo intravaginal liberador de progesterona por un largo período (12 a 18 días), e iniciar el tratamiento con FSH 48 h antes de retirar el dispositivo. Con este diseño en la última etapa del protocolo, tenemos concentraciones subluteales de progesterona lo que trae como consecuencia aparición de folículos persistentes evitando el recambio folicular (Menchaca et al. 2007). En estos protocolos el 70-85% de las donantes tienen grandes folículos dominantes en el momento de iniciar el tratamiento con FSH (Veiga-López et al. 2005; Menchaca et al. 2007).

Con la idea de evitar la presencia de estos folículos dominantes en el inicio del tratamiento de superovulación, se diseñó una novedosa, simple y efectiva estrategia de superovulación, la cual consiste en sincronizar la primera onda folicular y a partir de ahí comenzar el tratamiento de estimulación ovárica con FSH. Esto se realiza inmediatamente después de la ovulación, en ausencia de folículos dominantes y en presencia de un grupo homogéneo de pequeños folículos en crecimiento; a este diseño se lo denominó «Protocolo Día 0» (Menchaca, et al. 2007).

Iniciar el tratamiento con FSH junto con la emergencia de la primera onda folicular, nos asegura la ausencia de folículos persistentes y consecuentemente el aumento del reclutamiento folicular, tasa de ovulación, número de embriones recogidos y calidad de los embriones (Menchaca et al. 2002). Además, utilizando este protocolo hay menor incidencia de folículos anovulatorios y regresión prematura de cuerpos lúteos (Menchaca et al. 2010). Según datos publicados tanto en cabras como en ovejas, al usar el Protocolo Día 0 se obtienen dos embriones más por donante que usando el protocolo tradicional (Menchaca et al. 2010).

## **2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### 2.1 Progesterona y fertilidad del ovocito

Los protocolos que proponen el control de la primera onda folicular se enfrentan al desafío que el reclutamiento y desarrollo de los folículos ovulatorios ocurren en bajas

concentraciones de progesterona (<2 ng/mL), situación típica en fase luteal temprana (de Castro et al. 1999; Rubianes et al. 2003). Algunas evidencias sugieren que un aumento de la concentración de progesterona durante el desarrollo del folículo preovulatorio estaría asociado a mayores tasas de preñez. Sin embargo, hasta el momento no está bien definido qué rol juega la progesterona en la maduración de los ovocitos y su potencial impacto en la calidad de estos (Fair & Lonergan, 2012). Por ejemplo, Fonseca et al. (1983) reportó en vacas lecheras que el porcentaje de preñez en la primera inseminación posparto aumentó a medida que las vacas tuvieron mayor concentración de progesterona 12 días previos a la inseminación. Además, algunos autores como Inskip (2004) y Wiltbank et al. (2011) afirman que aumentar la concentración de progesterona antes de la IATF (inseminación a tiempo fijo) resulta en un sustancial incremento de la fertilidad. Estos autores sugieren que en parte la reducción de la fertilidad en el ganado lechero se debe a la baja concentración de progesterona antes de la IATF, aun con folículos nuevos, sin la presencia de folículos persistentes.

Denicol et al. (2012) plantearon determinar el efecto de las bajas concentraciones de progesterona sobre la fertilidad de vacas lecheras en lactación. Trabajaron con la primera y segunda onda folicular (FFW y SFW respectivamente) y un tercer grupo de vacas que estaban en su primera onda folicular a la cual le colocaron durante cinco días dos dispositivos intravaginales de progesterona con 1,34 g cada uno (FFWP). Al medir la concentración de progesterona se observó que el grupo con menores niveles de progesterona fue FFW ( $1,4 \pm 0,1$  ng/mL) y por encima de este se encontraban los grupos SFW ( $3,7 \pm 0,2$  ng/mL) y FFWP ( $3,7 \pm 0,1$  ng/mL), sin diferencia significativa entre ambos. En cuanto a los resultados de tasa de preñez a los 38 días se observó que las vacas del grupo FFW en el cual su folículo ovulatorio se desarrolló con menor concentración de progesterona fueron las que tuvieron menores tasa de preñez (28,6 %), mientras que las vacas del grupo FFWP y SFW tuvieron mejor tasa de preñez 35,6% y 37,2% respectivamente. Concluyendo que se obtienen mayor tasa de preñez al inseminar vacas en las que cuyo folículo ovulatorio se desarrolla sobre altos niveles de progesterona.

En otro estudio en el que se colectó embriones de vacas lecheras en lactancia cuyos folículos crecieron en bajos o altos niveles de progesterona, no se encontró diferencia significativa en la calidad embrionaria al día 7 (Cerri et al. 2011). Sin embargo, Wiltbank et al. (2014), en un estudio similar, encontraron una mayor proporción de embriones grado 1 y 2 en vacas Holstein de alta producción con alta vs. baja concentración de progesterona antes de la inseminación (86.5% vs. 61.5%;  $P < 0,05$ ). En un estudio realizado en vaquillonas superovuladas por Adams et al. (1994), los autores aumentaron la concentración de progesterona durante el desarrollo de los folículos y no encontraron evidencia que la progesterona tenga efecto sobre la calidad embrionaria. En este trabajo no se observó diferencia entre la respuesta ovárica y la producción embrionaria (número de estructuras colectadas y número embriones fertilizados) cuando se superovuló vaquillonas con baja (primera onda folicular) o alta



(segunda onda folicular) concentración de progesterona. Sugiriendo que en un tratamiento de superovulación la concentración de progesterona no tiene efecto sobre la respuesta de los folículos y calidad de los embriones producidos.

En estudios posteriores al comparar vacas superovuladas con bajas (< 2 ng/mL) y altas (> 2 ng/mL) concentraciones de progesterona durante el crecimiento de la primera onda folicular, la progesterona no afecta el número de estructuras colectadas por donante. Sin embargo, las donantes con alta progesterona tuvieron mayor número de embriones clasificados como transferibles (Rivera et al. 2011; Nasser et al. 2011). A su vez, al aumentar la concentración de progesterona durante el tratamiento con FSH, también incrementó el número de embriones congelables, indicando que la progesterona tiene un efecto significativo en la calidad de los embriones producidos (Rivera et al. 2011; Nasser et al. 2011). En cuanto al número de ovocitos clasificados como infertilizados, a medida que baja la concentración de progesterona estos aumentan (Nasser et al. 2011; Rivera et al. 2011). Sin embargo, Rivera et al. (2011) describe que no hay diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos clasificados como infertilizados, indicando que la fertilización no se ve comprometida por la concentración de progesterona.

Adicionalmente, la bibliografía indica que cuando se sincronizó y superovuló la primera onda folicular en Bisontes Americanos (*Bison bison athabasca*) que estaban en anestro estacional, el agregado de progesterona exógena (PRID 1,55 g) no tuvo efecto en la producción embrionaria (Palomino et al. 2016, 2017). Estos autores encontraron mayor proporción de folículos grandes en los animales que no fueron tratados con progesterona, pero el número de estructuras colectadas y embriones congelables (grado 1 y 2) fue igual en ambos tratamientos (Palomino et al. 2016, 2017).

En estos trabajos en los cuales se superovuló la primera onda folicular, para alcanzar niveles de progesterona superior a 2 ng/mL los autores utilizaron dispositivos intravaginales durante un corto periodo de tiempo. Nasser et al. 2011 y Rivera et al. 2011 utilizaron un tratamiento con progesterona durante 4 días mientras que los estudios de Palomino et al. 2016, 2017 y Denicol et al. 2012 usaron 5 días de tratamiento. De esta manera se pone en evidencia que durante el desarrollo folicular es importante que la concentración de progesterona alcance altos niveles durante un corto periodo de tiempo, no siendo necesario mantener el tratamiento por un periodo largo.

La secuencia de antecedentes descritos nos brinda información clara o conclusiones definitivas del efecto de los niveles de progesterona sobre el desarrollo folicular en bovinos. En ovinos, no existen estudios acerca de este posible efecto de la progesterona. Por este motivo, sería de gran utilidad generar información sobre el efecto de esta hormona en el desarrollo folicular en pequeños rumiantes. A su vez, aún no está claro cuál es el mecanismo por el cual aumentar las concentraciones de

progesterona durante el desarrollo folicular de la primera onda mejoraría la producción embrionaria o la fertilidad.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Sincronizar la emergencia de la primera onda folicular es una estrategia eficaz que nos permite mejorar la respuesta ovárica y producción de embriones en programas MOET (múltiple ovulación y transferencia embrionaria) comparado con aquellos protocolos tradicionales que no consideran la dominancia folicular. Sin embargo, de acuerdo con la información citada en bovinos, las bajas concentraciones de progesterona durante el desarrollo del folículo ovulatorio de la primera onda folicular podrían influir negativamente sobre la tasa de preñez en vacas inseminadas y también en los resultados de MOET. En pequeños rumiantes no existe información publicada acerca de cómo influye la progesterona durante el desarrollo folicular, la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario temprano. Esta información además de profundizar sobre fisiología ovárica también es útil para mejorar la eficiencia de algunas técnicas reproductivas que utilizan la primera onda folicular. La información generada permitiría plantear nuevos ajustes a los tratamientos que controlan la emergencia folicular.

#### **Hipótesis**

El aumento de las concentraciones de progesterona durante el reclutamiento y desarrollo de la primera onda folicular en ovinos (fase luteal temprana) mejora la producción embrionaria debido al incremento en la calidad de los ovocitos.

#### **Objetivo general**

Determinar el efecto de la progesterona durante el desarrollo folicular de la onda 1, cómo influye sobre la producción embrionaria y si este efecto está mediado por la fertilidad de los ovocitos.

#### **Objetivos específicos**

Identificar el efecto de la progesterona sobre:

- El desarrollo y calidad de embriones producidos *in vivo* e *in vitro*
- El desarrollo folicular de la primera onda
- La competencia ovocitaria.



Evaluar la respuesta folicular al tratamiento con FSH reconstruida en ácido hialurónico (MAP-5).

#### 4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para evaluar la calidad y fertilidad de los ovocitos expuestos a bajos o altos niveles de progesterona, se trabajó sobre la primera onda folicular. En dicho modelo, durante los cuatro a cinco días luego de la ovulación (fase luteal temprana), las concentraciones sanguíneas de progesterona son bajas y cercanas a 1 ng/mL (de Castro et al. 1999; Rubianes et al. 2003). De esta manera se puede evaluar el efecto de la progesterona sobre el ovocito cuando esta hormona se encuentra a concentraciones bajas. Por otra parte, la administración exógena de progesterona (a través de un dispositivo liberador de progesterona) permite aumentar rápidamente la concentración de esta hormona a niveles superiores de 2 ng/mL (Vilariño et al. 2010). Asimismo, los ovocitos se verán expuestos a condiciones de baja y alta concentración de progesterona. Además, este modelo nos permite trabajar con ovocitos saludables provenientes de folículos jóvenes, evitando la presencia de folículos persistentes. Esto es posible mediante la sincronización de la emergencia de la primera onda logrando un recambio folicular (Menchaca y Rubianes, 2004) y asegurando que la calidad del ovocito no se vea comprometida por un inadecuado desarrollo. De esta manera el factor diferencial es la concentración de progesterona a la que los ovocitos son expuestos.

Utilizando este modelo, se realizaron tres experimentos:

En el Experimento 1 se superovuló las donantes utilizando el Protocolo Día 0 (Menchaca et al. 2009). En este tratamiento se indujo la emergencia de la primera onda folicular. Las donantes fueron expuestas a bajas o altas concentraciones de progesterona, lo que permitió contrastar estas dos situaciones en condiciones *in vivo*. A los 6 días de la inseminación artificial se evaluó la respuesta al tratamiento mediante del número de cuerpos lúteos, número de estructuras colectadas, embriones transferibles y Grado 1 por donante.

En el Experimento 2 se estableció el efecto de la progesterona y de la FSH asociada a un polímero de liberación lenta (MAP-5) sobre el reclutamiento folicular y calidad ovocitaria de la primera onda. Al igual que en el Experimento 1 se sincronizó la ovulación y la emergencia de la onda 1 (Día 0) y en este momento las donantes se dividieron en cuatro grupos experimentales en un diseño 2x2 factorial: Grupo sin FSH sin P4 (control); Grupo sin FSH con P4, las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona; Grupo con FSH sin P4, las donantes recibieron una dosis de 80 mg de FSH reconstruida en ácido hialurónico (MAP-5); y Grupo con FSH con P4, las donantes recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona asociado a una dosis de 80 mg de FSH reconstruido en hialurónico (MAP-5). Los grupos con progesterona recibieron un dispositivo con 0,3 g de progesterona durante 72 h. Al Día 3 se realizó punción folicular guiada por laparoscopia (LOPU) de todos los folículos mayores a 3 mm. En este momento se determinó población folicular, número y calidad

de los complejos cumulus ovocitos (CCOs) recuperados. Los CCOs colectados fueron evaluados y clasificados según el número de capas de células del cúmulo y homogeneidad en el citoplasma del ovocito.

En el Experimento 3 se trabajó en un modelo *in vitro* para profundizar el efecto de la progesterona sobre la competencia ovocitaria, fertilidad de los ovocitos, así como tasa de desarrollo de los embriones bajo condiciones controladas de laboratorio. Al igual que en el Experimento 1 y 2, se superovuló la primera onda folicular con bajas y altas concentración de progesterona. En este experimento las donantes fueron asignadas a dos grupos experimentales con o sin progesterona desde el Día 0 al Día 3. Al Día 3 se realizó punción folicular guiada por laparoscopia (LOPU) de todos los folículos mayores a 3 mm. Los CCOs colectados fueron evaluados y clasificados según el número de capas de células del cúmulo y homogeneidad en el citoplasma del ovocito. Luego fueron madurados, fertilizados y cultivados *in vitro*. Se evaluó Tasa de clivaje a las 48 h (embriones con más de 2 células/ovocitos en maduración). Tasa de desarrollo en el Día 6 (embriones en el día 6/ovocitos en maduración), la Tasa de Blastocistos al Día 8 (Blastocisto al día 8/ovocitos en maduración), y la Tasa de eclosión al Día 8 (Blastocistos eclosionados al día 8/embriones clivados).

En los experimentos 1 y 3 la evaluación morfológica de los embriones fue realizada de acuerdo con las normas recomendadas por la IETS (Stringfellow & Givens 2010).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Experimento 1**

El Experimento 1 se realizó en instalaciones de Fundación IRAUy (Instituto de Reproducción Animal del Uruguay) en Montevideo, Uruguay (34° LS), durante estación reproductiva (mayo a junio). Se utilizaron 71 ovejas multíparas Merino australiano con condición corporal de  $3,6 \pm 0,4$  (escala: 1 muy flaca; 5 obesa), las cuales se mantuvieron pastoreando sobre campo nativo suplementadas diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (1000 y 300g/oveja/día respectivamente).

#### **5.1.1 Tratamiento hormonal**

Todas las ovejas fueron sincronizadas y superovuladas utilizando el Protocolo Día 0 (Menchaca, et al. 2009). Este tratamiento consiste en la utilización de esponjas intravaginales con un análogo de progesterona (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 6 días, asociado a 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 125 ug de un análogo de prostaglandina (Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja. Para asegurar la ovulación y un mayor grado de sincronización de la ovulación, 36 h luego del retiro se administró una dosis de 8 µg

de acetato de buserelina i.m. análogo de GnRH (Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina). Según reportes previos, este tratamiento nos asegura que a las 72-84 h luego del retiro de la esponja, más del 90% de las hembras habrán alcanzado la ovulación (Menchaca et al. 2009). Posterior a la aplicación de GnRH, todas las ovejas se dividieron según condición corporal en dos grupos experimentales. En un grupo las donantes fueron superovuladas con bajos niveles de progesterona ( $n= 33$ ), situación típica en fase luteal temprana, mientras en el otro grupo las donantes fueron superovuladas con altos niveles de progesterona ( $n= 38$ ) utilizando un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina). La dosis total de superovulación fue de 240 mg de FSH (Folltropin, Vetoquinol S.A., Lure cedex, Francia).

El tratamiento de superovulación comenzó a las 84 h de haber retirado la esponja, es decir, inmediatamente luego de la ovulación (Menchaca et al. 2009). La dosis total de FSH fue dividida en ocho dosis decrecientes (50, 50, 36, 36, 24, 24, 10 y 10 mg) cada 12 h durante 4 días. Las donantes del grupo Alta progesterona fueron tratadas con un dispositivo intravaginal de progesterona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina) desde la 1<sup>a</sup> hasta la 7<sup>a</sup> dosis de FSH. Todas las ovejas recibieron dos dosis 62,5 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) junto con la 7<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> dosis de FSH. A las 36 h de la última FSH se administró de 8 µg análogo de GnRH i.m. (Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina). La inseminación se realizó bajo sedación moderada (4.0 mg of acepromazine maleate, i.m.; Acedan, Holliday-Scott, Buenos Aires, Argentina) a las 16 y 24 h de administrar GnRH. Este procedimiento se realizó por vía intrauterina utilizando laparoscopia (Karl Storz Hopkins, Tuttlingen, Germany) con semen fresco ( $100 \times 10^6$  de espermatozoides por oveja) previamente evaluado por motilidad y morfología espermática. El diseño experimental se muestra en la Figura 1.

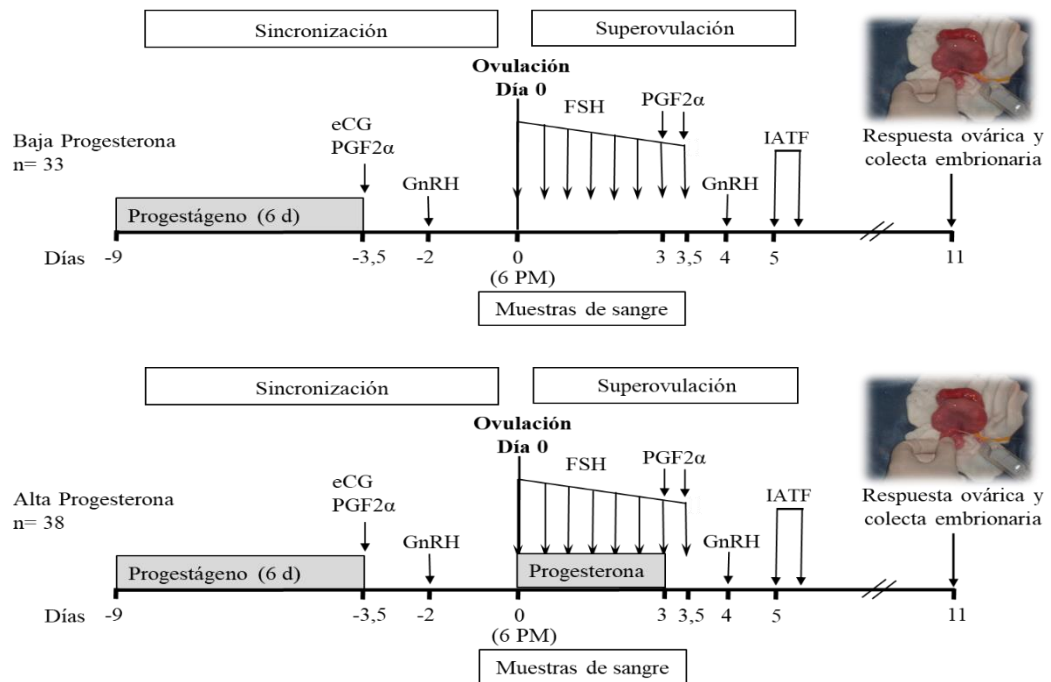


Figura 1. Diseño experimental para el estudio de superovulación de la primera onda folicular (Protocolo Día 0) expuesta a bajas o altas concentraciones de progesterona (panel superior e inferior respectivamente). El Día 0 fue definido a las 84 h luego del tratamiento de sincronización (Menchaca et al. 2009). La progesterona exógena fue administrada durante 3 días desde el Día 0 mediante el uso de un dispositivo intravaginal que contiene 0,3 g de progesterona (dispositivo DICO). A los 6 días de la IATF se procedió a la colecta y evaluación embrionaria.

### 5.1.2 Colecta embrionaria

La colecta embrionaria se realizó por laparotomía paramediana a los 6,5 días de la inseminación. Previo a la colecta, las ovejas se mantuvieron 24 h en ayuno sólido y 12 h en ayuno líquido. Antes de la cirugía las donantes se colocaron en camillas para laparoscopia con una inclinación de 45°, se realizó sedación combinando diazepam (5 mg dosis total Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay) y ketamina (100 mg dosis total Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, durante la cirugía las donantes permanecieron bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane, Abbott, Chicago, USA). Se realizó una incisión (5 cm de longitud) paralela a la línea media y craneal a la ubre que permite exteriorizar los cuernos uterinos. Cada cuerno uterino fue lavado por separado insertando un catéter 18 G próximo a la unión útero-tubal por el cual se pasa 40 ml de medio de lavado (BoviFlush, Minitube, Tiefenbach, Alemania) que fue colectado con una sonda Foley 8 o 9 Fr (Rush) insertada en la bifurcación externa del cuerno. Los embriones fueron colectados en una caja de Petri (90 mm).

### 5.1.3 Búsqueda y clasificación de embriones

La búsqueda y clasificación de los embriones se realizó bajo lupa estereoscópica a 20x y 40x de aumento respectivamente. A medida que las estructuras fueron identificadas se colocaron en cajas de Petri de 35 mm con medio Holding, para luego ser clasificadas. Durante este periodo los embriones permanecieron a temperatura de laboratorio (20-25°C), protegidos de la luz y en condiciones de asepsia. Los embriones fueron clasificados por calidad y estadio de desarrollo según criterio utilizando por la *International Embryo Transfer Society* (Stringfellow & Givens 2010). En cuanto a calidad, los embriones se clasificaron como: Grado 1 (excelente y buena), Grado 2 (regular), Grado 3 (pobres), Grado 4 (degenerados y UFO). De acuerdo con el estadio de desarrollo se clasifican como: Mórula, Blastocisto temprano, Blastocisto, Blastocisto expandido y Blastocisto eclosionado.

### 5.1.4 Muestras de sangre para análisis de progesterona y estradiol

Para las determinaciones de progesterona y estradiol se tomaron 6 muestras de sangre por punción de la vena yugular, a las 12 h antes del Día 0, al Día 0, y a las 12, 36, 72, y 84 h posteriores al día 0. Para la colecta de sangre se utilizaron tubos de ensayo de vidrio y a cada oveja se le extrajo 10 mL de sangre. Luego de la colecta la sangre fue centrifugada a 3000 RPM durante 20 min, el suero fue separado de la fracción celular y congelado a -20°C hasta su análisis. Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de progesterona fueron determinadas por radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida utilizando kits de Siemens Healthcare Diagnostics, Los Ángeles, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas en el mismo ensayo. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,09 ng/mL. Los coeficientes de variación intraensayo para los controles bajos (0,5 ng/mL), medios (2,4 ng/mL) y altos (8,0 ng/mL) fueron 7,7%, 6,8% y 7,1% respectivamente. Las muestras de plasma/suero se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de 17  $\beta$  Estradiol fueron determinadas por radioinmunoensayo en fase líquida (RIA), Doble Anticuerpo Estradiol, utilizando kits de Siemens Healthcare Diagnostics, Los Ángeles, CA, USA) como describió previamente Meikle et al. (1998). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en un mismo ensayo. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 1,8 pg/mL, los coeficientes de variación intraensayo para los controles 1 (15,09 pg/mL) y 2 (23,15pg/mL) fueron 6,8% y 6,5% respectivamente.

## 5.2 Experimento 2

El Experimento 2 se realizó en el laboratorio de Fundación IRAUy, en estación reproductiva durante los meses de febrero a marzo en 10 réplicas. Se utilizaron un total

de 75 ovejas multíparas Merino australiano con condición corporal de  $3,4 \pm 0,6$  (escala: 1 muy flaca; 5 obesa), las cuales se mantuvieron pastoreando sobre campo nativo suplementadas diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (1000 y 300g/oveja/día respectivamente).

### 5.2.1 Tratamiento hormonal

Para sincronizar e inducir la emergencia de la primera onda folicular se utilizó un tratamiento corto (Menchaca & Rubianes, 2004). Este tratamiento consiste en la utilización de esponjas intravaginales con un análogo de progesterona (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 6 días, asociado a 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 125 ug de un análogo de prostaglandina (Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja. Pasadas 36 h del retiro se administró una dosis de 8 µg de acetato de buserelina i.m, análogo de GnRH (Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina). Con esta estrategia nos aseguramos que entre las 72-84 h del retiro de la esponja todas las ovejas ovularon (Día 0 del ciclo) y comienza la emergencia de la 1ª onda folicular (Menchaca & Rubianes 2004). En este momento las ovejas fueron divididas en cuatro grupos experimentales: Grupo sin FSH sin P4 ( $n= 21$ ); Grupo sin FSH con P4 ( $n= 24$ ) recibieron tratamiento con un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina); Grupo con FSH sin P4 ( $n= 16$ ) recibieron una dosis de 80 mg de FSH (Folltropin, Vetoquinol S.A., Lure cedex, Francia) reconstruida en 10 mL de ácido hialurónico (MAP-5, Bioniche Animal Health, Canadá) este es un polímero biodegradable que resulta en una liberación lenta y sostenida de FSH durante 4 días (Tribulo, et al. 2011; 2012); y Grupo con FSH con P4 ( $n= 14$ ) que recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona asociado a una dosis de 80 mg de FSH reconstruido en MAP-5. A las 72 h de administrar la FSH (o sea Día 0 del ciclo estral) se realizó aspiración folicular guiada por laparoscopia (LOPU). En los animales de los grupos tratados con progesterona, el dispositivo intravaginal se mantuvo hasta el momento de la LOPU. El diseño de este experimento se muestra en la Figura 2.

### 5.2.2 Aspiración folicular (LOPU)

El procedimiento de LOPU se realizó según lo descrito por Baldassarre (2012) y actualizada recientemente (Menchaca et al. 2016). Previo a este procedimiento las ovejas se mantuvieron en ayuno sólido y líquido durante 24 h y 12 h respectivamente. Al momento de la LOPU se realizó sedación previa con una combinación de diazepam (5 mg dosis total de Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay) y ketamina (100 mg dosis total de Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, durante el procedimiento de aspiración folicular permanecieron bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil). Los folículos se clasificaron en pequeños (menores a 3 mm); medianos (de 3-5 mm) y grandes (mayores a 5 mm), solamente se aspiraron los folículos medianos y grandes. El líquido folicular se recuperó en tubos Falcon de 50 mL e inmediatamente se procedió a la

búsqueda de los Complejos cumulus ovocito (CCO). El líquido recuperado fue colocado en placas de Petri de 90 mm, los CCOs se buscaron en lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA) a 20x y la clasificación se realizó con aumento de 40x. La clasificación se ejecutó según el número de capas de células del cúmulo y homogeneidad en el citoplasma del ovocito. Siguiendo este criterio, los CCOs se clasifican en 4 grupos; Grado 1: ovocito completamente rodeados de células del cumulus con citoplasma homogéneo; Grado 2: ovocito parcialmente rodeados de células del cumulus con citoplasma poco homogéneo; Grado 3: desnudos con citoplasma irregular y oscuro; Grado 4: rodeados de fibrina (forma de telaraña) con citoplasma oscuro y más irregular que el grado anterior. Este procedimiento fue realizado manteniendo los CCOs en medio de búsqueda (TCM 199, Hepes, SFB, ATB).

Luego de aspirar y con el objetivo de minimizar adherencias se procedió al lavado del ovario con 40-60 mL de suero fisiológico estéril suplementado con antibiótico (200.000 UI de penicilina G por 1 litro). Al finalizar cada sesión de LOPU cada oveja fue tratada con 0,5 mg/Kg de oxitetraciclina (Terramicina, LA, Zoetis, Buenos Aires, Argentina).



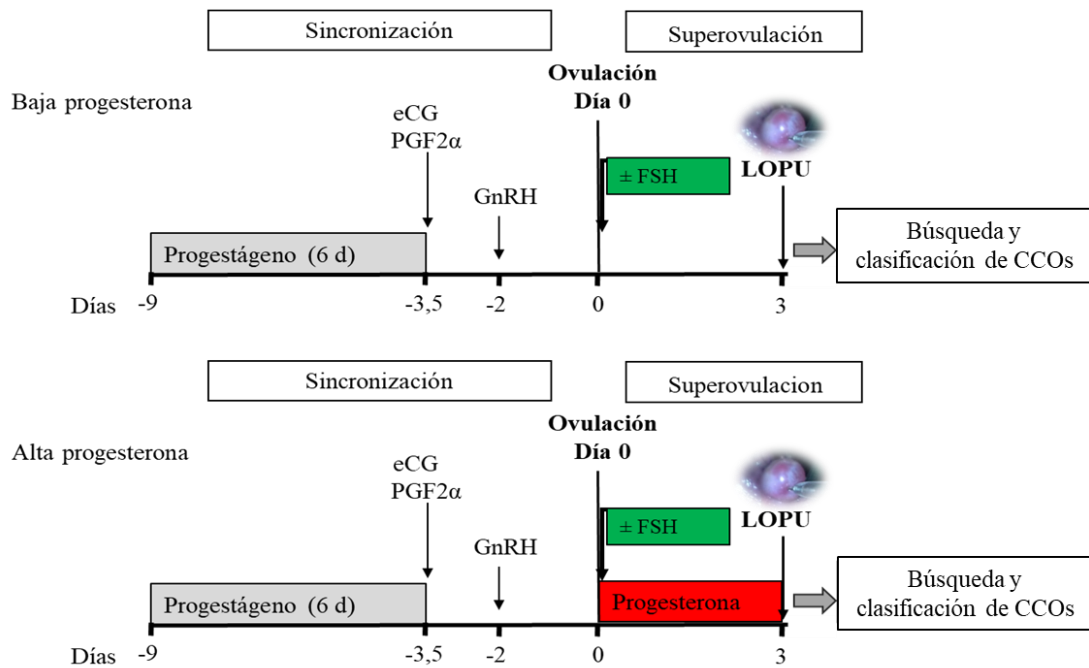


Figura 2. Modelo experimental de la primera onda folicular para evaluar el efecto de la progesterona sobre la población folicular y calidad ovocitaria. En los grupos experimentales la ovulación fue sincronizada usando un protocolo corto con tratamiento de progestágeno más prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) y gonadotropina coriónica equina (eCG). Para asegurar la ovulación a las 36 h del tratamiento con progestágeno se administró GnRH. El Día 0 fue definido a las 84 h del tratamiento de presincronización (es decir, inmediatamente de la ovulación), en este momento diferentes grupos experimentales fueron aplicados durante el desarrollo de la onda 1 (es decir, durante fase luteal temprana). Al día 0 las hembras recibieron o no un *priming* de progesterona ( $n= 38$  y  $n= 37$ ) y un tratamiento de FSH ( $n= 30$  y  $n= 45$ ) en un diseño factorial de 2x2. La progesterona fue administrada usando dispositivo intravaginal (DICO) desde el Día 0 al Día 3, mientras el tratamiento de superovulación se realizó el Día 0 con una dosis única de FSH reconstruida en ácido hialurónico. En el Día 3 se realizó evaluación de la población folicular y aspiración folicular guiada por laparoscopia (LOPU), luego de la LOPU se determinó la calidad ovocitaria de los CCOs colectados.

### 5.3 Experimento 3

El experimento se realizó en el laboratorio de Fundación IRAUy y Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay durante los meses de mayo a agosto en 12 réplicas. Se utilizaron 120 ovejas multíparas Merino australiano con condición corporal de  $3,3 \pm 0,7$  (escala de 1 muy flaca; 5 obesa), alimentadas en campo nativo, suplementadas diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (1000 y 300g/oveja/día respectivamente).



### 5.3.1 Tratamiento hormonal

Para sincronizar la emergencia de la primera onda folicular se utilizó el mismo tratamiento descrito en el Experimento 2. El tratamiento de superovulación comenzó a las 84 h de retirar las esponjas y se administró una dosis única de 100 mg de FSH (Folltropin, Vetoquinol S.A., Lure cedex, Francia) reconstruida en ácido hialurónico (MAP-5, Bioniche Animal Health, Canadá). En este momento las ovejas fueron divididas al azar en dos grupos experimentales para recibir estimulación folicular con bajos o altos niveles de progesterona. Las ovejas del grupo Alta progesterona ( $n= 59$ ) al momento de administrar FSH recibieron adicionalmente una aplicación permanente de progesterona mediante un dispositivo intravaginal liberador de esta hormona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina), mientras el grupo Baja progesterona ( $n= 61$ ) se mantuvo como control sin tratamiento adicional. A las 72 h de administrar la FSH (Día 0) se realizó aspiración.

### 5.3.2 Aspiración folicular (LOPU)

La LOPU fue realizada según la técnica descrita por Baldassarre (2012) y actualizada recientemente (Menchaca et al. 2016). Previo a este procedimiento las ovejas se mantuvieron en ayuno sólido y líquido durante 24 h y 12 h respectivamente. En el momento de la LOPU se realizó una sedación previa con combinación de diazepam (5 mg dosis total de Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay) y ketamina (100 mg dosis total de Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina). Durante el procedimiento las ovejas permanecieron bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil). Los folículos fueron clasificados en pequeños (menores a 3 mm); medianos (de 3-5 mm) y grandes (mayores a 5 mm), solamente se aspiraron los folículos medianos y grandes. El líquido folicular se recuperó en tubos de 50 mL e inmediatamente se procedió a la búsqueda de los Complejos cumulus ovocito (CCOs). Después de aspirar todos los folículos, con el objetivo de minimizar adherencias se procedió el lavado del ovario con 40-60 mL de suero fisiológico estéril suplementado con antibiótico (200.000 UI de penicilina G por 1 litro).

Al finalizar cada sesión de LOPU a cada oveja se le administró 0,5 mg/Kg de oxitetraciclina (Terramicina LA, Zoetis, Buenos Aires, Argentina). El líquido folicular recuperado fue colocado en placas de Petri de 90 mm, los CCOs se buscaron en lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA) a 20x y la clasificación se realizó con aumento de 40x. El criterio de clasificación se realizó según el número de capas de células del cúmulo y homogeneidad en el citoplasma del ovocito. Siguiendo este criterio, los CCOs se clasifican en 4 grupos; Grado 1: ovocito completamente rodeados de células del cumulus con citoplasma homogéneo; Grado 2: ovocito parcialmente rodeados de células del cumulus con citoplasma poco homogéneo; Grado 3: desnudos con citoplasma irregular y oscuro; Grado 4: rodeados de fibrina (forma de telaraña) con citoplasma oscuro y más irregular que el grado anterior. Este procedimiento fue realizado manteniendo los CCOs en medio de búsqueda (TCM 199, Hepes, SFB, ATB). Solamente los CCOs Grado 1 y 2 fueron seleccionados para su posterior maduración. En la Figura 3 se puede observar el diseño experimental desde el tratamiento hormonal hasta la colecta y clasificación de los CCOs. Los CCOs se mantuvieron separados según grupo experimental y se colocaron en tubos Falcon de 5 mL con medio de maduración + Hepes para su transporte (durante 40 minutos) hasta el laboratorio de producción de embriones *in vitro* en Instituto Pasteur. En la Figura 4 muestra los pasos de producción de embriones *in vitro* (PIV) que se realizaron en el Instituto Pasteur.

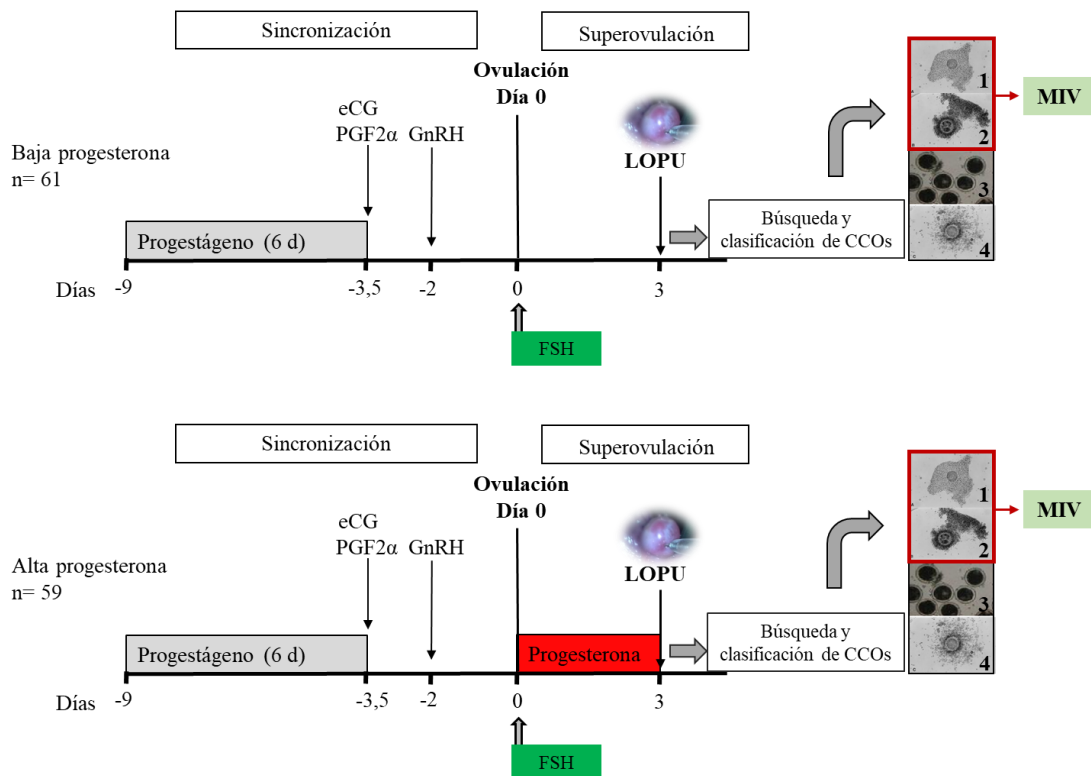


Figura 3. Modelo experimental de la primera onda folicular para evaluar el efecto de la progesterona sobre la población folicular, competencia ovocitaria y desarrollo embrionario. En ambos grupos experimentales la ovulación fue sincronizada usando un protocolo corto con un tratamiento con progestágeno más prostaglandina F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) y gonadotropina coriónica equina (eCG). Para asegurar la ovulación a las 36 h del tratamiento con progestágeno se administró GnRH. El Día 0 fue definido a las 84 h del tratamiento de presincronización (es decir, inmediatamente de la ovulación), en este momento las hembras se dividieron en 2 grupos experimentales recibiendo o no un *priming* de progesterona (Baja y Alta progesterona) durante el tratamiento con FSH. La progesterona fue administrada usando dispositivo intravaginal (DICO) desde el Día 0 al Día 3, mientras el tratamiento de superovulación se realizó el Día 0 con una dosis única de FSH reconstruida en ácido hialurónico. En el Día 3 se realizó la evaluación de la población folicular y aspiración (LOPU). La calidad ovocitaria fue determinada luego de la LOPU, mientras que la competencia ovocitaria fue evaluada por la habilidad de desarrollar embriones viables bajo condiciones *in vitro*.

### 5.3.3 Maduración *in vitro* (MIV)

En el laboratorio los CCOs seleccionados (CCOs 1 y 2) de cada uno de los grupos experimentales fueron puestos a madurar en gotas de 100  $\mu$ L de medio de maduración (MIV: TCM Hepes 199, 10% suero de oveja en estro (SOE), 10  $\mu$ L/mL FSH, 10  $\mu$ L/ml LH, 100  $\mu$ M cisteamina, 50 UI/mL Penicilina y 50  $\mu$ g/mL Estreptomina), sobre

placas de Petri de 35 mm cubiertas con aceite mineral y luego incubados a 39°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h, pasado este periodo inmediatamente fueron fertilizados.

#### 5.3.4 Fertilización *in vitro* (FIV)

Para la fertilización los CCOs maduros fueron lavados tres veces en gotas de medio SOF-Fertilización, manteniendo las células del cumulus para la realización de la fertilización. Luego se colocaron en placa de Petri de 35 mm con gotas de 100 µl de medio SOF-Fert bajo aceite mineral. Para la FIV se usó semen congelado del mismo carnero utilizado en el Experimento 1. La pajueta se descongeló a baño maría a 37°C por 30 segundos. Luego de la descongelación se realizó selección espermática mediante *swim up* (Parrish et al. 1986). Esta técnica consiste en seleccionar los espermatozoides viables mediante su capacidad de migrar a «contracorriente» cuando son colocados en medio SOF-Fertilización. Esto se logra depositando 200 µL del contenido de la pajueta en el fondo de un tubo de fondo cónico (1 cm diámetro aprox.) el cual anteriormente se le colocó 1 ml de SOF-Fertilización. El tubo con medio más semen es incubado en estufa a 39°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 15 min y colocado con inclinación de 45°, transcurrido este periodo se toma 830 µL de la fracción superior de la muestra. El semen seleccionado es evaluado según vigor y motilidad individual siendo aceptable 70% motilidad individual y 3 de vigor (escala 1 a 5). Para medir concentración se usó dilución 1/100 (990 µL de agua destilada + 10 µL de semen post *swim up*) el conteo se realizó en cámara de Neubauer. Cada gota de fertilización fue inseminada con un millón de espermatozoides. El semen y los CCOs madurados se mantuvieron incubados en estufa de cultivo por 18-22 h a 39°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5.3.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Al finalizar la FIV, los presumibles cigotos son lavados en medio de desarrollo -SOFaa-Desarrollo, mediante sucesivo pipeteo a fin de eliminar los restos de espermatozoides, células del cumulus y debris celulares. Luego se vuelven a lavar en gotas (50µL) de medio de desarrollo -SOFaa-Desarrollo y son cultivados en placas de Petri de 35 mm en gotas de 100 µL (máximo 30 cigotos/gota) de dicho medio bajo aceite mineral. El desarrollo de los embriones se realizó dentro de una cámara de tri-gaseado con 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> e incubados a 39°C. A las 48 h de colocar los cigotos en medio cultivo se evaluó la fertilización de los ovocitos mediante la tasa de clivaje (embriones de 2 o más células/total ovocitos puestos en maduración). En los días 3 y 6 de desarrollo se realizó cambio de medio, este paso consiste en remover el 80% del volumen de las gotas y sustituirlo por el mismo volumen de medio -SOFaa-Desarrollo nuevo (Vilariño et al. 2012). En el día 6 los embriones fueron clasificados según su estadio de desarrollo. Para su clasificación se utilizan los criterios de la *International Embryo Transfer Society* (Stringfellow & Givens 2010). Los embriones permanecieron en cultivo hasta el Día 8 cuando se evaluó la tasa de Blastocistos al día 8 (Blastocisto al día 8/ovocitos en maduración), y la tasa de eclosión al día 8 (Blastocistos eclosionados al día 8/ embriones clivados).

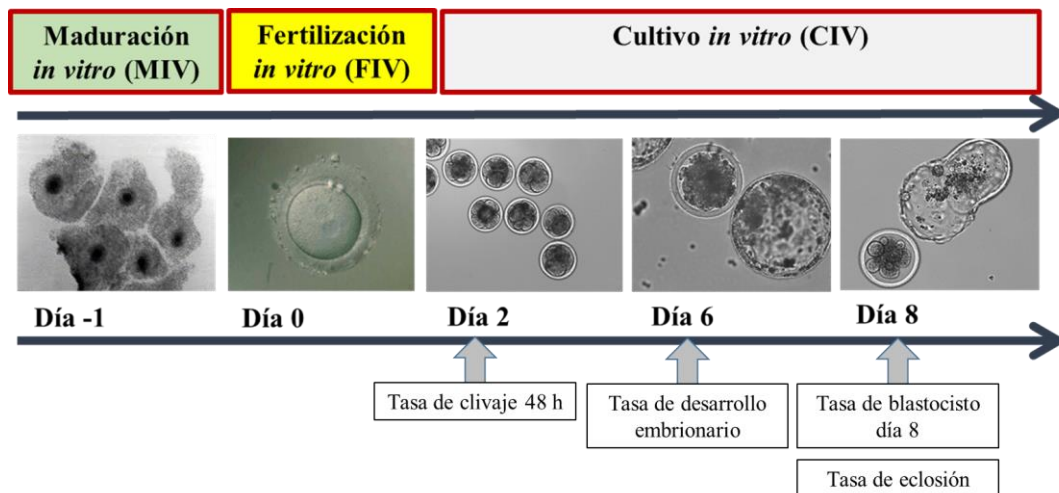


Figura 4. Representación cronológica de los pasos en producción de embriones *in vitro* y variables evaluadas en cada uno de ellos.

#### 5.4 Análisis estadístico

En el Experimento 1 el número de cuerpos lúteos y la producción de embriones fue comparado por análisis no paramétrico de Kruskal–Wallis, mientras que las concentraciones de progesterona y estradiol-17 $\beta$  fueron analizadas por ANOVA para mediciones repetidas, para ambos análisis fue utilizado el paquete de modelos mixtos de Infostat (Di Rienzo et al. 2014). Los datos que se muestran en porcentajes fueron analizados por modelos lineales generalizados y mixtos (GLMMs) que utiliza regresión logística para dicha comparación. El análisis estadístico incluyó el efecto del tratamiento (baja o alta progesterona) y el día (para las determinaciones hormonales) que fueron considerados como efectos fijos, y las donantes fueron consideradas como efecto aleatorio. Los resultados son presentados como media ( $\pm$ SEM) y el nivel de significancia fue definido para  $P < 0,05$ .

Para los Experimentos 2 y 3 los datos de folículos y CCOs fueron analizado por análisis no paramétricos usando modelos mixtos de Infostat (Di Rienzo et al. 2015) y los resultados son presentados como media ( $\pm$  SEM). Los datos expresados como porcentaje fueron analizados por GLMMs y el modelo incluyó el tratamiento como efecto fijo, mientras que las hembras (Experimento 2 y 3), los ovocitos/embriones (Experimento 3) y las réplicas fueron incluidas como efectos aleatorios. Para el Experimento 2 también se evaluó la interacción entre los tratamientos con progesterona y FSH. Las diferencias estadísticas fueron definidas para un nivel de significancia de  $P < 0,05$  y se consideró como tendencia estadística un valor  $P < 0,1$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1

#### 6.1.1 Concentraciones séricas de progesterona y estradiol

Las concentraciones séricas de progesterona y estradiol fueron afectadas por el tratamiento y el día de tratamiento ( $P < 0,05$ ). En el Día 0 (cuando se administró la primera dosis de FSH), las concentraciones de progesterona fueron  $0,5 \pm 0,2$  ng/mL y  $0,6 \pm 0,2$  ng/mL para Baja y Alta progesterona respectivamente ( $P = \text{NS}$ ), sin embargo, se incrementó rápidamente en el grupo tratado con progesterona exógena (Figura 5). Las concentraciones de progesterona durante el tratamiento (es decir hasta el Día 3) fueron mayores en el grupo de ovejas tratadas con progesterona ( $1,6 \pm 0,3$  y  $7,0 \pm 1,0$  ng/mL; Baja y Alta progesterona respectivamente,  $P < 0,05$ ). El nivel de progesterona a las 12 h de haber retirado el dispositivo no difirió para ambos grupos ( $0,8 \pm 0,1$  y  $1,1 \pm 0,1$  ng/mL; Baja y Alta progesterona respectivamente,  $P = \text{NS}$ ).

Las concentraciones séricas de estradiol-17 $\beta$  no fueron afectadas por el tratamiento, pero sí por el día del tratamiento, además no hubo interacción entre ambos factores. Las concentraciones de estradiol fueron aumentando durante el tratamiento con FSH y alcanzaron los niveles más altos con la última dosis de FSH ( $14,1 \pm 2,7$  y  $11,9 \pm 2,4$  pg/mL; Baja y Alta progesterona respectivamente,  $P = \text{NS}$ ).

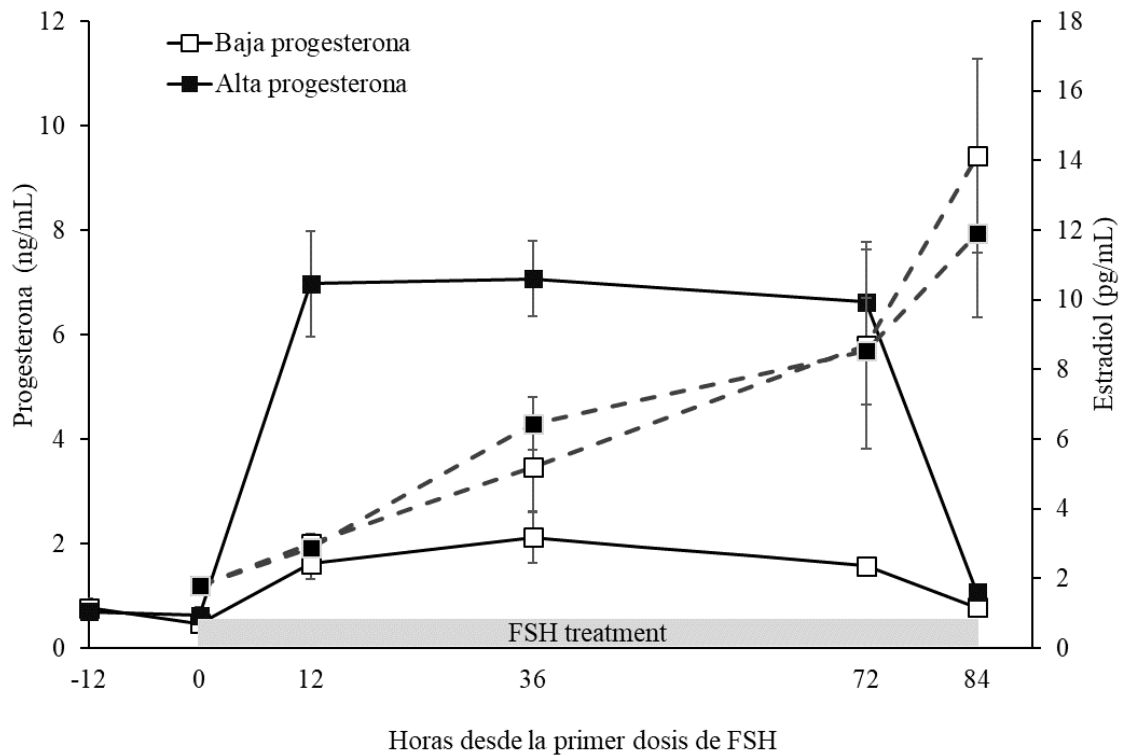


Figura 5. Concentraciones séricas de progesterona (línea continua) y estradiol-17 $\beta$  (línea punteada) durante el tratamiento de superovulación de la primera onda folicular en ovejas que recibieron ( $n= 38$ ) o no ( $n= 33$ ) un dispositivo con progesterona (DICO, 0,3 g de progesterona) durante 72 h. La barra gris representa el tratamiento con FSH para ambos grupos experimentales. Se encontraron diferencias significativas entre grupos experimentales para la concentración de progesterona ( $P < 0,05$ ) pero no para concentraciones de estradiol-17 $\beta$ .

### 6.1.2 Respuesta ovárica y producción embrionaria

Los resultados de respuesta ovárica y producción embrionaria se pueden observar en la Tabla I. La respuesta de las donantes fue similar en las ovejas tratadas o no tratadas con progesterona exógena ( $P= NS$ ). El número de cuerpos lúteos por donante no fue afectado por la progesterona, sin embargo, el número de estructuras colectadas fue mayor en el grupo Alta progesterona en comparación con las hembras del grupo Baja progesterona. La tasa de fertilización fue significativamente mayor en las hembras tratadas con progesterona exógena, así como el número de embriones transferibles y proporción de embriones Grado 1. Además, la proporción de blastocistos fue mayor en el grupo de ovejas tratadas con progesterona, mientras que la proporción de mórulas y embriones degenerados no tuvo diferencias estadísticas entre grupos (Figura 6).

Tabla I. Respuesta ovárica y desarrollo embrionario después de un tratamiento de superovulación con FSH durante la primera onda folicular sobre bajas o altas concentraciones de progesterona en ovejas.

	Baja Progesterona (n= 33)	Alta Progesterona (n= 38)	Valor P
Concentraciones medias de Progesterona (ng/mL) *	1,44 ± 0,17	5,30 ± 0,4	<0,01
Respuesta de Donantes **	93,9% (31/33)	97,4% (37/38)	NS
Porcentaje de donantes con ≤ 2 CL	6,1% (2/33)	2,6 % (1/38)	NS
Porcentaje de donantes con CLRP	6,1% (2/33)	2,6% (1/38)	NS
Número de CL por donante	8,2 ± 0,7	9,7 ± 0,9	NS
Número de estructuras por donante	4,6 ± 0,9	6,6 ± 0,7	<0,05
Porcentaje de fertilizados /embriones colectados	83,3% (110/132)	93,3% (223/239)	<0,01
Número de embriones transferibles por donante	3,0 ± 0,7	5,4 ± 0,6	<0,05
Porcentaje de Grado 1/total de embriones	52,7% (58/110)	67,7% (151/223)	<0,01

\* Desde el Día 0 al 3 (FSH fue administrada desde Día 0 al Día 3,5).

\*\* Porcentaje de ovejas con más de dos cuerpos lúteos (CL).

CLRP: CL de regresión prematura.

Donantes con ≤ 2 CL o CLRP no fueron tenidos en cuenta para la evaluación de las otras variables.



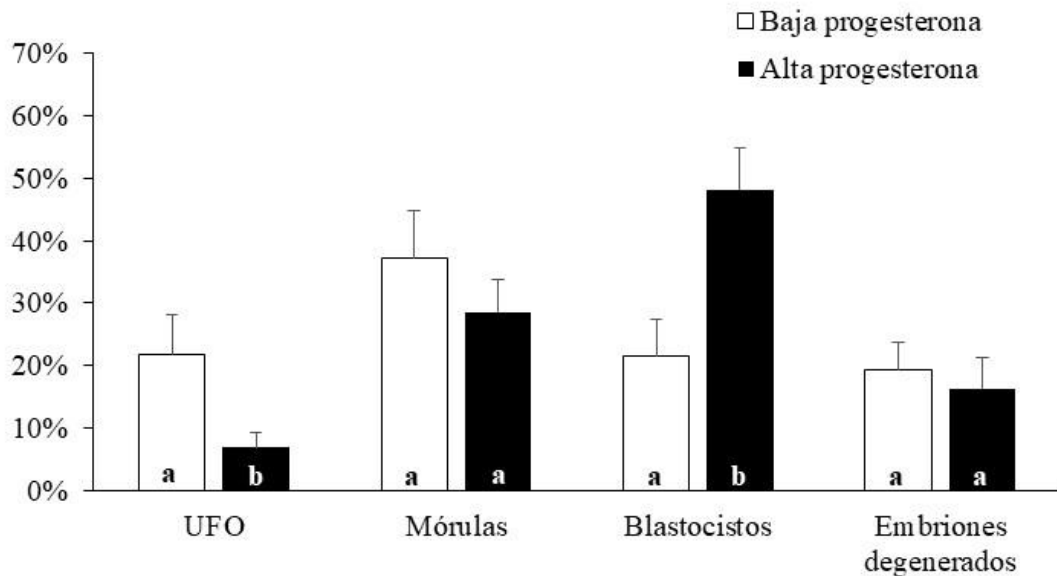


Figura 6. Medias de estructuras colectadas por donante al Día 6 luego de la inseminación en ovejas superovuladas con FSH sobre baja ( $n= 29$ ) o alta ( $n= 36$ ) concentración de progesterona durante la primera onda folicular. Para cada estadio embrionario a vs. b  $P < 0,05$ .

## 6.2 Experimento 2

### 6.2.1 Respuesta ovárica

El tratamiento con progesterona no afectó la población folicular de la onda 1. Además, la progesterona no tuvo efecto sobre el número de folículos aspirados y CCOs recuperados ( $P= NS$ ). En cuanto a la calidad de los CCOs colectados (CCOs 1+2), tampoco se encontró efecto del tratamiento con progesterona ( $P= NS$ ). Por otro lado, el tratamiento con una dosis única de 80 mg de FSH asociada a MAP-5 aumentó el número de folículos medianos y grandes ( $P < 0,05$ ) en comparación con las ovejas no tratadas con FSH. Esto implicó obtener el doble de los folículos aspirados, CCOs recuperados y CCOs Grado 1+2 ( $P < 0,05$ ). El tratamiento con progesterona y FSH no modificó la Tasa de recuperación (CCOs recuperados/folículos aspirados) ( $P= NS$ ).

Cuando los tratamientos fueron analizados como efecto individual se observó una interacción entre el tratamiento con progesterona y FSH, obteniendo mejores resultados sobre folículos aspirados y CCOs recuperados por donante ( $P < 0,05$ ) para el grupo Con progesterona y FSH. Estos resultados se observan en la Tabla II.

Tabla II. Respuesta ovárica y colección de CCOs por aspiración folicular luego del tratamiento de la Onda 1 con progesterona (P4) y/o 80 mg de FSH reconstruida en MAP-5.

	Folículos pequeños	Folículos medianos	Folículos grandes	Folículos totales	Folículos aspirados	CCOs recuperados	CCOs Grado 1+2
<b>Efecto principal</b>							
<b>P4</b>							
No P4 (n= 37)	1,5±0,2 <sup>a</sup>	4,8±0,6 <sup>a</sup>	1,5±0,3 <sup>a</sup>	7,8±0,7 <sup>a</sup>	5,2±0,5 <sup>a</sup>	2,7±0,3 <sup>a</sup>	1,5±0,3 <sup>a</sup>
Con P4 (n= 38)	1,7±0,3 <sup>a</sup>	4,6±0,7 <sup>a</sup>	1,4±0,3 <sup>a</sup>	7,7±0,9 <sup>a</sup>	5,7±0,7 <sup>a</sup>	3,4±0,6 <sup>a</sup>	2,0±0,3 <sup>a</sup>
<b>Efecto principal</b>							
<b>FSH</b>							
No FSH (n= 45)	1,6±0,3 <sup>a</sup>	3,7±0,5 <sup>a</sup>	1,0±0,1 <sup>a</sup>	6,4±0,7 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	2,0±0,3 <sup>a</sup>	1,3±0,2 <sup>a</sup>
Con FSH (n= 30)	1,6±0,3 <sup>a</sup>	6,2±0,8 <sup>b</sup>	2,1±0,5 <sup>b</sup>	9,9±0,8 <sup>b</sup>	7,6±0,8 <sup>b</sup>	4,6±0,6 <sup>b</sup>	2,3±0,4 <sup>b</sup>
<b>Efectos individuales</b>							
No FSH no P4 (n= 21)	1,6±0,4	4,2±0,9	1,2±0,2	7,0±1,0	4,2±0,7 <sup>a</sup>	2,1±0,3 <sup>a</sup>	1,2±0,2
No FSH con P4 (n= 24)	1,7±0,4	3,2±0,7	0,9±0,2	5,8±0,9	3,8±0,6 <sup>a</sup>	1,9±0,4 <sup>a</sup>	1,4±0,3
Con FSH no P4 (n= 16)	1,4±0,3	5,6±0,9	2,0±0,7	8,9±0,9	6,5±0,7 <sup>b</sup>	3,4±0,6 <sup>b</sup>	1,8±0,5
Con FSH y P4 (n= 14)	1,8±0,6	7,0±1,3	2,3±0,7	11,1±1,4	8,8±1,4 <sup>c</sup>	5,9±1,1 <sup>c</sup>	2,9±0,7
Interacción FSH*P4	NS	NS	NS	NS	P< 0,05	P< 0,05	NS

Folículos pequeños (< 3mm), medianos (3-5 mm) y grandes (> 5 mm) fueron contados y aspirados por laparoscopia (LOPU).

Para cada variable a vs. b P< 0,05.

CCOs: Complejo cumulus ovocito.

### 6.3 Experimento 3

#### 6.3.1 Respuesta ovárica

Como se observa en la Tabla III, el tratamiento con progesterona (DICO 0,3 g) no tuvo efecto sobre la población folicular de la Onda 1. En ambos grupos experimentales el número de CCOs recuperados por donante fue similar (3,7±0,3 vs. 4,4±0,4; Baja y Alta progesterona respectivamente, P= NS). Sin embargo, la proporción de CCOs Grado 1 (Excelentes) fue superior en las donantes del grupo Alta progesterona en comparación a las de Baja progesterona 25,4% (57/224) vs. 36,5% (95/260), P< 0,01. En cuanto a la Tasa de recuperación (CCOs recuperados/folículos aspirados) se puede observar una tendencia a favor del grupo Alta progesterona en comparación al grupo Baja

progesterona, indicando que esta hormona tendría un efecto positivo sobre colecta de los CCOs.

Tabla III. Respuesta ovárica y colecta de CCOs en ovejas que fueron superovuladas con 100 mg de FSH asociada a MAP-5 y tratadas con progesterona durante la Onda 1.

	Folículos pequeños	Folículos medianos	Folículos grandes	Folículos totales	Folículos aspirados	CCOs recuperados	CCOs Grado 1+2	CCOs /Folículos aspirados (%)
Baja progesterona (n= 61)	1,8±0,5	5,4±0,4	1,2±0,2	8,6±0,6	6,6±0,5	3,7±0,3	3,3±0,3	55,8±3,5
Alta progesterona (n= 59)	2,5±0,5	5,5±0,4	1,5±0,2	9,3±0,6	6,9±0,5	4,4±0,4	4,0±0,3	63,9±3,5
Valor P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,1

Folículos pequeños (< 3mm), medianos (3-5 mm) y grandes (> 5 mm) fueron contados y aspirados por laparoscopia (LOPU).

P4: Progesterona.

CCOs: Complejo cumulus ovocito.

### 6.3.2 Producción de embriones *in vitro*

Para PIV solamente se usaron los CCOs Grado 1 y 2 (n= 196 grupo Baja progesterona y n= 213 grupo Alta progesterona). Cuando estos CCOs fueron expuestos en un sistema de PIV, la tasa de clivaje a las 48 h luego de la fertilización *in vitro* (FIV) fue mayor en el grupo de ovocitos que provenían de donantes tratadas con progesterona (Alta progesterona) en comparación a los ovocitos del grupo Baja progesterona. En adición, luego de 6 y 8 días en cultivo *in vitro*, se observó mejor desarrollo embrionario en los ovocitos del grupo Alta progesterona (P< 0,05). La Tasa de eclosión (Blastocistos eclosionados al Día 8/embriones clivados) fue similar en ambos grupos (P= NS). Estos datos están presentados en la Tabla IV.

Con respecto al estadio embrionario a los 6 días de la fertilización, para Blastocistos se observó una tendencia a favor del grupo con progesterona alta (P= 0,08). No encontrándose diferencia estadística en los estadios de mórula y embriones degenerados (P= NS; Figura 7).

Tabla IV. Desarrollo *in vitro* de CCOs previamente expuestos a bajas y altas concentraciones de progesterona durante el desarrollo folicular. Colectados por LOPU luego de tres días de tratamiento con progesterona exógena (DICO 0,3 g).

	Número de CCOs en MIV	Tasa de clivaje (48 h post FIV)	Desarrollo embrionario (6 días post FIV)	Tasa de Blastocistos (8 días post FIV)	*Tasa de eclosión
Baja progesterona	196	69,9% (134/196)	30,6% (60/196)	28,1% (55/196)	17,9% (24/134)
Alta progesterona	213	80,3% (171/213)	40,4% (86/213)	38,5% (82/213)	21,6% (37/171)
Valor <i>P</i>		0,05	0,05	0,05	NS

CCOs: Complejo cumulus ovocito.

\*Blastocistos eclosionados al Día 8 sobre embriones clivados a las 48 h.

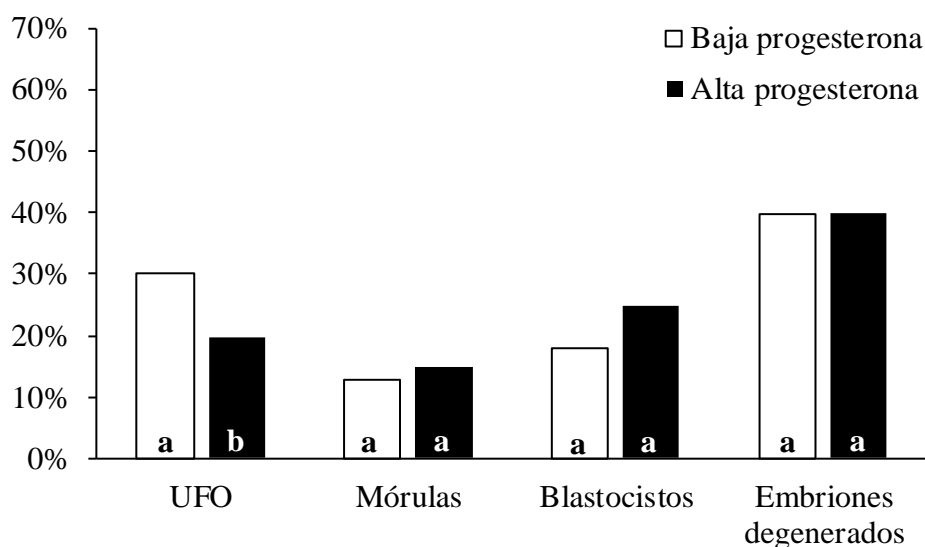


Figura 7. Proporción de embrionarios luego de 6 días de cultivo *in vitro* con ovocitos (CCOs) que se desarrollaron en baja ( $n= 196$ ) o alta ( $n= 213$ ) concentración de progesterona durante la primera onda folicular.

Para cada estadio a vs. b  $P < 0,05$ .

Para variable Blastocisto  $P = 0,08$ .

## 7. DISCUSIÓN

Con esta serie de experimentos se demostró que la inducción de altas concentraciones de progesterona durante la superovulación de la primera onda folicular mejora la producción de embriones ovinos. Esto fue debido al incremento en la tasa de fertilización y calidad de los embriones, reflejando una mejor competencia ovocitaria. Estos hallazgos evidencian que la progesterona juega un rol importante sobre la fertilidad, actuando durante el desarrollo de los folículos ovulatorios previo al proestro y estro.

Los resultados del Experimento 1 dejan claro el efecto positivo que ejercen los niveles de progesterona sobre el desarrollo temprano de embriones *in vivo*. Sin embargo, el diseño en este primer experimento no permite identificar la causa de este mecanismo. Debido a que las diferencias fueron evaluadas a los 6 días de la inseminación y durante este periodo los embriones se desarrollaron en el útero materno. Tal vez este mecanismo podría estar relacionado con la población folicular o calidad ovocitaria inducida por el tratamiento con progesterona, pero también podría vincularse al ambiente oviductal o transporte espermático afectado por esta hormona. El oviducto no es simplemente un órgano pasivo requerido para transportar el embrión al útero, proporciona activamente un microambiente sustentable para el embrión temprano (Rizos et al. 2016). Por lo tanto, las altas concentraciones de progesterona previo al proestro, estro y ovulación podrían mejorar el ambiente útero/oviducto y tener un rol positivo en el desarrollo temprano del embrión, además en el transporte espermático. En suma, si bien el Experimento 1 permitió identificar que existe un efecto de la progesterona sobre la producción de embriones, no fue posible identificar el mecanismo involucrado.

Por tal motivo, en los experimentos 2 y 3 se propuso aspirar los folículos previamente expuestos a bajas o altas concentraciones de progesterona con el objetivo de evaluar exclusivamente el efecto de la progesterona sobre el ovocito. Los resultados de estos dos experimentos demostraron que la progesterona no afecta la población folicular, pero sí mejora la competencia ovocitaria al incrementar la tasa de clivaje y el desarrollo de embriones en condiciones *in vitro*.

El mayor número de embriones transferibles (de mejor calidad) producido en las ovejas tratadas con progesterona está asociado a la mayor tasa de fertilización obtenida en ovocitos que se desarrollaron con alta concentración de progesterona. En los experimentos 1 y 3, se observó que la tasa de fertilización fue 10% superior en el grupo tratado con progesterona en comparación con las ovejas no tratadas. En el Experimento 3, al analizar la producción de embriones *in vitro* se puede observar que esta diferencia a favor del grupo con alta progesterona se sigue manteniendo, tanto en los embriones al Día 6 como el porcentaje de Blastocistos al Día 8.

El efecto de la progesterona sobre el desarrollo folicular y la fertilidad ha sido estudiado previamente en modelos que inducen folículos persistentes. Cuando la concentración de progesterona es baja por un extenso periodo, los pulsos de LH se ven incrementados y como consecuencia se produce la reanudación prematura de la meiosis y maduración de los ovocitos (Revah & Butler 1996; Johnson et al. 1996). Estos ovocitos que sufren una reanudación prematura de la meiosis y son fertilizados, tienen un retraso en el desarrollo del cigoto y alta incidencia de muerte embrionaria en los estadios de 2 a 16 células (Ahmad et al. 1995). Este mecanismo explica la asociación entre baja concentración de progesterona durante largos periodos, inducción de un folículo persistente y la baja fertilidad. Sin embargo, los tres experimentos descritos en la presente tesis evitan la formación de folículos persistentes al utilizar el modelo de la primera onda folicular. El periodo durante la primera onda se caracteriza por bajas concentraciones de progesterona ya que en este momento las hembras están en la fase luteal temprana y encontramos así una ventana en la que los folículos están expuestos a bajas concentraciones de progesterona. De esta manera, este modelo experimental elimina la presencia de folículos persistentes como factor de confusión, ya que la ovulación del folículo de la onda previa asegura la emergencia de una nueva onda. De esta forma nos permite contrastar folículos jóvenes en crecimiento sometidos a bajas vs. altas concentraciones de progesterona durante un corto periodo de tiempo (tres días luego de la emergencia folicular). Esta tesis demuestra que la población folicular no es afectada por la progesterona, pero la calidad ovocitaria es significativamente mejor. En el Experimento 3 el mayor porcentaje de CCOs Grado 1 provenían de las ovejas que habían sido tratadas con progesterona (25,4% vs. 36,5%; baja y alta progesterona respectivamente;  $P < 0,01$ ). Además, en el grupo tratado con progesterona la tasa de clivaje o fertilización y el desarrollo embrionario temprano fue mayor que en el grupo control. Esto determina que esta mejora se debe a una mayor competencia ovocitaria.

Aunque algunos estudios previos han investigado la relación entre la progesterona, el crecimiento folicular y su influencia sobre la fertilidad en bovinos, el mecanismo de acción que se demuestra en esta tesis aún no se había establecido. En reportes previos utilizando bovinos de leche Rivera et al. (2011) demostraron que la progesterona alta durante la superovulación aumenta la calidad de los embriones colectados 7 días después del estro. Resultados similares en bovinos de carne reportaron Nasser et al. (2011) en el cual se colectó embriones 7 días después de la inseminación o se evaluó la morfología de los CCOs 12 h después de administrar LH. Estos resultados muestran que la progesterona alta incrementa la producción de embriones y sugieren una mejor morfología de los CCOs (sin comparar la competencia de los ovocitos para desarrollar embriones viables). Además, Denicol et al. (2012) reportaron que induciendo la ovulación del folículo dominante de la primera onda y suplementando con dos dispositivos intravaginales de progesterona, obtuvieron similar tasa de preñez que aquellos animales que ovularon un folículo dominante de la segunda onda folicular. Todos estos reportes sostienen la idea de que la progesterona durante el crecimiento folicular juega un rol relevante sobre la fertilidad, principalmente sobre la producción

embrionaria y tasa de preñez. Sin embargo, debido a que la mayoría de los estudios informan la producción de embriones 7 días después de la inseminación o la tasa de preñez a los 30 días de la inseminación, no existe evidencia clara para diferenciar si la ruta de la progesterona a la fertilidad está relacionada con la población folicular, la competencia ovocitaria, el transporte de espermatozoides o el oviducto.

Los resultados de la tesis revelan información novedosa y demuestran inequívocamente que este efecto de la progesterona es mediado por una mejora de la competencia de los ovocitos para convertirse en embriones viables. Este estudio también tiene implicancias prácticas en la aplicación de protocolos para MOET e IATF en rumiantes. Los programas de MOET con FSH basados en la superovulación de la primera onda folicular evitan el efecto negativo de la dominancia folicular mejorando la respuesta ovárica en ovejas y cabras (revisado por Menchaca et al. 2010). Esta tesis muestra que la respuesta puede ser mejor cuando se agrega un dispositivo intravaginal con progesterona durante el desarrollo de los folículos preovulatorios. También se ha propuesto sincronizar la onda 1 en protocolos de IATF en ovejas (Menchaca y Rubianes, 2004). Para esto se ha planteado sincronizar la primera onda usando dos dosis de PF2 $\alpha$  separadas por 7 días (protocolo Synchrovine) (Menchaca et al. 2004). A pesar de que este protocolo alcanza la ovulación de la onda 1 en más del 90% de las ovejas en un corto periodo de tiempo (Menchaca et al. 2004; Vilariño et al. 2017), la tasa de preñez generalmente es menor al 50%. Antes de conocer la información presentada en esta tesis, no se sabía cuál era la razón de la baja tasa de preñez en este protocolo basado en PF2 $\alpha$  (Menchaca y Rubianes, 2004, Menchaca et al. 2004; Olivera-Muzante et al. 2011a, 2011b, 2013; Contreras-Solis et al. 2009; Fierro et al. 2013). A partir de los resultados de esta tesis, se puede sugerir que la baja tasa de preñez obtenida con la ovulación de la primera onda folicular en el protocolo Synchrovine está asociada a las bajas concentraciones de progesterona durante la fase luteal temprana antes de la ovulación, es decir durante los tres días desde el reclutamiento hasta la luteolisis.

Además, como información complementaria, se demostró por primera vez en ovejas que la administración de una simple dosis de FSH reconstruida en ácido hialurónico como solvente de liberación lenta (MAP-5) es efectivo para la estimulación ovárica antes de la aspiración folicular, mejorando el número de CCOs recuperados para producción de embriones *in vitro*. La posibilidad de extender la vida media y actividad biológica de la FSH es muy importante en la estimulación ovárica para la producción de embriones en ganadería. En pequeños rumiantes, la estimulación ovárica previa a la aspiración folicular usualmente consiste en una dosis de FSH en solvente acuoso asociada con una dosis única de eCG 36-48 h antes de la LOPU, lo que se realiza al final de un tratamiento de progesterona administrada durante 9 a 11 días (Baldassarre et al. 2007). Esta preparación de liberación lenta utilizada en la tesis puede ser una alternativa en aquellas situaciones o países donde la eCG no está disponible. En este trabajo se encontró que administrar 80 mg de FSH en MAP-5 aumenta el doble la cantidad de folículos aspirados y CCOs recuperados por donante. A su vez, este es el

primer reporte que utiliza la estimulación y aspiración de la primera onda folicular para la producción de embriones ovinos *in vitro*. Los protocolos que actualmente se utilizan para LOPU en ovejas y cabras no están diseñados para controlar la dinámica folicular (Menchaca et al. 2016). La aspiración de un conjunto de folículos homogéneos luego de la emergencia de la onda folicular podría ser más adecuada.

## **8. CONCLUSIONES**

Los resultados demuestran que la progesterona juega un rol importante durante la fase de crecimiento folicular mejorando la competencia ovocitaria y posterior desarrollo de embriones producidos *in vivo* o *in vitro*. El aumento de las concentraciones de progesterona en un periodo de tiempo corto (3 días) durante el desarrollo de los folículos de la onda 1, incrementa la tasa de fertilización, la calidad y el número de los embriones. A su vez, la población folicular no se vio afectada por el tratamiento con progesterona exógena.

La administración de una dosis única de FSH reconstruida en MAP-5 aumenta la respuesta folicular y recuperación ovocitaria en protocolos para aspiración folicular. En aquellos protocolos de superovulación de la primera onda folicular (Protocolo Día 0) se recomienda la administración de un dispositivo de progesterona durante el tratamiento con FSH.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams GP, Nasser LF, Bo GA, García A, Del Campo MR and Mapletoft RJ. (1994). Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42: 1103-1113.
2. Adams GP. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fert.* 54:17-32.
3. Ahmad N, Schrick NF, Butcher RL, and Inskeep EK. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52 (5): 1129-1135.
4. Baldassarre H, Rao KM, Neveu N, Brochu E, Begin I, Behboodi E, Hockley DK. (2007). Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 612-616.
5. Baldassarre H. (2012). Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production and cloning programs in sheep and goats. *Anim. Reprod.* 9: 188-194.
6. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 113: 275-285.
7. Cerri RLA, Chebel R, Rivera CF, Narciso CDL, Oliveira RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Oliveira LJ, Thatcher WW, and Santos JEP. (2011). Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 94: 3352-3365.
8. Contreras-Solis I, Vásquez B, Díaz T, Letelier C, López-Sebastian A, González-Bulnes A. (2009). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 71: 1018-1025.
9. de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. (1999). Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the preovulatory interval in goats. *Theriogenology* 52: 399-411.
10. Denicol AC, Lopes GJr, Mendonc LG, Rivera FA, Guagnini F, Perez RV, Lima R, Bruno RG, Santos JE, Chebel RC. (2012). Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 1794-1806.

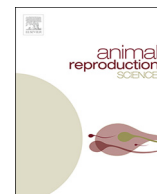
11. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
12. Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
13. Evans ACO, Duffy P, Quinn KM, Knight PG, Boland MP. (2001). Follicular waves are associated with transient fluctuations in FSH but not estradiol or inhibin-A concentrations in anoestrous ewes. *Anim. Sci.* 72: 547-554.
14. Evans ACO, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP. (2002). Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin. A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123: 59-66.
15. Evans ACO. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 289-306.
16. Fair T & Lonergan P. (2012). The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (Suppl. 4): 142-147.
17. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79: 399-408.
18. Fonseca FA, Britt JH, Mc Daniel BT, Wilk JC, Rakes AH. (1983). Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 66: 1128-1147.
19. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41: 247-254.
20. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43: 689-703.
21. González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, García-García RM, del Campo A, Gómez-Brunet A, López-Sebastian A. (2001). Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 65: 265-272.
22. Inskeep EK. (2004). Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82: 24-39.

23. Johnson SK, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE. (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Dom. Anim. Endocrin.* 13: 69-79.
24. Meikle A, Tasende C, Garófalo EG, Forsberg M. (1998). Priming effect of exogenous estradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 75-85.
25. Menchaca M, Pinczak A, Rubianes E. (2002). Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 post ovulation in goats. *Theriogenology* 58: 1713-1721.
26. Menchaca A & Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 403-413.
27. Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. (2004). Prostaglandin F2a treatment associated with timed Artificial insemination in ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 39: 352-55.
28. Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E. (2007). Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 68: 1111-1117.
29. Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM. (2009). Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72: 477-483.
30. Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, de Castro T, and Rubianes E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 113-18.
31. Menchaca A, Barrera N, dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Crispo M. (2016). Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats, *Anim. Reprod.* 13: 273-278.
32. Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. (2011). Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327.
33. Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. (2011a). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75: 1232-38.

34. Olivera-Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E. (2011b). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76:1501-07.
35. Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C, Fierro S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36h following a prostaglandin F2alpha-based protocol for timed AI in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 138: 175-179.
36. Palomino JM, Cervantes MP, McCorkell RB, Mapletoft RJ and Adams GP. (2016). Superovulation in wood bison (*Bison bison athabasca*): Effects of progesterone, treatment protocol and gonadotropin preparations for the induction of ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 167: 31-39.
37. Palomino JM, Cervantes MP, Woodbury MR, Mapletoft RJ and Adams GP. (2017). Effects of eCG and progesterone on superovulation and embryo production in wood bison (*Bison bison athabasca*). *Anim. Reprod. Sci.* 181: 41-49.
38. Parrish J. Susko-Parrish JL. Leibfried-Rutledge ML. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591–600.
39. Pinczak A, Menchaca A, Rubianes E. (2001). Seguimiento ultrasonográfico ovárico y uterino durante la gestación temprana de la cabra (Ovarian and uterine scanning during the early pregnancy in goats). En: Proceedings of the IV International Symposium on Animal Reproduction. Córdoba, Argentina, p. 298 (abstract).
40. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. (1994). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 101: 501-509.
41. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 259-270.
42. Rawlings NC. & Bartlewski PM. (2006) Clinical Reproductive Physiology of Ewes. En: Youngquist RS & Threlfall WR (2006) Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Ed. Saunders 2<sup>a</sup> ed. USA, pp 642-64.
43. Revah I, & Butler WR. (1996). Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106: 39-47.
44. Rivera FA, Mendonça LG, Lopes, GJr, Santos EP, Pérez RV, Amstalden M, Correa-Calderón A, Chebel RC. (2011). Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141: 333-342.
45. Rizos D, Maillol V, Lonergan P. (2016). Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Anim. Reprod.* 13: 160-67.

46. Rubianes E, Ibarra D, Ungerfeld R, Carbajal B, de Castro T. (1995). Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology* 43: 465-72.
47. Rubianes E, de Castro T, Carbajal B. (1996). Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 473-475.
48. Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP, (1997). Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47:1479-1488.
49. Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003). Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Anim. Reprod. Sci.*78: 47-55.
50. Seekallu V, Barrett MW, Toosi M, Clarke K, Ewen A, Duggavathi R, Davies L, Pattullo KM, Bagu ET, Rawlings NC. (2010a). Pulsatile LH secretion and ovarian follicular wave emergence and growth in anestrous ewes. *Theriogenology* 74; 912-921.
51. Scaramuzzi RJ, Baird BMDT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 23: 444-467.
52. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (1996). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J. Reprod. Fertil.* 108: 101-106.
53. Stringfellow DA & Givens MD. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society*, fourth ed., IETS, Savoy, IL.
54. Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletofy RJ, Bó G. (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* 129: 7-13.
- Tríbulo A, Rogan D, Tríbulo H, Tríbulo R, Mapletofy RJ, Bó G. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77; 1679-1685.
55. Veiga-López A, González-Bulnes A, García-García RM, Domínguez V, Cocero, MJ. (2005). The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 63: 1973-1983.

56. Vilariño M, Rubianes E, Van Lier E, Menchaca A. (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO) in sheep. *Small. Rum. Res.* 91: 219-224.
57. Vilariño M, Crispo M, dos Santos Neto PC, Wijma R, Menchaca A. (2012). The effect of culture medium changes on *in vitro* production of sheep embryos, *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 1806. [Abstract].
58. Vilariño M, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, García-Pintos C, Menchaca A. (2017). Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology* 90: 163-68.
59. Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. (2011). Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod. Fertil. and Dev.* 24: 238-243.
60. Wiltbank MC, Souza HA, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG. (2014). Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal* 8: 70-81.



## Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep

F. Cuadro<sup>a,b</sup>, P.C. dos Santos-Neto<sup>a,b</sup>, A. Pinczak<sup>a</sup>, N. Barrera<sup>a</sup>, M. Crispo<sup>b,c</sup>,  
A. Menchaca<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Camino Cruz del Sur 2350, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Programa de Posgrado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Av. Lasplacas, 1550, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo, 2020, Montevideo, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Ovary  
Corpus luteum  
MOETS  
Superovulation  
Oocyte

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of serum progesterone concentrations during the superstimulatory treatment of the first follicular wave on fertilization rate and embryo development in sheep. A total of 71 Merino ewes received a superstimulatory FSH treatment during Wave 1 of ovarian follicular development (Day 0 Protocol), which was administered under low progesterone concentrations typical of the early luteal phase (control group,  $n = 33$ ) or under high progesterone concentrations induced by the administration of an intravaginal device from Day 0 to Day 3 containing 0.3 g progesterone ( $n = 38$ ). Intrauterine insemination after FSH superstimulation was followed by uterine flushing 6 days later. Serum progesterone concentrations from Day 0 to 3 were greater in those ewes treated with progesterone ( $P < 0.05$ ), while serum estradiol-17 $\beta$  concentrations were not affected by the treatment. Although the mean number of corpora lutea per donor was not affected by the progesterone treatment, the number of collected ova and embryos was greater in progesterone treated than untreated ewes ( $6.6 \pm 0.7$  compared with  $4.6 \pm 0.9$ , respectively;  $P < 0.05$ ). Furthermore, progesterone treatment increased fertilization rate (93.3% compared with 83.3%;  $P < 0.05$ ) and the proportion of Grade 1 embryos (67.7% compared with 52.7%;  $P < 0.05$ ) compared with the control group. In conclusion, oocyte fertilization rate and embryo quality are improved by high progesterone concentrations during FSH superstimulation, which suggests an important role of progesterone during preovulatory follicular development.

### 1. Introduction

Large follicles at the beginning of the FSH administration in a superstimulatory treatment influences the ovarian response and embryo yield in sheep (Rubianes et al., 1995), goats (Menchaca et al., 2002) and cattle (Bó et al., 1995). In small ruminants, the Day 0 protocol (or first wave protocol) consists of an ovarian follicle superstimulatory treatment that initiates the FSH administration soon after ovulation (Day 0 of the ovulatory cycle) to avoid the presence of a dominant follicle (Menchaca et al., 2002). When compared with traditional protocols, this strategy improved the number of corpora lutea (CL) and the embryos yield both in goats (Menchaca et al., 2007) and sheep (Menchaca et al., 2009). The success of superstimulation of the first follicular wave during the estrous cycle

\* Corresponding author at: Programa de Posgrado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Av. Lasplacas, 1550, Montevideo, Uruguay at Fundacion IRAUy, Cno. Cruz del Sur 2350, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: [menchaca.alejo@gmail.com](mailto:menchaca.alejo@gmail.com) (A. Menchaca).

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.011>

Received 25 June 2018; Received in revised form 23 July 2018; Accepted 8 August 2018

Available online 09 August 2018

0378-4320/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



has been reported by different laboratories in sheep and goats (Taşdemir et al., 2011; Mogase et al., 2016; Balaro et al., 2016).

Although this strategy improves embryo production due to the control of follicular dynamics, the superstimulation of the first follicular wave occurs under the typical low endogenous progesterone concentrations of the early luteal phase (e.g., < 2 ng/mL). There is evidence that high serum progesterone concentrations during preovulatory follicular development enhance fertility. In cows, when there was ovulation from the largest follicle of the second follicular wave (that grows under higher progesterone concentrations than the first follicular wave) resulted in a greater pregnancy rate (Denicol et al., 2012). Furthermore, in cows that were superovulated when there were high progesterone concentrations, yield of embryos was greater than cows superovulated when there were low progesterone concentrations (Rivera et al., 2011; Nasser et al., 2011). Thus, it is proposed that the superovulatory response of wave 1 may be enhanced if the FSH treatment is administered associated with progesterone supplementation. To our knowledge, previous to this study no information about the effect of progesterone concentrations during preovulatory follicular development was available in sheep, particularly during the first wave of ovarian follicular development of an estrous cycle. Preliminary results of this experiment were published in previous Congresses (Cuadro et al., 2014, 2016).

The objective of this study was to evaluate the effect of low or high serum progesterone concentrations during the superstimulation of the first wave of follicular development on ovarian response, fertilization rate and embryo quality in sheep.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and treatments

A total of 71 multiparous Australian Merino sheep with a mean body condition score of  $3.6 \pm 0.4$  (scale: 0 emaciated; 5 obese) were used during breeding season (May to June, 35 °S) at Fundacion IRAUy (Montevideo, Uruguay). All the procedures were conducted with the approval of the Internal Animal Care Committee of Fundacion IRAUy and certified by the National Council of Animal Care of Uruguay.

Before the superstimulation during the first wave of ovarian follicular development, the timing of ovulation was synchronized using a short-term protocol consisting of an intravaginal sponge treatment (60 mg medroxyprogesterone acetate, Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 6 d associated with 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG, Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and one dose of prostaglandin (PG) F<sub>2</sub>α (125 µg of sodium cloprostenol, Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) given i.m. at time of sponge removal, followed by one dose of 8 µg GnRH analog (Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina) given i.m. 36 h later. Previous reports using this treatment for synchronization showed that approximately 90% of the females having ovulations within 72 h from intravaginal device removal (Menchaca et al., 2007; Vilariño et al., 2010, 2013).

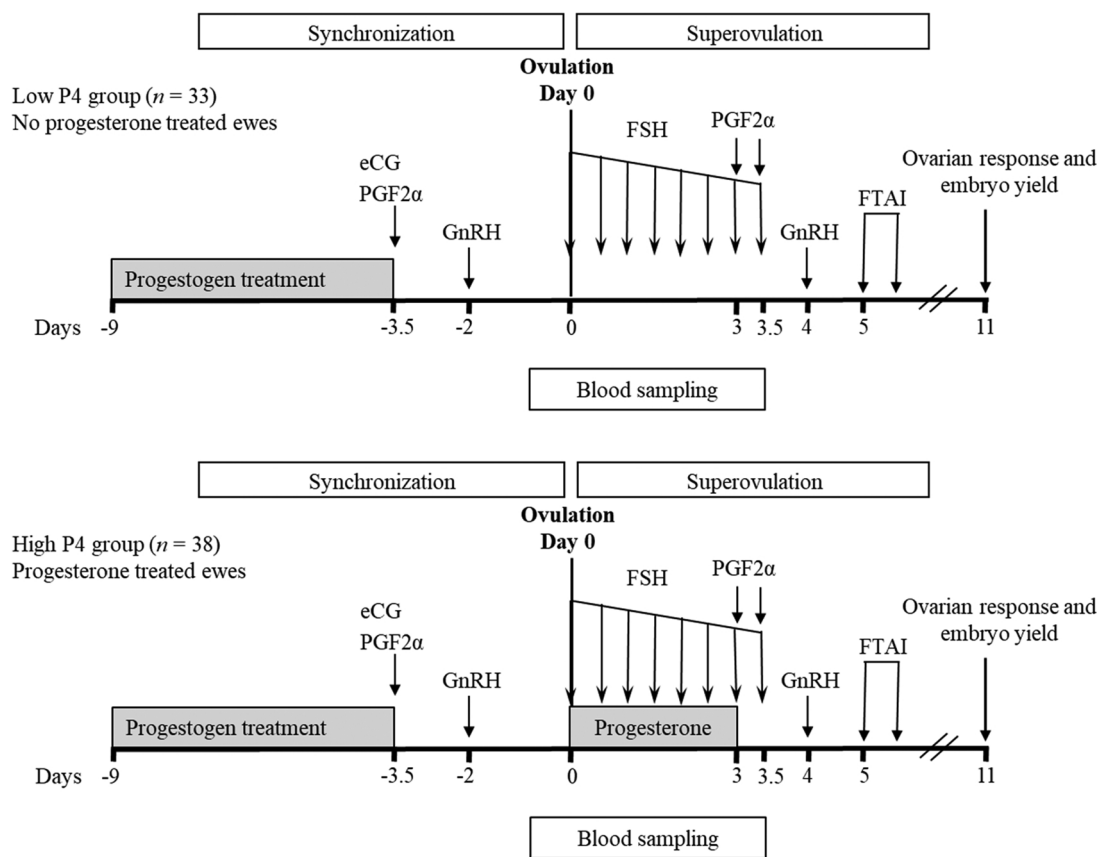
After the estrous synchronization protocol, the superstimulatory treatment during the first follicular wave began 84 h after sponge removal (i.e., soon after ovulation) and consisted of the administration of 240 mg of FSH (Folltropin, Vetoquinol S.A., Lure, France) divided in eight decreasing doses given twice daily (50, 50, 36, 36, 24, 24, 10, 10 mg). The ewes received the FSH treatment under low progesterone concentrations (i.e., physiological concentrations of the early luteal phase; low P4 group,  $n = 33$ ), or under exogenous progesterone administration (high P4 group,  $n = 38$ ). The experimental group with high progesterone concentrations received a CIDR-type intravaginal device previously described for sheep (Vilariño et al., 2010) containing 0.3 g progesterone (DICO, Syntex, Buenos Aires, Argentina), during 3 days from the 1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> dose of FSH (Fig. 1). Both experimental groups received two half-doses of PGF<sub>2</sub>α (62.5 µg sodium cloprostenol) given together with the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> FSH doses. One dose of GnRH analog (8.4 µg of busserelin acetate im; Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina) was administrated 12 h after the 8<sup>th</sup> dose of FSH (i.e., on Day 4, 24 h after the first PG dose or DICO removal) to synchronize the timing of the preovulatory LH peak and the ovulation according to Rubianes and Menchaca, 2003. Intrauterine insemination was performed by laparoscopy at 16 and 24 h after GnRH administration using fresh semen ( $100 \times 10^6$  sperm cells per each insemination dose) with the females maintained under sedation (4.0 mg of acepromazine maleate, i.m., Acedan, Holliday-Scott, Buenos Aires, Argentina).

### 2.2. Ovarian response and embryo yield

The ovarian response was determined by laparoscopy 6 days after insemination and embryo recovery was performed in responding females (i.e., ewes with more than two CL). Uterine flushing was not attempted in those ewes with two or less CL or with early regressed CL. Embryo recovery was performed under general anesthesia induced with diazepam (5.0 mg total dose of Unizepan; Unimedical, Montevideo, Uruguay) and ketamine (100 mg total dose of Vetanarcol; König, Buenos Aires, Argentina) by i.v. via, and was maintained under isoflurane gas (Isoforine; Cristália, São Paulo, Brazil) in oxygen mixture administrated by inhalation route.

The ova/embryos were collected surgically by a paramedian incision (5 cm long) cranial to the udder to access the reproductive tract. Each uterine horn was flushed with 35 mL of flushing media (BoviFlush, Minitube, Tiefenbach, Germany) using an 18-gauge i.v. catheter inserted next to the utero-tubal junction and the embryos were recovered in a 90 mm Petri dish using a 9 F Foley catheter inserted at the external bifurcation of the uterine horns. The ova/embryos were evaluated under stereoscopic microscope and classified according to the International Embryo Transfer Society recommendations (Stringfellow and Givens, 2010). The quality score of the embryos was Grade 1 (excellent or good), Grade 2 (fair), Grade 3 (poor), and Grade 4 (dead or degenerated). Grade 1–3 embryos were considered transferable, and Grade 1 embryos were considered suitable for cryopreservation.





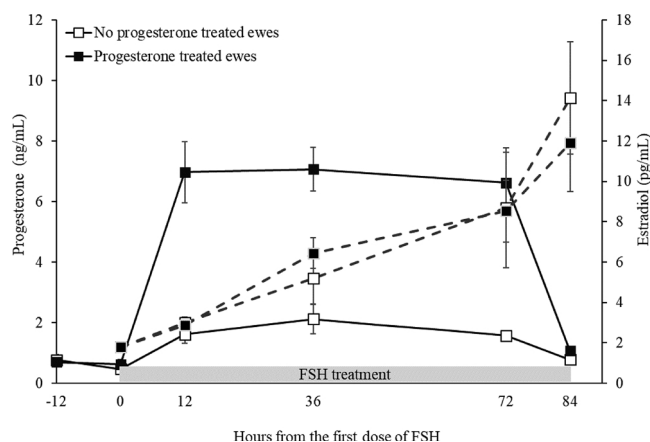
**Fig. 1.** Experimental design to study the superstimulation of the first wave of ovarian follicular development (Day 0 protocol) exposed to low or high progesterone concentrations (upper and bottom panel, respectively). Day 0 was defined at 84 h after device removal of the pre-synchronization treatment (7 PM in this experimental design, approximately at time of ovulation; [Menchaca et al., 2009](#)). Exogenous progesterone was administered during 3 days from Day 0 by using an intravaginal device (DICO, 0.3 g progesterone), indicated in the bottom panel by the gray bar.

### 2.3. Blood sampling and hormone assays

Blood sampling was performed twice a day from Day -1 to Day 4 from the jugular vein and collected into 10 mL tubes to determine serum progesterone and estradiol concentrations. The samples were centrifuged at 3000 RPM for 20 min and the serum was isolated and immediately stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed in the Laboratory of Nuclear Techniques, *Facultad de Veterinaria*, Montevideo, Uruguay. Progesterone concentrations were determined by a direct solid-phase radioimmunoassay (RIA) using a Siemens Healthcare Diagnostics kit (Los Angeles, CA, USA). The samples were analyzed in a unique assay with a sensitivity of 0.09 ng/mL and an intra-assay coefficient of variation of 7.7%, 6.8% and 7.1% for low (0.5 ng/mL), medium (2.4 ng/mL) and high (8.0 ng/mL) quality controls, respectively. Estradiol 17- $\beta$  concentrations were determined after ether extraction by a double antibody RIA liquid phase (Siemens Healthcare Diagnostics kit, Los Angeles, CA, USA) as described previously ([Meikle et al., 1998](#)). This RIA had a sensitivity of 1.8 pg/mL, and the intra-assay coefficients of variation were 6.8% and 6.5% for control 1 (15.1 pg/mL) and control 2 (23.2 pg/mL), respectively.

### 2.4. Statistical analysis

The mean  $\pm$  SEM number of corpora lutea and the embryo yield per donor were analyzed by the nonparametric Kruskal–Wallis test, while serum progesterone and estradiol-17 $\beta$  concentrations were analyzed by ANOVA; both analysis were performed using mixed models of Infostat software ([Di Rienzo et al., 2014](#)). Data as percentages were analyzed with generalized linear mixed models (GLMMs). The statistical models included the effect of the treatment (low or high P4) as fixed effect and also the effect of the day and the interaction was considered for hormonal determinations, and the female was included as random effect. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .



**Fig. 2.** Mean ( $\pm$  SEM) serum progesterone concentrations (continuous line) and estradiol-17 $\beta$  concentrations (dotted line) during the superstimulatory treatment of the first follicular wave in ewes that received ( $n = 38$ ) or did not receive ( $n = 33$ ) an intravaginal device with progesterone (DICO, 0.3 g) during 72 h. The gray bar represents the FSH treatment for both experimental groups, which consisted of 240 mg of pFSH in eight total doses given twice daily. Differences between experimental groups were found for progesterone concentrations ( $P < 0.05$ ) and not for estradiol-17 $\beta$  concentrations.

### 3. Results

#### 3.1. Serum progesterone and estradiol concentrations

Serum progesterone concentrations were affected by the treatment and the day ( $P < 0.05$ ; Fig. 2). The mean progesterone concentrations during the treatment (i.e., from Day 0 to Day 3) were greater in progesterone treated than in untreated ewes ( $5.30 \pm 0.4$  and  $1.44 \pm 0.17$  ng/mL, respectively;  $P < 0.05$ ). Progesterone concentrations decreased after device removal and no differences with untreated ewes were detected 12 h after device removal ( $1.1 \pm 0.1$  and  $0.8 \pm 0.1$  ng/mL, respectively;  $P = \text{NS}$ ).

Serum estradiol-17 $\beta$  concentrations were not affected by the progesterone treatment and were affected by the sampling day, without interaction between both factors. The estradiol concentrations increased during FSH treatment and the greatest concentrations were reached at the time of the last FSH dose administration ( $14.1 \pm 2.7$  and  $11.9 \pm 2.4$  pg/mL for low and high P4 groups, respectively;  $P = \text{NS}$ ).

#### 3.2. Ovarian response and embryo yield

The proportion of responding females was similar among ewes treated or not with exogenous progesterone ( $P = \text{NS}$ ). The results are shown in Table 1. Although the mean number of CL per donor was not affected by the progesterone treatment, the number of collected ova and embryos was greater in the progesterone treated group ( $P < 0.05$ ). Fertilization rate was greater in those females treated with progesterone, as well as the number of transferable embryos and the proportion of Grade 1 embryos ( $P < 0.05$ ). In addition, the proportion of blastocysts was greater in progesterone treated females ( $P < 0.05$ ), while the proportion of morula and degenerated embryos did not reach significant differences (Fig. 3).

**Table 1**

Ovarian response and embryo yield after FSH superstimulatory treatment administered during the first follicular wave under low or high serum progesterone concentrations in sheep.

	No progesterone treated ewes ( $n = 33$ )	Progesterone treated ewes ( $n = 38$ )	$P$ value
Mean progesterone concentrations (ng/mL)*	$1.44 \pm 0.17$	$5.30 \pm 0.4$	$< 0.01$
Responding donors**	93.9% (31/33)	97.4% (37/38)	NS
Number of CL per donor	$8.2 \pm 0.7$	$9.7 \pm 0.9$	NS
Number ova and embryos per donor	$4.6 \pm 0.9$	$6.6 \pm 0.7$	$< 0.05$
Percentage of fertilized/recovered embryos	83.3% (110/132)	93.3% (223/239)	$< 0.01$
Number of transferable embryos per donor	$3.0 \pm 0.7$	$5.4 \pm 0.6$	$< 0.05$
Percentage of Grade 1/total embryos	52.7% (58/110)	67.7% (151/223)	$< 0.01$

\* Progesterone concentrations from Day 0 to Day 3 (FSH was given from Day 0 to Day 3.5).

\*\* Percentage of donors with more than two corpora lutea (CL). Only these females were considered for the evaluation of the variables showed below.

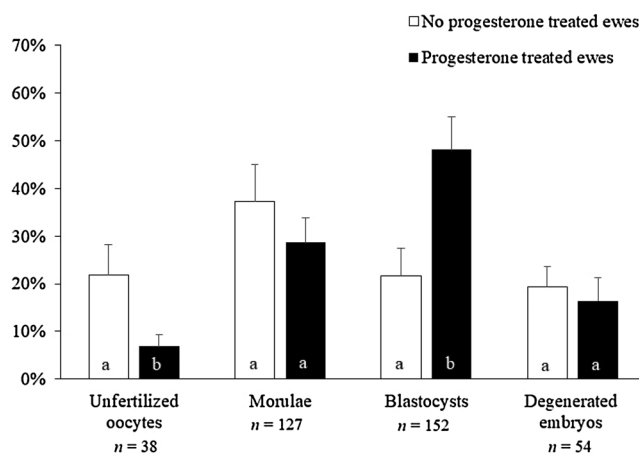


Fig. 3. Mean ( $\pm$  SEM) of the proportion of ova/embryos collected per donor 6 days after insemination in FSH superstimulated ewes under low ( $n = 29$ ) or high ( $n = 36$ ) serum progesterone concentrations during the first follicular wave (i.e., no progesterone or progesterone treated ewes, respectively). For each embryo stage, a compared with b  $P < 0.05$ .

#### 4. Discussion

This study demonstrates that the induction of high progesterone concentrations during the superstimulation of the first follicular wave improves the embryo yield, mainly by increasing the fertilization rate and the embryo quality.

In the current experiment we studied the effect of progesterone on oocyte fertility and embryo development by using the first follicular wave model. This experimental model allows to contrast young follicles in growing phase subjected to high versus low progesterone concentrations during a short period (i.e., during 3 days after follicular emergence). Interestingly, the ability to produce excellent quality embryos obtained from new follicles recruited in the first follicular wave was improved by the induction of high progesterone concentrations. The greater number of transferable embryos obtained in these treated ewes, may be explained by the greater fertilization rate reached in these females. We suggest that progesterone concentrations during preovulatory follicular development, previous to proestrus and estrus, have a relevant role on oocyte competence.

The contribution of this study also involves some practical implications for ovarian manipulation in MOET (multiple ovulation and embryo transfer) and FTAI (fixed time artificial insemination) programs in ruminants. After the first studies demonstrating that follicular development occurs in a wave like pattern in cattle (Sirois and Fortune, 1988; Savio et al., 1988; Pierson and Ginther, 1988), goats (Ginther and Kot, 1994; de Castro et al., 1999; Gonzalez de Bulnes et al., 1999) and sheep (Ginther et al., 1995), different approaches has been developed for the control of follicular dynamics in ruminants. For MOET programs, the FSH treatments based in the superstimulation of the first follicular wave avoid the negative effect of follicular dominance improving the ovarian response in sheep and goats (reviewed by Menchaca et al., 2010). The results of the current study indicate this response may be even more refined when an intravaginal device containing progesterone (i.e., a CIDR-type device) is added during the preovulatory follicular development. Because this information was published as preliminary data in 2014 (Cuadro et al., 2014, 2016), in the last years there has been addition of a CIDR-type device to the protocol during the FSH administration in commercial operations in MOET programs.

Manipulation of the first follicular wave have been proposed also to improve estrous synchronization protocols for FTAI in sheep (Menchaca and Rubianes, 2004). One alternative to the traditional progesterone-based treatments was the synchronization of the Wave 1 of the estrous cycle by using two doses of PGF2 $\alpha$  given 7 days apart (i.e., Synchrovine protocol) (Menchaca et al., 2004). Although this protocol allows for synchronization of the time of ovulation of  $\sim 90\%$  of treated ewes in a short period of time (Menchaca et al., 2004; Vilariño et al., 2017), pregnancy rate is usually less than 50%. Before knowing the information of the current study (Cuadro et al., 2014, 2016), the reason for the low pregnancy rate obtained with this prostaglandin-based protocol was not completely understood (Menchaca et al., 2004; Contreras-Solis et al., 2009; Olivera-Muzante et al., 2011a, 2011b, 2013; Fierro et al., 2013; Vilariño et al., 2017). We suggest that the lesser pregnancy rate obtained as a result of ovulations from follicles that develop during Wave 1 of the estrous cycle may be associated with the lesser progesterone concentrations during the early luteal phase before ovulation, i.e., during three days from follicular recruitment to luteolysis. Thus, the present study provides novel information about the role of progesterone during preovulatory follicular development, which deserves further investigation with practical implications for FTAI programs in ruminants.

#### 5. Conclusion

The current study demonstrates that high progesterone concentrations induced during the development of the preovulatory follicles in a FSH superstimulatory treatment, improves the fertilization rate and embryo quality. As a practical implication, for the superstimulation of the first follicular wave (e.g., Day 0 protocol) it is recommended that a CIDR-type device be added to the protocol

during the FSH administration.

### Conflict of interest

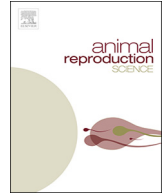
There are no known conflicts of interest

### Acknowledgments

The authors thank Hernán Arcaus, Diego Juanena and Rodrigo Perera for the technical assistance during the experiment, Richard Núñez for criticism in the preparation of the manuscript, and Syntex Uruguaya for providing the hormonal drugs. This study was financially supported by ANII. AM, MC and PCdS are fellows of SNI (ANII) and PEDECIBA.

### References

- Baloro, M.F., Fonseca, J.F., Barbosa, T.G., Souza-Fabjan, J.M.G., Figueira, L.M., Teixeira, T.A., Carvalheira, L.R., Brandão, F.Z., 2016. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular 24 emergence before the superovulatory Day 0 protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 54, 10–14.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31–40.
- Contreras-Solis, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2009. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 71, 1018–1025.
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., Pinczak, A., Barrera, N., Crispo, M., Menchaca, A., 2014. Effect of progesterone during the superstimulation of the first follicular wave on fertility rate and embryo quality in sheep. *Proceedings of the II Congreso de la Sociedad Argentina de Transferencia de Embriones* p 131 (abstract).
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., Barrera, N., Crispo, M., Menchaca, A., 2016. Progesterone levels during the first follicular wave affects oocyte viability and embryo quality in sheep. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction* p 430 (abstract).
- de Castro, T., Rubianes, E., Menchaca, A., Rivero, A., 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology* 52, 399–411.
- Denicol, A.C., Lopes, G.Jr., Mendonca, L.G., Rivera, F.A., Guagnini, F., Perez, R.V., Lima, J.R., Bruno, R.G., Santos, J.E., Chebel, R.C., 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95 1794–1706.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2014. InfoStat versión. URL. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Fierro, S., Gil, J., Vinales, C., Olivera-Muzante, J., 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79, 399–408.
- Ginther, O.J., Kot, K., 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42, 987–1001.
- Ginther, O.J., Kot, K., Wiltbank, M.C., 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43, 689–703.
- Gonzalez de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Inskip, E.K., Townsend, E.C., Lopez-Sebastian, A., 1999. Follicular dynamics during the estrous cycle in dairy goats. *Anim. Sci.* 68, 547–554.
- Meikle, A., Tasende, C., Garófalo, E.G., Forsberg, M., 1998. Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 75–85.
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 403–413.
- Menchaca, A., Pinczak, A., Rubianes, E., 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58, 1713–1721.
- Menchaca, A., Miller, V., Gil, J., Pinczak, A., Laca, M., Rubianes, E., 2004. Prostaglandin F2a treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 352–355.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., Pinczak, A., Rubianes, E., 2007. Day 0 Protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 68, 1111–1117.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Pinczak, A., Kmaid, S., Saldaña, J.M., 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72, 477–483.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., de Castro, T., Rubianes, E., 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 113–118.
- Mogase, C.R., Lehloanya, K.C., Dattena, M., 2016. Applicability of Day 0 superovulation protocol in Boer goats. *Small Rumin. Res.* 136, 262–264.
- Nasser, L.F., Sá Filho, M.F., Reis, E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76, 320–327.
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S., Lopez, V., Gil, J., 2011a. Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75, 1232–1238.
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Menchaca, A., Rubianes, E., 2011b. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76, 1501–1507.
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Vinales, C., Fierro, S., 2013. Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36h following a prostaglandin F2alpha-based protocol for timed AI in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 175–179.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29, 21–37.
- Rivera, F.A., Mendonca, L.G., José, G.L., Santos, E.P., Perez, R.V., Amstalden, M., Correa-Calderón, A., Chebel, R.C., 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in acating dairy cows. *Reproduction* 141, 333–342.
- Rubianes, E., Menchaca, A., 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 271–287.
- Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., Carbajal, B., de Castro, T., 1995. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology* 43, 465–472.
- Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663–671.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.
- Stringfellow, D.A., Givens, M.D., 2010. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, fourth ed. IETS, Savoy, IL, pp. 2010.
- Taşdemir, U., Agaoglu, A.R., Kaymaz, M., Karakaş, K., 2011. Ovarian response and embryo yield of Angora and Kilis goats given the Day 0 protocol for superovulation in the non-breeding season. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 1035–1038.
- Vilarino, M., Rubianes, E., Van Lier, E., Menchaca, A., 2010. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO) in sheep. *Small Rumin. Res.* 91, 219–224.
- Vilarino, M., Rubianes, E., Menchaca, A., 2013. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 79, 206–210.
- Vilarino, M., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., García-Pintos, C., Menchaca, A., 2017. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchronovine for FTAI in sheep. *Theriogenology* 90, 163–168.



# Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth

A. Menchaca<sup>a,\*</sup>, F. Cuadro<sup>a</sup>, P.C. dos Santos-Neto<sup>a</sup>, D. Bosolasco<sup>a</sup>, N. Barrera<sup>a</sup>, V. de Brun<sup>b</sup>, M. Crispo<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Cruz del Sur 2250, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Av. Lasplacas, 1550, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo, Matajojo, 2020, Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Ovary  
Early luteal phase  
MOET  
Superovulation  
Day 0 protocol  
Fertility

## ABSTRACT

This study evaluated the effect of progesterone priming during follicular growth on oocyte competence to undergo oocyte cleavage and embryo development in sheep. Two experiments were performed on a total of 195 females that either received or did not receive a progesterone treatment (CIDR-type device) during the first follicular wave, beginning soon after ovulation (*i.e.*, Day 0 of the experiment). On Day 3, the follicular population and oocyte quality (Experiment 1 and 2) and the competence of oocytes for cleavage and embryo development (Experiment 2) were evaluated after laparoscopic ovum pickup (LOPU) and *in vitro* fertilization. In Experiment 1, in a 2 × 2 factorial study the progesterone priming treatment (treated or not) was or was not associated with a single dose of FSH in a slow-release hyaluronic acid preparation given on Day 0. The follicular population on Day 3 and the number and morphology of recovered cumulus oocyte complexes (COCs) were not affected by the progesterone treatment ( $P = \text{NS}$ ) but were improved by the FSH administration ( $P < 0.05$ ). An interaction between both treatments was observed ( $P < 0.05$ ), with more desirable outcome with the females that received both the progesterone and the FSH treatments. In Experiment 2, half of the females received the exogenous progesterone priming, and all females received FSH on Day 0. After follicular aspiration on Day 3, the cleavage rate and the embryo development rate following *in vitro* fertilization and culture were greater in those females that received the progesterone treatment ( $P < 0.05$ ). In conclusion, these studies provide evidence that progesterone treatment during follicular growth affects oocyte competence, with the greater progesterone concentrations enhancing the oocyte's capacity to undergo cleavage and embryo development.

## 1. Introduction

The role of progesterone in mammalian oocyte maturation and its potential effect on oocyte quality has not been thoroughly elucidated (Lonergan, 2011). Most of the studies designed to evaluate the relationship between serum progesterone concentration and oocyte quality have been focused on follicular dynamics. The presence of low concentrations of progesterone in blood induces the extended growth of the dominant follicle with this follicle becoming a persistent follicle (Johnson et al., 1996; Viñoles et al., 1999;

\* Corresponding author.

E-mail address: [menchaca.alejo@gmail.com](mailto:menchaca.alejo@gmail.com) (A. Menchaca).

Flynn et al., 2000), which is usually associated with early oocyte meiotic resumption (Revah and Butler, 1996) and subsequent relatively lesser fertility (Johnson et al., 1996; Viñoles et al., 2001; Inskoop, 2004). Alternatively, greater circulating progesterone concentrations promote follicular turnover and the emergence of a new wave of ovarian follicular development, which results in a viable oocyte that is released with the occurrence of ovulation (Revah and Butler, 1996). This mechanism is mediated by LH, relatively lesser or greater progesterone concentrations promote or inhibit pulsatile LH release, respectively, which induces the excessive growth or the atresia of the largest follicle, respectively. There are consistent findings that this mechanism of regulation of dominant follicle development exists in various species, such as cattle, sheep and goats (reviewed by Lonergan, 2011; Evans, 2003; Rubianes and Menchaca, 2003; respectively). Although the association between progesterone concentrations and oocyte competence has been attributed primarily to follicular dynamics, additional mechanisms may be affecting the quality of oocytes.

The development of a persistent follicle normally occurs when using hormonal treatments for estrous synchronization when there are two circumstances. The first circumstance is when the treatments do not ensure follicular regression (*i.e.*, defined as turnover) preventing the emergence of a new wave of follicular development; and the second circumstance is when the treatments are associated with the use of a controlled progesterone release devices for long periods, which results in low circulating progesterone concentrations as the treatment period advances toward the end. Both situations have been resolved by the hormonal protocols currently used for ovarian control, which consist of induction of atresia/ovulation of the dominant follicle at the beginning of the treatment, and the shortening of the length of progesterone administration (reviewed in cattle by Bó et al., 1995; in sheep and goats by Menchaca and Rubianes, 2004). This strategy has been used in the field of reproductive technologies in ruminants, enabling extensive use of fixed-time artificial insemination (FTAI) programs and improving the implementation of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) programs. These advances are further described in recent reviews for cattle (Mapletoft et al., 2018), sheep and goats (Menchaca et al., 2018). Although these protocols overcame the problem of the presence of persistent follicles induced by long term progesterone treatments, information regarding the effect of progesterone on oocyte competence in non-persistent follicles is limited. To the best of our knowledge, there is no clear evidence in mammals regarding the effect of progesterone on oocyte developmental competence when there is comparison of identical lengths of growth in newly developing follicles.

In a recent study, we determined that progesterone priming during follicular growth improved the fertilization rate and the embryo yield in superovulated sheep (Cuadro et al., unpublished). The Wave 1 model for control of follicular development was used, in which follicular recruitment of the first follicular wave was stimulated with FSH under the influence of low circulating concentrations of progesterone, typically during the early luteal phase (*i.e.*, < 2 ng/ml), or when there were relatively greater progesterone concentrations induced by using an intravaginal CIDR-type device containing 0.3 g progesterone. Following superovulation and after insemination, uterine flushing revealed that embryo production was enhanced as a result of progesterone priming during FSH administration. The main improvement was in embryo quality and fertilization rate. Even though a marked effect of circulating progesterone concentrations on embryo yield was found, the biological actions that lead to this occurrence has not been clearly established. Because the differences were evaluated after uterine flushing performed several days after insemination, the mechanism may be related to follicular population or to oocyte quality after progesterone treatment, and also to the oviduct/uterine environment or to sperm transport. To further understand this mechanism, the current study was conducted in which there was aspiration of follicles that developed in the presence of relatively low and greater circulating progesterone concentrations to evaluate the effect on the oocyte competence.

The objective of this study was to evaluate whether progesterone, administered during the growing phase of follicular wave development affects oocyte developmental competence. In addition, the effect of the interaction of circulating progesterone concentrations with FSH on the follicular population was also studied. With these aims, we used the Wave 1 model associated with follicular aspiration and *in vitro* embryo production in sheep.

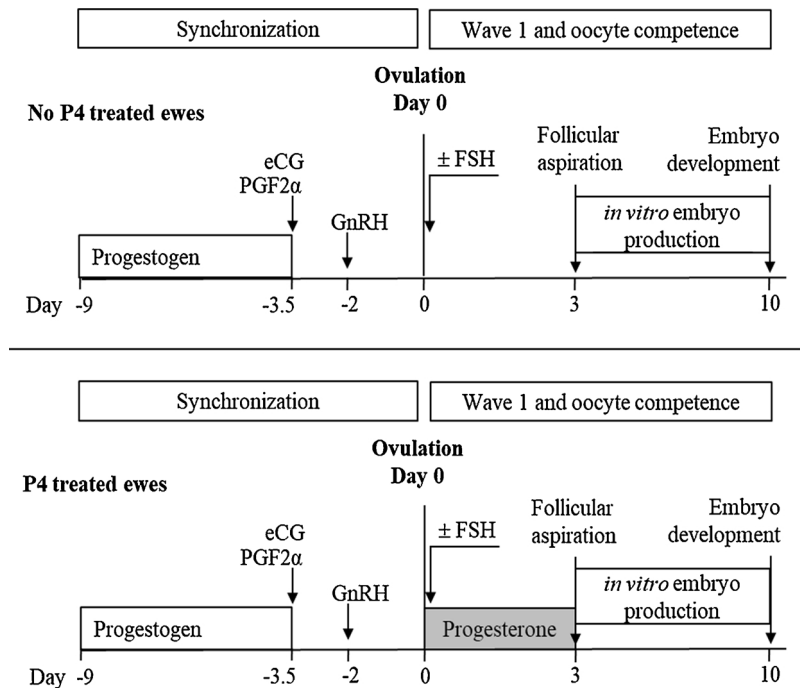
## 2. Materials and methods

Two experiments were performed on a total of 195 multiparous Australian Merino sheep that were subjected to the procedures for conducting the Wave 1 experimental model. The ewes were or were not administered a progesterone treatment during the 3 days after the time of a synchronized ovulation (*i.e.*, during the emergence, recruitment and growth of small and medium follicles of the first wave of follicular development). For both experiments, the emergence of the Wave 1 was pre-synchronized by using a progesterone-based treatment (sponges) and Day 0 was defined as 84 h after sponge removal. After ovarian follicular synchronization, the progesterone treatment was administered using a CIDR-type device from Day 0 to Day 3. Follicular aspiration was performed by laparoscopy on Day 3. Cumulus oocyte complexes (COCs) were subjected to *in vitro* embryo development conditions. The experimental design is depicted in Fig. 1. The study was performed at the *Fundacion IRAUy* (Montevideo, Uruguay), and the procedures were conducted with the approval of the Internal Animal Care Committee certified by the National Committee of Animal Experimentation of Uruguay.

### 2.1. Experiment 1

The objective of this experiment was to evaluate the effect of progesterone and FSH administration on follicular population, COC recovery and oocyte quality. Seventy-five ewes with a mean body condition score of  $3.4 \pm 0.6$  (scale: 0 emaciated; 5 obese) were used in eight replicates, which were conducted during the breeding season (February to March, 35 °S). Before the experiment, time of ovulation was synchronized using a short-term treatment protocol consisting of an intravaginal sponge treatment (60 mg medroxyprogesterone acetate, Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 6 d accompanied by treatment with 300 IU of equine





**Fig. 1.** Experimental model of Wave 1 to evaluate the effect of progesterone (P4) on follicular population and oocyte competence. Two experiments were conducted in 195 females. In both experiments, ovulation was synchronized using a short-term protocol with a progestogen treatment plus prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) and equine chorionic gonadotrophin (eCG). To ensure ovulation, GnRH was given 36 h after progestogen treatment. Day 0 was defined 84 h after pre-synchronization treatment (*i.e.* soon after presumptive ovulation) and different experimental groups were applied during the growing phase of Wave 1 (*i.e.*, during three days period early in the luteal phase). In Experiment 1, on Day 0 the females received or not a P4 priming ( $n = 38$  and  $n = 37$ ) and an FSH treatment ( $n = 30$  and  $n = 45$ ) in a  $2 \times 2$  factorial design. Progesterone was administered by using a CIDR-type intravaginal device from Day 0 to Day 3, while FSH was administrated on Day 0 in a single dose *i.m.* in a slow-releasing hyaluronic acid preparation. In Experiment 2, P4 was ( $n = 59$ ) or was not ( $n = 61$ ) administered as described in Experiment 1, and all the females received a single dose of FSH in slow-releasing preparation. On Day 3, in both experiments follicular population assessment and follicular aspiration was performed by laparoscopic ovum pickup (LOPU). Oocyte quality was determined soon after LOPU by the morphology of recovered cumulus oocyte complexes (Experiment 1 and 2), while oocyte competence was evaluated by the ability to develop into viable embryos under *in vitro* conditions (Experiment 2).

chorionic gonadotropin (eCG, Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and 125  $\mu$ g of sodium cloprostenol (Ciclas DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina), given *i.m.* at time of sponge removal, followed by one dose of 8  $\mu$ g of a GnRH analog (Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina), given *i.m.* 36 h later. Previous reports using this time-of-ovulation synchronization protocol demonstrated that the interval between intravaginal device removal and ovulation is between 60 and 70 h, with approximately 90% of the females having ovulations within 72 h after intravaginal device removal (Menchaca et al., 2007; Vilariño et al., 2010, 2013).

After the pre-synchronization protocol, the females either received no treatment ( $n = 37$ ) or progesterone priming ( $n = 38$ ) for 3 days (*i.e.*, from Day 0 to Day 3) using an intravaginal CIDR-type device containing 0.3 g progesterone (DICO, Syntex, Buenos Aires, Argentina; Vilariño et al., 2010). This experimental model, which was recently validated in a related experiment, induces relatively greater progesterone concentrations in all treated animals, in contrast with the relatively lesser progesterone concentrations in non-treated control ewes ( $\sim 5$  ng/mL compared with  $\sim 1.5$  ng/mL, respectively; Cuadro et al., unpublished). In addition, a follicular superstimulatory FSH treatment was accompanied by progesterone treatment in a  $2 \times 2$  factorial design, with the females allocated in four experimental groups to be treated with or not treated with progesterone and to be treated or not treated with FSH (+P4 + FSH group,  $n = 14$ ; +P4-FSH group,  $n = 24$ ; -P4 + FSH group,  $n = 16$ ; -P4-FSH group,  $n = 21$ ). The FSH was administered *i.m.* on Day 0 in a single dose (80 mg pFSH, Folltropin, Vetoquinol, Lure, France) in a hyaluronic acid preparation to induce slow release of the FSH (MAP-5, Vetoquinol). The FSH (400 mg) was diluted in 10 mL of MAP-5, a hyaluronic acid preparation. On Day 3, follicular population assessment and follicular aspiration for oocyte evaluation was performed in all females.

## 2.2. Experiment 2

The objective of this experiment was to evaluate the effects of progesterone treatment on follicular population, oocyte quality and embryo production. Multiparous ewes ( $n = 120$ ) with a mean body condition score of  $3.3 \pm 0.7$  as previously described were used. The experiment was performed in 12 replicates during May to August (35 °S, Uruguay). The females received the same treatment protocol described in the Experiment 1 to synchronize time of ovulation. Progesterone was administered ( $n = 59$ ) or not administered

( $n = 61$ ) 84 h after sponge removal (*i.e.*, Day 0 of the experiment) to induce the relatively greater or relatively lesser serum progesterone concentrations, respectively, in accordance with [Cuadro et al. \(unpublished\)](#). Exogenous progesterone was administered using a DICO intravaginal device that was kept in place for 3 days, as described in Experiment 1. All females received a single dose of FSH (100 mg) in a hyaluronic acid preparation (MAP-5) to induce slow release. On Day 3, follicular population assessment and follicular aspiration was performed for all females, following by oocyte evaluation and *in vitro* embryo production.

### 2.3. Follicular population assessment and aspiration

For both experiments, follicular population assessment and aspiration was performed by laparoscopy on Day 3 using the technique first described by [Baldassarre et al. \(1996\)](#) and updated recently ([Menchaca et al., 2016a](#)). Briefly, laparoscopic ovum pickup (LOPU) was conducted in 12 h-fasted ewes with general anesthesia, induced by diazepam (5.0 mg total dose of Unizepan; Unimedical, Montevideo, Uruguay) and ketamine (100 mg total dose of Vetanarcol; Konig, Buenos Aires, Argentina) administered by the *i.v.* route, and maintained using isoflurane (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brazil) in an oxygen mixture administered through inhalation. With the female securely strapped to a laparoscopy table and using a laparoscope for viewing, the ovarian surface was exposed by pulling the fimbria in different directions using an atraumatic forceps, and the follicles were counted and classified into small (< 3 mm in diameter), medium (3–5 mm), and large follicles (> 5 mm). Only the medium and large follicles were aspirated. For aspiration, the follicles were punctured individually using the aspiration pipette. The oocyte aspiration set consisted of a collection tube with an inlet connected through tubing to the aspiration pipette and an outlet connected through tubing to a vacuum pump. The aspiration pipette consisted of a 20 G short-bevel needle glued to the tip of a 30 cm-long section of acrylic tubing with a 3 mm external diameter and a 1 mm internal diameter. The follicular fluid, containing the cumulus-oocyte complexes (COCs), was recovered in 50 mL tubes and the COCs were immediately examined. To minimize adhesions, the ovary was washed with 40–60 mL of sterile saline solution supplemented with antibiotic (200,000 IU of penicillin G per liter) after aspiration. At the end of each LOPU session, each female received an *im* dose of oxytetracycline (5 mg/kg, Terramycin LA, Zoetis, Buenos Aires, Argentina). The COCs were recovered and classified using a stereoscopic microscope at 40x based on the number of cumulus cell layers and on homogeneity in the oocyte cytoplasm: Grade 1, homogeneous ooplasm with oocyte completely surrounded by compact multilayered cumulus cells; Grade 2, oocytes partially surrounded by cumulus cells with a less homogeneous ooplasm; Grade 3, denuded oocytes with irregular ooplasm and dark clusters; Grade 4, surrounded by fibrin (which had an appearance similar to a spider web) and occasionally darker and more irregular than previous grades. The COCs were maintained in a medium containing TCM 199, Hepes, fetal bovine serum and antibiotics, and only Grade 1 and 2 COCs were selected for *in vitro* maturation (Experiment 2).

### 2.4. *In vitro* embryo production (IVEP)

The IVEP was conducted using the previously described protocol ([Crispo et al., 2014](#); [Menchaca et al., 2016b](#)). Briefly, for *in vitro* maturation, Grade 1 and 2 COCs were incubated for 24 h in drops of maturation medium (TCM 199 supplemented with 10% estrous sheep serum (ESS), 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 100 µM cysteamine, 50 UI/ml and 50 µg/ml of penicillin and streptomycin, respectively) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at a temperature of 39 °C. For *in vitro* fertilization, groups of 25–30 mature oocytes per 100 µL drops were inseminated with frozen semen using  $1 \times 10^6$  spermatozoa/drop, with the spermatozoa being selected by the swim-up method. Fertilization was performed in 5% CO<sub>2</sub> at 39 °C for 22 h. For *in vitro* culture, presumptive zygotes were denuded and placed into culture medium under mineral oil with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 39 °C for 6 days after insemination. The culture medium consisted of SOFaaBSA buffered bicarbonate containing SOF supplemented with 5% BME containing essential amino acids, 2.5% MEM containing nonessential amino acids, and 0.4% bovine serum albumin. The culture medium was replaced 3 days after insemination with fresh SOFaaBSA ([Menchaca et al., 2016b](#)). For each experimental group, the cleavage rate and embryo development rate (morulae and blastocysts) were evaluated 2 and 6 days after insemination, respectively.

### 2.5. Statistical analysis

The mean  $\pm$  SEM number of follicles and oocytes were analyzed by the nonparametric test using mixed models in Infostat Software ([di Rienzo et al., 2015](#)). Data shown as percentages were analyzed using generalized linear mixed models. The models included the treatment as a fixed effect, while the female (Experiments 1 and 2), the oocyte/embryo (Experiment 2) and the replicate were included as a random effect. For Experiment 1, the interaction between progesterone and the FSH treatment was also evaluated. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

The follicular population, number of COCs recovered and proportion of Grade 1 and 2 COCs were not affected by the progesterone treatment. The treatment with FSH improved follicular response, as indicated by a greater population of medium and large follicles ( $P < 0.05$ ) and a larger number of aspirated follicles per female ( $P < 0.05$ ). In addition, the number of total COCs and Grade 1 and 2 COCs recovered per female also increased as result of FSH treatment ( $P < 0.05$ ). There was an interaction between the progesterone and the FSH treatments, based on the number of follicles and number of COCs aspirated per female ( $P < 0.05$ ). For these



**Table 1**

Follicular population (Mean  $\pm$  SEM per donor) and cumulus oocyte complexes (COC) recovered after progesterone (P4) and FSH treatment administered during the first follicular wave (Experiment 1).

	Small follicles	Medium follicles	Large follicles	Total follicles	Aspirated follicles	Recovered COC	Grade 1 + 2 COC
<b>P4 treatment</b>							
-P4 ( <i>n</i> = 37)	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
+P4 ( <i>n</i> = 38)	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
<b>FSH treatment</b>							
-FSH ( <i>n</i> = 45)	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
+FSH ( <i>n</i> = 30)	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	9.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	7.6 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
<b>P4*FSH interaction</b>							
	NS	NS	NS	NS	P < 0.05	P < 0.05	NS
-FSH -P4 ( <i>n</i> = 21)	1.6 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2
-FSH + P4 ( <i>n</i> = 24)	1.7 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3
+FSH -P4 ( <i>n</i> = 16)	1.4 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.5
+FSH + P4 ( <i>n</i> = 14)	1.8 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 1.3	2.3 $\pm$ 0.7	11.1 $\pm$ 1.4	8.8 $\pm$ 1.4 <sup>c</sup>	5.9 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	2.9 $\pm$ 0.7

For different superscripts,  $P < 0.05$ . Simple effects are compared statistically only when interaction was detected.

Small (< 3 mm), medium (3–5 mm) and large follicles (> 5 mm) were counted and aspirated by laparoscopy three days after pre-synchronized ovulation (*i.e.*, during Wave 1).

variables, the most desirable outcomes were obtained when the progesterone and FSH treatments were administered together. The data for results are shown in Table 1.

### 3.2. Experiment 2

The follicular population and COCs recovered per female were not affected by the progesterone treatment ( $P = \text{NS}$ , Table 2). The proportion of Grade 1 COCs divided by the total recovered COCs, however, was greater in progesterone-treated (36.5%, 95/260) than progesterone-untreated ewes (25.4%, 57/224;  $P < 0.01$ ). Oocyte competence, as determined by cleavage rate and embryo development, was greater in progesterone-treated ewes ( $P < 0.05$ ). Data for these results are shown in Table 3. In addition, when the stage of embryo development was compared among groups 6 days after *in vitro* fertilization, the proportion of embryos in the blastocyst stage tended to be greater in progesterone-treated ewes ( $P = 0.08$ ; Fig. 2).

## 4. Discussion

The results demonstrate that the administration of progesterone during follicular growth did not affect the follicular population but improved the cleavage rate and embryo development. In addition, this is the first report in sheep to indicate a single dose of FSH in a hyaluronic acid slow-release formulation is effective in promoting follicular growth and improving COC retrieval for *in vitro* embryo production.

Use of the Wave 1 experimental model in the present experiments was validated in a previous study in our Laboratory (Cuadro et al., unpublished), where it was found that the insertion of a CIDR-type device 84 h after a pre-synchronization treatment (*i.e.*, soon after ovulation, from Day 0 to Day 3) induces  $\sim 5$  ng/mL of serum progesterone concentrations compared with  $\sim 1.5$  ng/mL in the females that did not receive exogenous progesterone ( $5.3 \pm 0.4$  compared with  $1.4 \pm 0.2$  ng/mL, respectively;  $P < 0.05$ ). There is ample evidence that 1 to 2 ng/mL of circulating progesterone concentration represents a low (subluteal) progesterone concentration, which is associated with increased LH pulse frequency (Lonergan, 2011; Cerri et al., 2011; Fair and Lonergan, 2012) probably sufficient to alter oocyte quality. In the previous study (Cuadro et al., unpublished), the imposing of superovulation procedures when there were relatively greater progesterone concentrations induces a greater embryo yield when uterine flushing occurred 6 days after insemination. In the current study, using the same Wave 1 model, it was demonstrated that although the follicular population was not affected by the progesterone treatment, oocyte quality was significantly improved. The cleavage rate and early embryo development

**Table 2**

Follicular population (Mean  $\pm$  SEM per donor) recovered after progesterone (P4) treatment during the first follicular wave (Experiment 2).

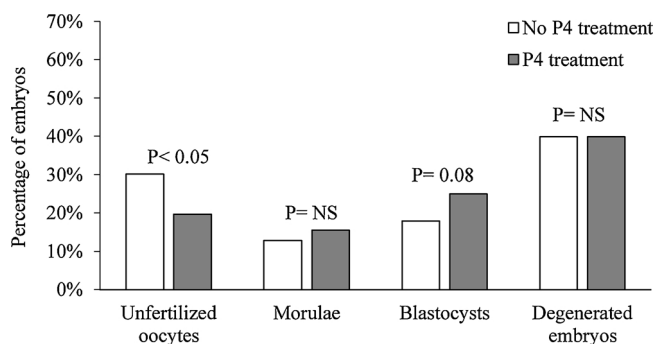
	Small follicles	Medium follicles	Large follicles	Total follicles	Aspirated follicles	Recovered COCs	Grade 1 + 2 COCs	COCs/aspirated follicles (%)
No P4 treatment ( <i>n</i> = 61)	1.8 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	55.8 $\pm$ 3.5
P4 treatment ( <i>n</i> = 59)	2.5 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 0.6	6.9 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.3	63.9 $\pm$ 3.7
<i>P</i> value	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0.1

Small (< 3 mm), medium (3–5 mm) and large follicles (> 5 mm) were counted and aspirated by laparoscopy three days after pre-synchronized ovulation (*i.e.*, during Wave 1).

**Table 3**

Embryo development of oocytes previously exposed to low or high progesterone concentrations during follicular growth. After 3 days of progesterone treatment, oocytes were recovered by laparoscopic ovum pickup and subjected to *in vitro* fertilization (IVF).

	Number of oocytes	Cleavage rate 2 d after IVF	Embryo development 6 d after IVF	Blastocysts 8 d after IVF	Hatched/ cleaved
No P4 treatment	196	69.9% (134/196)	30.6% (60/196)	28.1% (55/196)	17.9% (24/134)
P4 treatment	213	80.3% (171/213)	40.4% (86/213)	38.5% (82/213)	21.6% (37/171)
P value		< 0.05	< 0.05	< 0.05	NS



**Fig. 2.** Oocyte developmental competence after progesterone (P4) priming administered during follicular growth of Wave 1 (*i.e.*, 3 days period). After follicular aspiration, a total of 409 oocytes derived from control (no P4 treatment,  $n = 196$ ) and P4 treated ewes ( $n = 213$ ) were subjected to *in vitro* maturation, fertilization and culture (Experiment 2). Embryo development achieved 6 days after insemination is depicted.

was greater than in the control group; thus, it was demonstrated in the present study that this improvement is due to greater oocyte competence.

Even though a number of previous studies have focused on the relationship between progesterone during follicular growth and fertility in cattle, the biological mechanism for these associations has not yet been well established. In a previous report in lactating dairy cows, Rivera et al. (2011) reported that when there were relatively greater circulating progesterone concentrations during follicular superstimulation there was a greater quality of embryos collected 7 days after estrus. Similar results were reported by Nasser et al. (2011) in beef cows in which embryos were collected 7 days after insemination, or COC morphology was assessed 12 h after LH administration. These results indicate that relatively greater progesterone concentration lead to improvements in embryo yield, and it has been suggested that this may be associated with an enhanced COC morphology (without comparing oocyte competence to develop into viable embryos). Similar findings were also reported in sheep subjected to superovulation during Wave 1 of ovarian follicular development, with progesterone administered from Day 0 to 3 (Cuadro et al., unpublished). In addition, Denicol et al. (2012) reported that dairy cows, induced to have ovulations from the dominant follicle resulting from Wave 1 of follicular development and supplemented with two progesterone intravaginal devices, had similar pregnancy rates after insemination to those cows having ovulations from a dominant follicle that developed during the second wave. Collectively, these reports support the thesis that during follicular growth, circulating progesterone concentrations have a relevant role in subsequent fertility, primarily influencing embryo yield or pregnancy rate. Because most of the studies report embryo production 7 days after insemination or pregnancy rates 30 days later, there is no substantial evidence that determines whether the pathway from progesterone to fertility is related to follicular dynamics, oocyte competence, sperm transport or the oviduct/uterine environment. The current study provides novel information that this effect of progesterone is mediated, at least in part, by affecting the competence of oocytes to develop into viable embryos.

This finding has implications for the understanding of reproductive function, and also for the application of reproductive technologies. Different strategies for ovarian control applied to synchronization for FTAI and for MOET programs have been designed based on control of the Wave 1 of ovarian follicular development. For example, the Day 0 protocol for superovulation and embryo production in sheep and goats (Menchaca et al., 2002, 2010), or for the Synchrovine protocol for FTAI in sheep (Menchaca and Rubianes, 2004) is based on control of Wave 1. These strategies are very effective for inducing follicular turnover while avoiding the detrimental effects of persistent follicles. The current study contributes additional information regarding the convenience of adding a CIDR-type device during follicular growth of Wave 1. In addition, these findings related to high progesterone concentrations during follicular growth should also be considered for high-yielding lactating dairy cows, in which greater steroid clearance is responsible for decreased reproductive efficiency in the milking industry worldwide (Wiltbank et al., 2012). Thus, based on this information, new improvements may be proposed for ovarian control applied to reproductive technologies in ruminants.

Also, the present study is the first to demonstrate in sheep that FSH administration in hyaluronic acid, as a slow-release preparation (*i.e.*, MAP-5) is effective for ovarian follicular superstimulation before follicular aspiration. The possibility of extending the

half-life and bioavailability of FSH is relevant to ovarian follicular superstimulation for the embryo transfer industry. Usually, in small ruminants, FSH is associated with eCG given in a single dose 36 to 48 h before LOPU, which is performed at the end of a progestogen treatment of 9 to 11 days (Baldassarre et al., 2007). An FSH slow-release preparation could be an alternative for eCG in countries in which this hormone is not commercially available. In the current study, the administration of 80 mg of pFSH in MAP-5 doubled the number of aspirated follicles and COCs recovered per female. In addition, this is the first report to use Wave 1 for follicular stimulation and aspiration for *in vitro* embryo production in sheep. Because the wide variability in oocyte competence obtained by aspiration of follicles in different growth phases represents a limiting factor for *in vitro* embryo production (Menchaca et al., 2016b), the development of new strategies to improve follicular development should be proposed. The protocols normally used in sheep and goats for LOPU were not designed to control follicular dynamics, and the aspiration of a more homogeneous pool of oocytes from newly developing follicles after wave emergence could be more appropriate. In summary, these findings related to slow-release FSH administration, progesterone priming during follicular growth, and follicular aspiration of Wave 1 provide the impetus for further research to improve oocyte competence for implementation of *in vitro* embryo programs.

## 5. Conclusions

The current study demonstrates that short-term priming in the presence of relatively greater circulating progesterone concentrations during follicular growth improves the competence of the oocyte for cleavage and embryo development. In addition, although the follicular population was not affected by the exogenous progesterone priming, the interaction with FSH supplementation prior to follicular aspiration enhances the ovarian response and oocyte retrieval for *in vitro* embryo production.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

This study was financially supported by ANII and Union Agriculture Group. AM, PdS and MC are fellows of SNI (ANII) and PEDECIBA. The study was part of the MSc thesis of FC, who received a scholarship from SNB, ANII.

## References

- Baldassarre, H., Furnus, C.C., de Matos, D.G., Pessi, H., 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45, 707–717.
- Baldassarre, H., Rao, K.M., Neveu, N., Brochu, E., Begin, I., Behboodi, E., Hockley, D.K., 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 612–616.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31–40.
- Cerri, R.L., Chebel, R.C., Rivera, F., Narciso, C.D., Oliveira, R.A., Amstalden, M., Baez-Sandoval, G.M., Oliveira, L.J., Thatcher, W.W., Santos, J.E., 2011. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3352–3365.
- Crispo, M., Vilarino, M., dos Santos-Neto, P.C., Núñez-Olivera, R., Cuadro, F., Barrera, N., Mulet, A.P., Nguyen, T.H., Anegón, I., Menchaca, A., 2014. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res.* 24, 31–41.
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P.C., Pinczak, A., Barrera, N., Crispo, M., Menchaca, A., 2018. Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* (submitted).
- Denicol, A.C., Lopes, G.Jr., Mendonca, L.G., Rivera, F.A., Guagnini, F., Perez, R.V., Lima, J.R., Bruno, R.G., Santos, J.E., Chebel, R.C., 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1794–1806.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2015. InfoStat Version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Evans, A.C.O., 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 289–306.
- Fair, T., Lonergan, P., 2012. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 142–147.
- Flynn, J.D., Duffy, P., Boland, M.P., Evans, A.C.O., 2000. Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 285–296.
- Inskeep, E.K., 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.* 82 (E-Suppl), E24–39.
- Johnson, S.K., Dailey, R.A., Inskeep, E.K., Lewis, P.E., 1996. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 69–79.
- Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76, 1594–1601.
- Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., Menchaca, A., Sartori, R., 2018. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Anim. Reprod. The MS is in press.*
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 403–413.
- Menchaca, A., Pinczak, A., Rubianes, E., 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58, 1713–1721.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., Pinczak, A., Rubianes, E., 2007. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 68, 1111–1117.
- Menchaca, A., Vilarino, M., Crispo, M., de Castro, T., Rubianes, E., 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 113–118.
- Menchaca, A., Anegón, I., Whitelaw, C.B., Baldassarre, H., Crispo, M., 2016a. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology* 86, 160–169.
- Menchaca, A., Barrera, N., dos Santos-Neto, P.C., Cuadro, F., Crispo, M., 2016b. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Anim. Reprod.* 13, 273–278.
- Menchaca, A., dos Santos-Neto, P.C., Cuadro, F., Souza-Neves, M., Crispo, M., 2018. From reproductive technologies to genome editing in small ruminants: an embryo's journey. *Anim. Reprod.* (in press).

- Nasser, L.F., Sá Filho, M.F., Reis, E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76, 320–327.
- Revah, I., Butler, W.R., 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106, 39–47.
- Rivera, F.A., Mendonca, L.G., Lopes, G.Jr., Santos, J.E., Perez, R.V., Amstalden, M., Correa-Calderón, A., Chebel, R.C., 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141, 333–342.
- Rubianes, E., Menchaca, A., 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 271–287.
- Vilariño, M., Rubianes, E., van Lier, E., Menchaca, A., 2010. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO) in sheep. *Small Rum. Res.* 91, 219–224.
- Vilariño, M., Rubianes, E., Menchaca, A., 2013. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 79, 206–210.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E., 1999. The effect of sublethal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51, 1351–1361.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993–1004.
- Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Carvalho, P.D., Bender, R.W., Nascimento, A.B., 2012. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 238–243.