

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
MÁSTER EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN.

**ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE
FLUIDO FOLICULAR BOVINO
(ESPECTROSCOPIA FTIR)**



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Coppelia Maroto Gasch

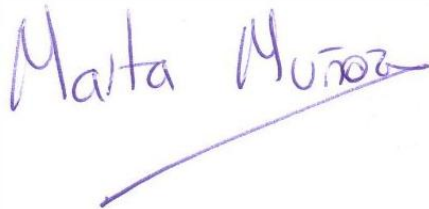
TUTORES

Dra. Marta Muñoz LLamosas
Dr. Alfonso Fernández González

Junio 2013

La Dra. Marta Muñoz Llamosas y el Dr. Alfonso Fernández González certifican que el trabajo presentado por Coppelia Maroto Gasch titulado “Análisis espectroscópico de fluido folicular bovino (Espectroscopía FTIR)” cumple las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster.

VºB



Fdo. Marta Muñoz Llamosas

Fdo. Alfonso Fernández González

En Oviedo a 10 de Junio de 2013.

AGRADECIMIENTOS:

A mis tutores: la Dra. Marta Muñoz Llamosas, Investigadora del SERIDA y el Dr. Alfonso Fernández González, Técnico de la Unidad de Espectroscopia Molecular y XPS de los SCTs de la Universidad de Oviedo, sin los cuales este trabajo nunca habría sido posible.

A mi paisano el Dr. Enrique Gómez Piñeiro, Coordinador del Centro de Biotecnología Animal del SERIDA y a la Dra. Carmen Díez, el Dr. Néstor Caamaño y a David y Susana, y en general a todo el personal del SERIDA porque han hecho que durante mi estancia con ellos me sintiera como en casa.

A mis amigas

ÍNDICE:

	Pág.
1. Organización de la empresa	1
2. Introducción	6
3. Objetivos e Hipótesis	26
4. Material y Métodos	27
5. Resultados	32
6. Discusión	38
7. Conclusiones	43
8. Bibliografía	44
9. Anexos	50

ABREVIATURAS:

- IA: Inseminación Artificial.
- NEB: Balance Energético Negativo.
- ART: Técnicas de Reproducción Asistida.
- NEFA: Ácidos Grasos no Esterificados.
- SFA: Ácidos Grasos Saturados.
- PUFA: Ácidos grasos polinsaturados.
- FSH: Hormona Folículo Estimulante.
- LH: Hormona Luteinizante.
- FF: Fluido Folicular.

- NMRS: Resonancia Magnética Nuclear.
- MS: Técnicas de Espectroscopia de Masas.
- FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.
- COC: Complejo Cumulus-Ovocito.
- FFG: Muestras de fluido folicular procedentes de folículos grandes.
- FFP: Muestras de fluido folicular procedentes de folículos pequeños.
- PCA: Análisis de Componentes Principales.
- LDA: Análisis Discriminante Lineal.
- OPU: Ovum Pick-up

1. ORGANIZACIÓN DE LA EMPRESA:

➤ Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario

(SERIDA):

El SERIDA es una entidad pública del Principado de Asturias, que tiene por finalidad contribuir a modernizar y mejorar las capacidades de Sector Agroalimentario Regional mediante el impulso y la ejecución de la investigación y el desarrollo tecnológico agropecuario, forestal y alimentario, para mejorar la productividad, diversificar el sector y aumentar las rentas de los activos primarios, redundando en una mejora de la competitividad del sector agroalimentario asturiano.

Se estructura en los siguientes departamentos y áreas:

- Departamento de Administración y Apoyo.
- Departamento Tecnológico y de Servicios.
- Departamento de Investigación.

El departamento de investigación se encarga de la gestión científica de los programas de investigación y de coordinar las acciones y los medios de la investigación con las actividades que se ejecutan en el resto de los departamentos del SERIDA. Se estructura en seis áreas: Sistemas de Producción Animal; Nutrición, Pastos y Forrajes; Sanidad Animal; Genética y Reproducción Animal; Cultivos Hortofrutícolas y Forestales; y Tecnología de Alimentos.

De éstas, la que nos atañe es el Área de Genética y Reproducción Animal, situada en el Centro de Biotecnología Animal de Deva, Gijón, que realiza, desde hace casi dos décadas, una intensa actividad investigadora en el campo de las nuevas biotecnologías reproductivas.

Los proyectos de investigación desarrollados han permitido la puesta a punto de las técnicas de maduración, fertilización, cultivo de embriones *in vitro*, Ovum Pick-Up (OPU), vitrificación de embriones y predicción no invasiva del sexo del embrión *in vitro*.

Las líneas de investigación actuales en metabolómica, tienen como objetivo el desarrollo de sistemas no invasivos de predicción del sexo y viabilidad del embrión. La transferencia de embriones bovinos de sexo y/o viabilidad conocida puede aumentar los beneficios económicos de la industria ganadera mediante la producción de terneros para las industrias cárnicas y de terneras para las industrias lácteas. Por tanto, el desarrollo de técnicas que permitan la selección del sexo de forma rápida, barata y eficaz de los embriones antes de su transferencia ayudaría a mejorar el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida empleadas en ganadería. Los estudios recientes, realizados con embriones bovinos, han establecido claras diferencias en el perfil metabolómico entre embriones macho y hembra. Esta técnica, que no es invasiva y es compatible con el comercio internacional de embriones criopreservados, contribuirá a un uso más eficiente y reducido de las hembras receptoras en el proceso reproductivo.

➤ **Servicios Científico Técnico (SCTs) de la Universidad de Oviedo:**

Son estructuras destinadas a dar soporte a investigadores, equipos y grupos de investigación de la Institución, así como de otras instituciones públicas y empresas privadas.

Desde su creación en 1987, al amparo del artículo 39 de los Estatutos de la Universidad de Oviedo, su objetivo primordial ha sido la optimización de los recursos científicos de la Institución, consiguiendo su máximo rendimiento al hacerlos accesibles a otros investigadores externos.

Los objetivos finales de los SCTs son:

- Dar soporte a la investigación que realizan los investigadores, equipos o grupos en los departamentos, centros o institutos de la Universidad de Oviedo, del Hospital Universitario y de cualquier otro organismo público o privado.
- Desarrollar métodos y técnicas de apoyo a la investigación de acuerdo con las directrices de política científica de la Universidad de Oviedo.
- Proporcionar formación científica y técnica especializada en los ámbitos de competencia de cada unidad.
- Contribuir como elemento activo en las relaciones Universidad-empresa en el campo del desarrollo de tecnología y prestación de servicios, directamente o en colaboración con otros servicios de la Universidad.
- Prestar especial apoyo a la transferencia de conocimiento a través de las Empresas de Base Tecnológica y Spin off universitarias.

- Participar en redes nacionales e internacionales de centros de soporte a la investigación

Para cubrir estos objetivos, los SCTs disponen de:

- Un personal altamente especializado. Doctores, titulados superiores, etc.
- Una infraestructura científica moderna. Equipos de alta tecnología adquiridos en gran parte en los últimos 4 a 5 años.
- Una estructura organizativa adecuada cuya célula básica de funcionamiento es la Unidad relacionada generalmente con una técnica instrumental concreta.

En consonancia con los objetivos presentados, los SCTs desarrollan las siguientes funciones

- Atención a usuarios y mantenimiento de equipos: Sin duda la tarea más importante del personal de los SCTs es la atención directa a los usuarios, que dependerá en cada caso del grado de destreza del mismo con los equipos científicos a usar. El mantenimiento de los equipos es una de las responsabilidades habituales del personal de los SCTs, con el fin de mantener la instrumentación en condiciones óptimas de funcionamiento.
- Investigación Aplicada: Con el fin de aprovechar al máximo la instrumentación, aumentar las prestaciones y resolver los problemas planteados por los usuarios, en los SCTs se prestará especial atención a la investigación aplicada y la puesta a punto de nuevas metodologías.

- Formación y difusión de conocimientos: Una misión importante de nuestros SCTs es la de formar e informar a las personas interesadas en el conocimiento, manejo y posibilidades de las diferentes técnicas de que se dispone.

1. INTRODUCCIÓN:

En los últimos años los problemas reproductivos del ganado vacuno de leche se han intensificado ya que son una de las consecuencias que tienen los programas de selección genética que se aplican a estos animales para aumentar su producción (1-3) (*Tabla 1*).

Año	n	Total IA	% preñez	Leche producida por vaca/año (kg)
1991	1.118	968	42,3	7.800
1992	1.250	1.141	39,2	8.000
1993	1.311	1.128	38,5	8.300
1994	1.295	1.103	38,9	8.500
1995	1.332	1.123	36,8	8.900
1996	1.412	1.168	36,3	9.100
1997	1.617	1.326	35,2	9.400
1998	978	785	34,8	9.700
1999	1139	909	34,7	9.900
2000	1.259	985	33,1	10.200
Total	12.711	10.636	37	

Tabla 1: Datos de fertilidad en vacas lecheras en el Noreste de España. Extraído de Lopez-Gatius 2003 (1).

Esta disminución en la fertilidad es el factor que tiene mayor incidencia en la rentabilidad de las explotaciones, por ello se está realizando un gran esfuerzo en dilucidar sus causas y desarrollar programas de mejora genética que permitan simultáneamente optimizar la producción de leche y la eficiencia reproductora.

Whates y cols. en 2008 determinaron que la fertilización del ovocito se consigue en más del 90% de las inseminaciones artificiales (IA, inseminaciones artificiales) que se realizan en vacas lecheras. Sin embargo en las dos semanas siguientes a la inseminación se produce la pérdida del conceptus en más del 40% de los casos. Además, después del día 28 tras la IA, se producen pérdidas embrionarias en otro 20% de los casos y en un 5% de las gestaciones hay también pérdidas fetales durante fases más avanzadas de la preñez (4).

La disminución de la fertilidad es un problema multifactorial que puede deberse tanto a causas genéticas, ambientales y/o al manejo de los animales (5, 6). Entre otros factores se ha establecido una correlación entre el balance energético negativo (NEB, Negative Energy Balance, balance energético negativo) en el periodo postparto, el estado nutricional, los tratamientos farmacológicos durante la gestación, la aplicación inadecuada de técnicas de reproducción asistida (ART, Assisted Reproductive Technologies) y el clima con la disminución de la fertilidad (1) (*Fig. 1*). La identificación de las distintas variables implicadas permitiría incorporarlas a programas de cría para conseguir una mejor respuesta selectiva.



Fig. 1: Causas de disminución de la fertilidad.

Tradicionalmente, los métodos que se utilizan para mejorar los rendimientos a nivel reproductivo de las ganaderías de leche, se basaban en medidas/cálculos realizados a partir de la información disponible en los programas de control lechero p.e. intervalos entre partos, tasa de concepción o la tasa de retorno al ciclo del estro tras el parto. Estos datos están a menudo incompletos o sesgados por lo que la búsqueda de nuevos métodos para mejorar el rendimiento reproductivo continúa (7).

Uno de los factores que se está estudiando ampliamente con el fin de aumentar la productividad de las ganaderías de leche es el estado nutricional de los animales. Las alteraciones en el estado nutricional provocadas por cambios en la dieta o cambios fisiológicos p.e. periodos de gestación o lactancia, causan alteraciones hormonales que provocan alteraciones

metabólicas y endocrinas que pueden ser cruciales para la función reproductiva (8-10) (*Fig. 2*).

Durante la lactancia, el gasto energético que supone la producción de leche es mucho mayor que el aporte, por tanto se produce un NEB y la consiguiente movilización de las reservas energéticas corporales que afecta al proceso reproductivo, ya que se produce una anovulación temporal tras el parto como una respuesta adaptativa (11). La ovulación se restaura cuando el balance energético vuelve a ser positivo. Por ello la competencia de ovocitos y embriones, y en último término la fertilidad se ve comprometida durante este periodo (12-13). Existen estudios que indican que una temprana restauración de la ovulación resulta en una mejora de la fertilidad y de la posterior crianza (14). Además también se ha visto que los periodos prolongados de anovulación durante el postparto resultan en una disminución de la fertilidad en el ciclo reproductivo siguiente. Por tanto resultaría interesante determinar las relaciones e interacciones entre el estado nutricional y la restauración de la ovulación tras el posparto.

Con el fin de disminuir la duración del NEB se suministran dietas con alto contenido en energía (dietas ricas en almidón que pueden atenuar el descenso en la concentración de insulina y glucosa plasmática y evitar la alta concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA, non-esterified fatty acids) durante el periodo de NEB (15). Sin embargo, la alta cantidad de energía ingerida puede afectar a la dinámica folicular y a la calidad de ovocitos y

embriones de manera directa o indirecta (16). Otra estrategia para aumentar la fertilidad y, a la vez, aumentar la producción de leche es suplementar la dieta con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, Poliunsaturated Fatty Acids,); no obstante un inconveniente de esta dieta es que tiene un efecto negativo para el desarrollo ovocitario (17). Por último, el aumento de la cantidad de proteínas suministrada en la dieta con el fin de mejorar la fertilidad, también afecta negativamente a la calidad de ovocitos y embriones a través de productos generados de su catabolismo como son el NH_4^+ o la urea (11).

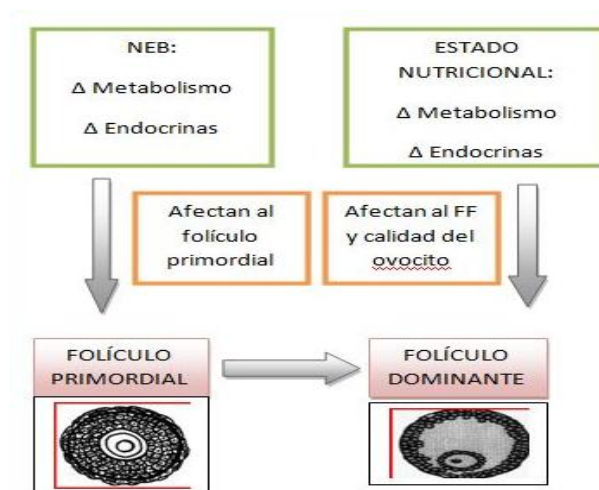


Fig. 2: Mecanismos por los que el NEB y el estatus nutricional modifican la calidad del ovocito.

En los últimos años, también se está realizando un gran esfuerzo en mejorar la eficiencia de las ART. La aplicación de las ART ha estado limitada por la imposibilidad de establecer el mejor momento para superovular e inseminar hembras donantes y para su transferencia a hembras receptoras. El principal factor responsable de este problema es la amplia variación inter e

intraindividual en su respuesta ovulatoria a los tratamientos con gonadotropinas. El éxito o el fracaso de un programa reproductivo o de mejora genética también dependen del conocimiento del ciclo estral, su fisiología y los mecanismos hormonales que lo controlan.

El ciclo del estro es el tiempo que ocurre entre dos periodos estrales y varía normalmente en 17-24 días, considerándose 21 días como promedio. Se pueden distinguir cuatro fases (*Tabla 2*):

FASE	DÍA	DURACIÓN	EVENTO
Estro	0	10-12 h	Maduración folicular, aumento de estrógenos y pico de LH
Metaestro	1-3	5-7 días	Ovulación y formación de cuerpo hemorrágico que no responde a PGF2a
Diestro	5-18	10-15 días	Maduración del cuerpo lúteo, altos niveles de Progesterona
Proestro	19-21	3 días	Regresión del cuerpo lúteo, maduración del folículo y aumento de estrógenos

Tabla 2: Fases del ciclo estral bovino.

El desarrollo de los folículos de la cohorte está sujeto a control hormonal; principalmente depende de los niveles de FSH (hormona folículo estimulante),

estradiol e inhibina. En bovino los folículos antrales crecen en cohortes en dos o tres oleadas durante el ciclo estral (18). Durante cada oleada se produce el crecimiento sincrónico de una cohorte de folículos de 3-5 mm, entre los cuales se selecciona uno que se desarrolla como folículo dominante, el resto sufrirá atresia. El folículo dominante crecerá hasta alcanzar los 15-20 mm, y luego puede ovularse en un microambiente hormonal adecuado o sufrir atresia durante la fase lútea debido a la secreción de progesterona o durante los primeros estadios de la preñez (19) (14).

Las claves para entender los mecanismos de selección del folículo dominante son las siguientes (*Fig. 3*):

- 1) los folículos de una cohorte no son idénticos al mismo tiempo.
- 2) los folículos de una cohorte son gonadotropina dependientes y se volverán atrésicos cuando los niveles de FSH estén por debajo del umbral necesario para sostener su desarrollo.
- 3) la secreción de FSH es controlada por “feedback” negativo en la hipófisis a través de la interacción sinérgica entre estradiol e inhibina secretada por los folículos grandes de la cohorte.
- 4) el desarrollo de vascularización durante los últimos estadios del desarrollo folicular hace que se incremente el suplemento de hormonas, sobre todo de gonadotropinas a los folículos grandes.

5) la adquisición de receptores para LH en las células de la granulosa de los folículos grandes permite que se hagan menos dependientes de las fluctuaciones de FSH.

Mediante estos mecanismos, las diferencias funcionales entre los folículos de la cohorte se ven acentuadas por el ambiente hormonal, ocasionando la selección de uno o varios folículos y la atresia del resto. Sólo los folículos que contengan células de la granulosa en correcto estado, sometidos al microambiente endocrino y paracrino adecuado, serán capaces de continuar su desarrollo hasta la ovulación (20).

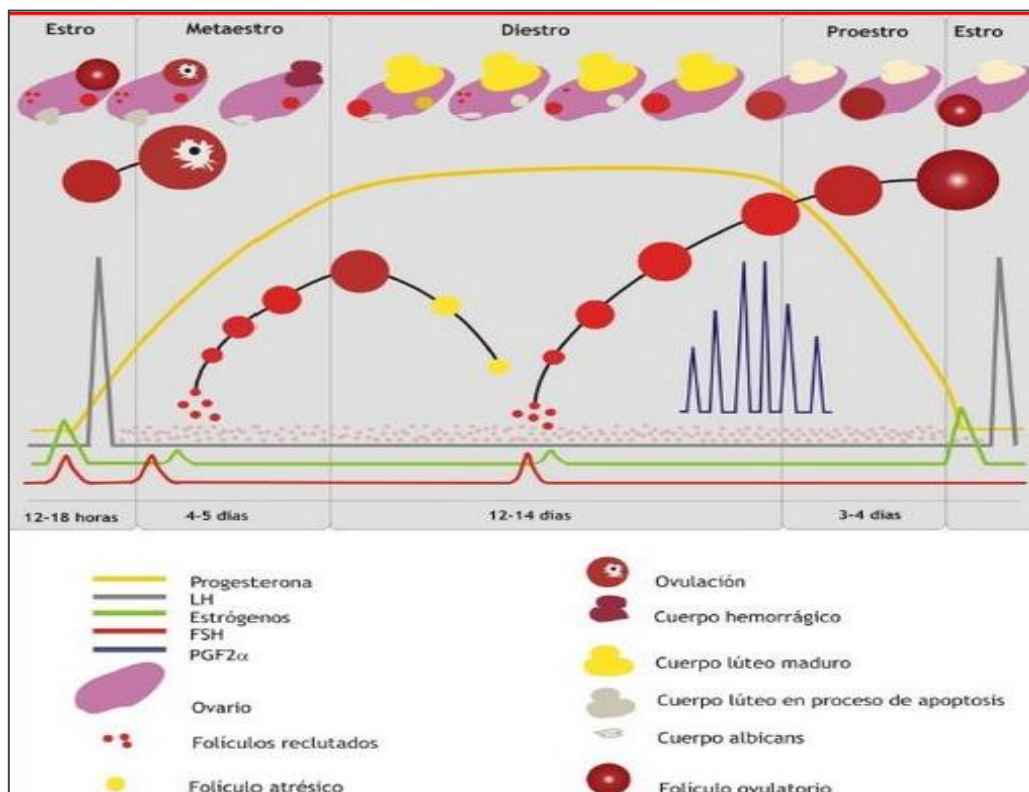


Fig. 3: Hormonas del ciclo estral bovino.

El fluido folicular (FF) tiene un papel importante en el desarrollo ovocitario, ya que proporciona un microambiente que influye en el desarrollo y calidad de los ovocitos contenidos en ese folículo. Se compone de un exudado de plasma y sustancias secretadas por las células de la teca y de la granulosa (21) y protege al ovocito contra la proteólisis, la extrusión durante la ovulación y actuará como tampón ante cambios en la homeostasis. Diversos estudios han establecido una correlación entre la calidad del ovocito y el perfil de distintos metabolitos presentes en el FF tales como ácidos grasos (22-23), aminoácidos (24) y carbohidratos (25).

Los avances en los últimos años de las ciencias “-ómicas” (desde la genómica y transcriptómica hasta la proteómica, o metabolómica) ha permitido nuevas metodologías para estudiar la fisiología de mamíferos. Tradicionalmente el estudio de una enfermedad o la valoración de un tratamiento médico conllevaban su descripción a nivel fenotípico (evaluación de efectos de un fármaco mediante el análisis de los niveles hormonales, número de ovocitos recuperados...). Actualmente estas descripciones a nivel fenotípico continúan utilizándose pero habitualmente son completadas con información obtenida mediante el estudio de genes, proteínas y metabolitos.

En los laboratorios de embriología, la evaluación de ovocitos y embriones se realiza mediante su análisis morfológico, lo que provoca valoraciones discrepantes debido a la variabilidad inter e intra observador. En la evaluación morfológica de ovocitos para determinar su viabilidad se valora la

presencia de vacuolas en el citoplasma, el citoesqueleto y el grosor de la zona pelúcida. El análisis morfológico tiene como ventaja ser un método rápido y barato, pero tiene escaso valor predictivo y una alta subjetividad. Además hay que tener en cuenta, que a veces una buena morfología no es sinónimo de un buen estado funcional, ya que a veces embriones que parecen normales presentan alteraciones genéticas o epigenéticas.

Recientemente, el empleo de diversas técnicas “-ómicas” para valorar la calidad de ovocitos y embriones ha permitido la identificación de biomarcadores asociados con su viabilidad (para revisión ver Seli y cols. 2010) (26). Estas nuevas técnicas permiten eliminar el componente subjetivo que conllevan los análisis morfológicos.

El estudio mediante espectroscopía del medio de cultivo en el que se desarrollan los embriones humanos, ha permitido establecer una correlación entre su viabilidad y el metaboloma de su medio de cultivo (metaboloma: conjunto de pequeñas moléculas de bajo peso molecular, < 1 kDa, compuestos no proteicos, incluyendo intermediarios del metabolismo -aminoácidos, nucleótidos y lípidos-, adenosil-trifosfato (ATP), hormonas y otras moléculas involucradas en la señalización intracelular y metabolitos secundarios que se encuentran en un sistema biológico) (27-28).

El análisis metabolómico de muestras biológicas puede realizarse mediante diversas técnicas: (29-30) (*Tabla. 3*).

- **Resonancia magnética y nuclear (NMRS):** los pioneros en el uso de esta técnica fueron Nicholson y cols. en el análisis de biofluidos para el diagnóstico de enfermedades. La NMRS se basa en la propiedad que poseen algunos núcleos llamada “spin nuclear”. Los núcleos pueden ser excitados mediante ondas de radio cuya frecuencia dependerá del tipo de núcleo y del ambiente químico. Cuando el núcleo vuelve al estado basal tras la relajación la energía liberada puede detectarse como un cambio de voltaje en función del tiempo. La señal se convierte en una frecuencia y se aplica la transformada de Fourier. El resultado es un espectro con la intensidad en el eje Y y la frecuencia en el eje X. La intensidad de la señal de NMR está directamente relacionada con la concentración de los núcleos contenidos en la muestra y cada línea del espectro representará una determinada molécula dentro de la muestra (31).

Aunque la NMRS no es una técnica tan sensible como la espectroscopia de masas (MS) no requiere preparación de la muestra y puede analizar tanto sólidos como líquidos. NMRS puede usarse para estudiar cambios en el metabolismo sobre tejidos intactos. Su mayor desventaja es la baja sensibilidad y la necesidad de grandes volúmenes de muestra. Para el análisis del FF el volumen de muestra no sería un problema, ya que suele ser posible disponer de la cantidad suficiente de muestra.

- **Técnicas de espectroscopia de masas (MS):** técnicas con alta sensibilidad, rapidez y que permiten un análisis cualitativo y potencialmente cuantitativo de una amplia población de metabolitos, incluso si se encuentran a concentración fisiológica (del orden de $\mu\text{mol/L}$). Pueden usarse solas, o en combinación con técnicas cromatográficas (cromatografía líquida, gaseosa, electroforesis capilar o UPLC). Los análisis por espectrometría de masas requieren una compleja preparación de la muestra y el uso de solventes orgánicos para su extracción, lo que puede resultar en la pérdida de algunos componentes de dicha muestra. La técnica se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos los iones se separan en función de su masa y carga y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Los espectros que se obtienen darán una información bidimensional que representan un parámetro relacionado con la abundancia de dichos iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.
- **Técnicas de espectroscopia vibracional:** FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ha alcanzado un gran desarrollo en los últimos años debido a su alto potencial como herramienta de análisis ya que permite con gran rapidez de un modo no invasivo el análisis de diferentes muestras sin manipulación y con una mínima cantidad (bastan $0,5 \mu\text{l}$). La técnica se basa en que al exponer una muestra a luz roja, los

grupos funcionales de los compuestos contenidos en la muestra absorberán la radiación y vibrarán en una determinada longitud de onda y esta absorción/vibración puede ser correlacionada directamente con las distintas especies bioquímicas. El resultado del análisis será un espectro que puede ser descrito como “huella metabólica” y es característica de cada muestra ya que toda sustancia química y/o bioquímica tendrá su propia huella metabólica. Los espectros obtenidos corresponden con las longitudes de onda del infrarrojo medio (4000-400 cm). Entre estas longitudes de onda vibran los grupos funcionales CH_2 y CH_3 de los ácidos grasos (3050-2800 cm), C=O, NH y C-N de proteínas y péptidos (1750-1500 cm) y C-O, C-O-C de los polisacáridos (1200-900 cm). Por tanto mediante FTIR podemos analizar ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos simultáneamente. Así pues aunque esta técnica no es tan sensible y específica como la MS permite un análisis rápido, repetible y simultaneo de los compuestos contenidos en una pequeña cantidad de muestra sin requerir su manipulación. La limitación de esta técnica es la alta absorción del agua, por lo que para el análisis se requiere la deshidratación total de la muestra.

Dentro de las técnicas de espectroscopia vibracional también se incluye la espectroscopia RAMAN que es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi

cualquier compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis Raman se basa en el examen de la luz dispersada por una muestra al incidir sobre ella un haz de luz monocromática. La técnica consiste en hacer incidir un haz de luz monocromática de una determinada frecuencia sobre una muestra cuyas características moleculares queremos determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayoría de la luz que se dispersa tiene la misma frecuencia que la luz incidente (esta luz se conoce como dispersión de Rayleigh y no aporta información sobre la muestra), pero una fracción muy pequeña presenta un cambio de frecuencia resultado de la interacción con la materia. Es esta pequeña fracción de luz la que se conoce como dispersión Raman o dispersión inelástica y es característica de la naturaleza química y el estado físico de la muestra y no depende de la radiación incidente.

Estas variaciones de frecuencia que se observan en el efecto Raman son equivalentes a variaciones de energía. Los átomos e iones de las moléculas están sometidos a continuos movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos de la molécula le corresponderá un valor determinado de energía molecular.

Una de las ventajas de esta técnica es que permite la medición de disoluciones acuosas. Esto es debido a que, de entre todas las bandas Raman que presenta el agua, tan sólo la presente entre 3000 y 3800 cm^{-1} tiene una intensidad suficientemente elevada como para poder enmascarar la presencia de bandas debidas a otras especies (ej. los solutos). Con excepción, por tanto, de este intervalo, la espectroscopía Raman permite la caracterización de disoluciones acuosas sin que el disolvente enmascare la molécula objeto de análisis.

Por contraposición, su principal desventaja consiste en la dificultad de caracterizar muestras fluorescentes, ya que dicho fenómeno suele traducirse en un elevado fondo en los espectros Raman que dificultan la identificación correcta de bandas. Lamentablemente, las muestras biológicas suelen presentar matrices complejas que presentan elevada fluorescencia.

	FTIR	RAMAN	NMR	MS
Preparación de la muestra	Análisis directo	Análisis directo	Utilización de solventes	Extracción y utilización de solventes
Rapidez para adquirir el espectro	10s-1min	10s-3min	8 minutos como mínimo	1-3min
Reproductividad (1= baja, 5= alta)	5	4	5	4
Sensibilidad (1= baja, 5= alta)	2	2	2	4
Especificidad (1= baja, 5= alta)	1	1	3	4
Análisis de datos	Requieren procesamiento matemático de los datos			
Coste del instrumental (1= baja, 5= alta)	1	1	5	4/5
Coste por muestra (1= baja, 5= alta)	1	1	2	2
Identificación de metabolitos (1= baja, 5= alta)	2	2	3	4

Tabla 3: Resumen comparativo de las distintas técnicas espectroscópicas.

Estas técnicas espectrométricas se han venido utilizando durante los últimos años en el diagnóstico de enfermedades permitiendo, por ejemplo, la detección de marcadores relacionados con distintos tipos de cáncer. Hoy en día también se emplean para descartar enfermedades y/o determinar su evolución puesto que se han observado diferencias en distintos metabolitos presentes en los fluidos analizados a través de los espectros obtenidos.

Otro grupo de enfermedades que han sido estudiadas mediante estas técnicas son los desórdenes metabólicos. Las técnicas de MS se han utilizado para la realización de pruebas de cribado en neonatos de un amplio número de desórdenes metabólicos como la galactosemia, defectos en los peroxisomas, deficiencias de creatina, desórdenes en la oxidación de ácidos grasos, defectos en el ciclo de la urea o en el metabolismo de otros aminoácidos (32).

En el campo de la reproducción humana, se ha establecido mediante FTIR (33) que existen diferencias bioquímicas en el líquido folicular perteneciente a los folículos grandes y a los pequeños. Los espectros obtenidos, revelan que los folículos grandes se agrupan en *clusters*, mientras que en los pequeños existe una mayor heterogeneidad. Además los espectros revelan que existen diferencias cuantitativas en cuanto al perfil de ácidos grasos y de aminoácidos.

En la especie bovina, Sinclair y cols. en 2008 (34) encuentran mediante MS que la composición del fluido folicular está relacionada con la morfología del COC (complejo cúmulo-ovocito) y con el desarrollo postfertilización *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. De todos los aminoácidos presentes en el FF, la glicina y la alanina serían los que mayor capacidad tendrían para predecir el desarrollo. Por el contrario la presencia de ácido palmítico se ha asociado con una peor morfología de COC, por lo que tendría un efecto negativo en la fertilidad, mientras que el ácido esteárico estaría relacionado con una buena morfología, teniendo por tanto un efecto positivo.

El análisis mediante MS del FF recuperado de novillas (modelo de alta fertilidad) y vacas tras su primer parto (modelo de fertilidad disminuida), ha permitido establecer la existencia de diferencias en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos (35). Los resultados obtenidos indican que el ácido palmítico y el esteárico estaban en mayor cantidad en el fluido folicular de vacas que en novillas, al igual que la cantidad de ácidos Grasos Saturados (SFA, Saturated Fatty Acids,) totales. Además se vio que el exceso de ácido palmítico durante la maduración *in vitro* tenía efecto negativo en la tasa de formación de blastocistos (23). El ácido palmítico y el esteárico también tendrían efecto negativo en el crecimiento *in vitro* y función de las células de la granulosa (36).

En el estudio realizado por Matoba y cols. (2012) (37) se analizó si existía una relación entre el líquido folicular y la competencia del ovocito mediante espectrometría de masas. Se vio que en cuanto al perfil de ácidos grasos el fluido folicular de ovocitos degenerados contenía mayor cantidad de palmitato y SFA, coincidiendo con los experimentos de Bender y cols. y Sinclair y cols. (34-35), y además presentaba menor cantidad de ácido linolénico que el fluido folicular perteneciente a ovocitos competentes. Además vieron que existía correlación entre algunos ácidos grasos y el nivel de hormonas como progesterona. En cuanto al perfil de aminoácidos encuentran que alanina, glicina y glutamato están correlacionados positivamente con el desarrollo hasta blastocisto y la urea tendría una correlación negativa. Además como en el caso

de los ácidos grasos encuentran que existen aminoácidos cuya concentración depende de los niveles hormonales.

METODOLOGÍA	AMINOÁCIDOS	ÁCIDOS GRASOS	ESPECIE	REFERENCIA
Espectrometría de masas	Gly, L-Ala, L-glu efecto positivo en el desarrollo del blastocisto	↑ palmitato y SFA totales efecto negativo. ↑ ácido linolénico efecto positivo.	Bovino	Matoba y cols. 2012
Espectrometría de masas	Ala, Gly y L-Gln efecto positivo. Lys baja efecto negativo en desarrollo folicular (cerdos)	SFA, palmítico y esteárico efecto negativo- Ac linolénico efecto positivo	Bovino	Bender y cols. 2010
FTIR	Diferencias cuantitativas en el perfil de aminoácidos y ácidos grasos entre folículos grandes y pequeños.		Humano	Thomas y cols. 2000.
Cromatografía	Ala y Gly efecto positivo. Glu y Val efecto negativo. Leu efecto negativo.	↑ Palmítico efecto negativo. ↑ Esteárico efecto positivo.	Bovino.	Sinclair y cols. 2008

Tabla 4: Estudios realizados mediante espectrometría en el campo de la reproducción.

A la luz de estos estudios parece claro que el potencial reproductivo de ovocitos y embriones está correlacionado con el perfil bioquímico del fluido folicular que rodea al ovocito en el ovario en distintas situaciones fisiológicas: estadios del ciclo estral, etapas de la vida reproductiva de un animal... Por tanto la puesta a punto de técnicas que permitan el análisis de FF de forma rápida y barata podría ayudar a mejorar la rentabilidad de las ganaderías valorando con mayor precisión el impacto real de las distintas estrategias que se utilizan para mejorar la fertilidad p.e cambios en la dieta.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Mediante espectroscopia FTIR se ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias bioquímicas en el fluido folicular humano procedente de folículos antrales de diverso tamaños (*Thomas y cols. 2000*) (33).

Los objetivos de este trabajo son:

- i. Poner a punto un protocolo experimental que permita analizar el perfil metabólico del FF bovino mediante espectroscopia FTIR.
- ii. Establecer si existen diferencias a nivel metabólico ente muestras de FF bovino procedentes de folículos de distintos tamaños.

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. MATERIAL:

4.1.1: Material para extracción de líquido folicular:

- Ovarios bovinos procedentes de matadero. (Ver anexo I recogida de ovarios)
- Guantes de látex sin talco.
- Jeringas 1ml.
- Agujas de 19 G.
- Tubos lobind. Protein LoBind tube 0,5 ml. Eppendorf tubes®.
- Tubos lobind. Protein LoBind tube 1,5 ml. Eppendorf tubes®.
- Caja de poliespan.
- Hielo.
- Centrífuga: Centrifuge Br 4i. Jouan®
- Nitrógeno líquido.
- Pinzas grandes.
- Congelador -80°C.

4.1.2: Material para el análisis de muestras por FTIR:

- FTIR: Varian 670-IR. FT-IR Spectrometer. Varian ®. (*Fig. 3*)
- Software: Resolutions Pro 5.0.0.700 Varian ®
- Pipeta Eppendorff.
- Vórtex.

- Centrífuga.
- Agua destilada.
- Reactivos:
 - Urea: Sigma® U5378.
 - Glucosa: Sigma® 66152-100G.
 - L-Alanina: Sigma® A7627-1G.
 - L-Glutamina: Sigma® G8540-25G.



Fig. 3: FTIR: Varian 670-IR. FT-IR Spectrometer. Varian ®.

4.2. MÉTODOS:

4.2.1: Recuperación de líquido folicular:

Los ovarios utilizados fueron recogidos de vacas sacrificadas en el Matadero Central de Asturias y trasladados al laboratorio en solución fisiológica de NaCl (9 mg/ml) y antibióticos (penicilina (100UI/ml), sulfato de estreptomicina (100g/ml)) a una temperatura de 25-30 °C. El tiempo transcurrido desde la recogida de ovarios hasta su procesamiento no superó las dos horas. Tras la llegada al laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces en agua destilada y una en solución salina con antibióticos, donde se mantuvieron a 30 °C hasta su manipulación.

El fluido folicular se aspiró a partir de folículos visibles de 2-5 mm considerados como pequeños y de folículos de 10-15 mm tomados como grandes con una aguja de 19G conectada a una jeringuilla de 1 ml. El FF se recogió en tubos lobind de baja unión de proteínas para evitar que estas proteínas se adhieran a la pared y se pierdan. Los tubos se rotularon con un número y una letra para indicar el ovario del que procede y la procedencia del líquido folicular que contiene (un número para el FF procedente de folículos grandes y un número y una letra para el FF procedente de folículos pequeños). Las muestras permanecieron en hielo picado a 4 °C hasta su centrifugación a 14000 Gs durante dos minutos a 4 °C. Tras ello se recogió el sobrenadante con una pipeta y se almacenó en un tubo lobind nuevo. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a -80 °C.

4.2.2: Análisis de líquido folicular por FTIR:

Antes de empezar el análisis se comprobó que el FTIR estaba perfectamente calibrado tomando un background (espectro blanco).

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron. Permanecieron 30 minutos a temperatura ambiente con objeto de realizar las mediciones a la misma temperatura. Se colocó una gota de 3 μ l de la muestra sobre el módulo de ATR y se deshidrató con ayuda de una corriente de nitrógeno. Todas las muestras se analizaron entre una longitud de onda (λ) de 600-4000 cm^{-1} que corresponde con el infrarrojo medio con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros resultantes procedieron de un promedio de 16 espectros que se obtienen en cada medición. Cada 5 muestras se realizó un nuevo background.

Para evitar contaminaciones se limpió el módulo ATR con agua destilada entre cada muestra.

Con el fin de descartar problemas instrumentales y de establecer la sensibilidad del FTIR se analizaron distintas sustancias: L-glutamina, urea y glucosa puras y en solución.

4.2.3: Análisis de urea, glutamina y glucosa por FTIR:

La glucosa, urea y glutamina son algunos de los componentes mayoritarios del FF bovino. Con el fin de establecer las bandas con mayor intensidad en los espectros de FTIR de estos compuestos se procedió a su

análisis empleando los mismos parámetros utilizados para el análisis de las muestras de FF.

4. RESULTADOS:

Tras la caracterización previa mediante espectroscopia FTIR de algunos de los compuestos mayoritarios presentes en el FF (glucosa, urea y glutamina) se analizaron 143 muestras de FF bovino: 30 muestras recogidas de folículos grandes (FFG, muestras de fluido folicular provenientes de folículos grandes) y 113 muestras recogidas de folículos pequeños (FFP, muestras de fluido folicular provenientes de folículos pequeños).

Los espectros obtenidos en los dos grupos de muestras no presentan diferencias apreciables a simple vista (*Fig. 4*) por lo que es necesario el empleo de técnicas estadísticas multivariantes para su análisis.

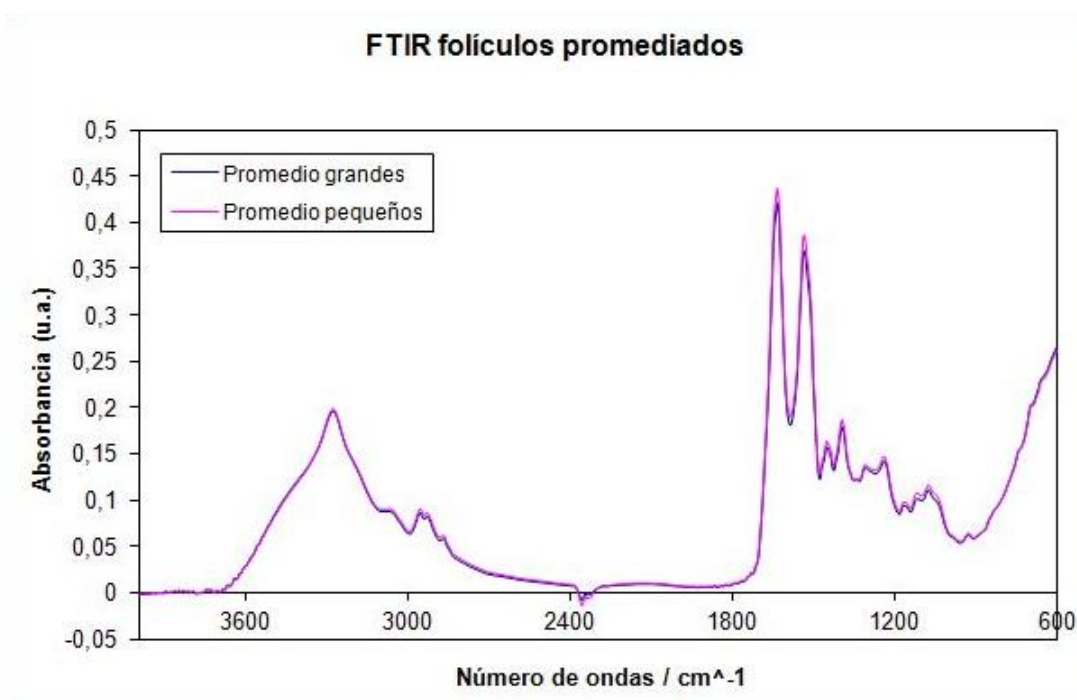


Fig. 4: Espectros promedio de FF bovino obtenidos mediante FTIR a partir de folículos grandes (azul) y folículos pequeños (rosa).

A partir de los espectros de la glucosa, urea y glutamina obtenidos, se deciden seleccionar 12 bandas diferentes que se corresponden con las bandas más intensas de estos compuestos:

- 7 bandas de la glucosa (637, 707, 1029, 1076, 1103, 1252 y 2923 cm^{-1}).
- 1 banda de glutamina (1409 cm^{-1}).
- 1 banda común de urea y glutamina (\sim 3350 cm^{-1}).
- 3 bandas común de glucosa, urea y glutamina (1650, 1450 y 1150 cm^{-1}).

El conjunto total de medidas se dividió aleatoriamente en dos subconjuntos: uno de entrenamiento conteniendo 23 muestras de FFG y 82 muestras de FFP y otro de prueba con 7 muestras de FFG y 31 muestras de FFP. Estos subconjuntos se emplearon en diferentes algoritmos de clasificación:

- Redes Neuronales Artificiales (ANN) basadas en la conectividad de neuronas individuales, el algoritmo es capaz de reconocer patrones. Sin embargo, tras 300 iteraciones durante el período de aprendizaje, no se consiguió que la red convergiera por lo que se descartó.

- K- Vecinos Más Próximos (KNN), algoritmo que clasifica una muestra en la categoría a la que pertenezcan la mayoría de las k muestras más próximas. En el presente trabajo, se ensayó la clasificación utilizando $k=3$ y $k=5$, obteniéndose los siguientes resultados:

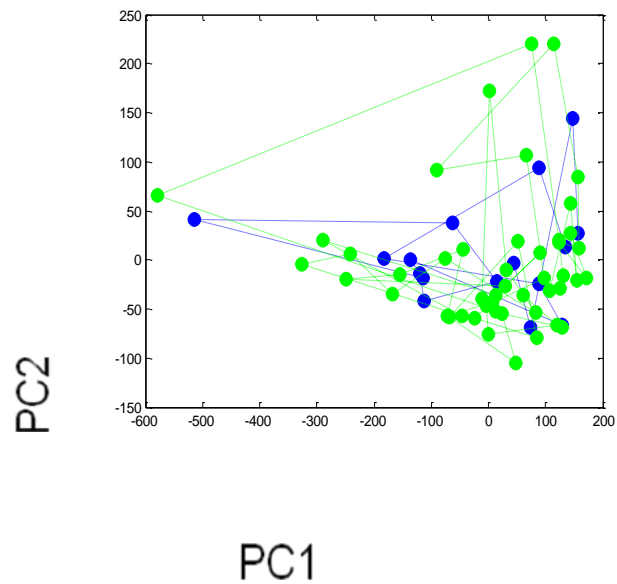
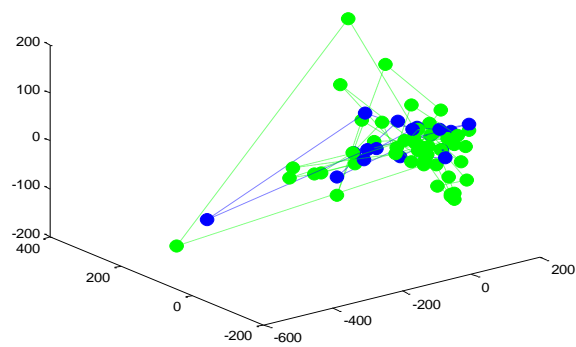
kNN	K=3	K=5
FFG	57,1% de éxitos	28,6% de éxitos
FFP	87,1% de éxitos	93,5% de éxitos

Tratando de mejorar los resultados obtenidos se empleó una transformación por componentes principales (PCA) para proceder a la clasificación de los casos del conjunto prueba.

PCs-kNN	K=3	K=5
FFG	42,9% de éxitos	14,3% de éxitos
FFP	83,9% de éxitos	96,8% de éxitos

- Análisis de Componentes Principales (PCA) que reduce el número de variables presentes en los datos a un número menor de variables denominadas componentes principales (PCs) que describen la mayoría de la variación de los datos permitiendo la clasificación de las muestras en grupos. Se procedió a clasificar el

conjunto de prueba en función de su proximidad al centroide de cada clase (FFG o FFP) en el espacio de las PCs. En este caso los resultados obtenidos fueron del 61,3% para los FFP y del 57,1% para los FFG.



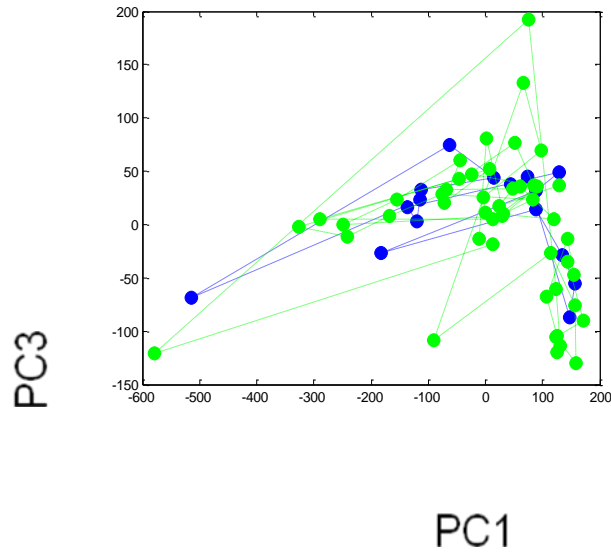


Fig 5. Análisis por Componentes Principales (PCA) de muestras de FF bovino. En verde se muestran las muestras de FFP y en azul las que corresponden a FFG.

- Análisis Lineal Discriminante (LDA) basado en la construcción de una función discriminante lineal a partir de las variables experimentales de los datos que se quieren clasificar. De este modo se realiza una clasificación en grupos de manera que la desviación estándar sea menor entre los datos de un mismo grupo y mayor entre los datos de distintos grupos. Mediante LDA se obtiene una clasificación correcta del 90,5% de los casos del conjunto de entrenamiento (97,6% para las FFP y 65,2% para las FFG), mientras que para el conjunto de prueba se consigue únicamente un 84,2% de éxito (90,3% para las FFP y 57,1% para las FFG).

LDA (12 picos)	Conjunto entrenamiento	Conjunto prueba
FFG	62.5% de éxitos	57,1% de éxitos
FFP	97.6% de éxitos	90,3% de éxitos

El LDA se realizó también empleando una serie de variables diferentes (el área de 17 picos, en vez de las 12 reseñadas anteriormente) y empleando un conjunto de entrenamiento y prueba diferente: en este caso el entrenamiento contiene 25 FFG y 40 FFP mientras que el de prueba contiene 5 FFG y 73 FFP. Con esta serie de datos, los resultados son un 91,8% de éxito para el conjunto de entrenamiento (92% entre las FFG y 91,8% entre las FFP) aunque el éxito en el conjunto de prueba es sólo del 80% (60% entre las FFG y 82,5% entre las FFP).

LDA (17 picos)	Conjunto entrenamiento	Conjunto prueba
FFG	92% de éxitos	60% de éxitos
FFP	91,8% de éxitos	82,5% de éxitos

6. DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se ha puesto a punto un protocolo experimental con el fin de analizar el perfil metabólico del fluido folicular bovino mediante espectroscopia FTIR. Asimismo se han analizado diversas muestras de fluido folicular procedente de folículos de diversos tamaños para establecer si existen diferencias a nivel metabólico entre ellas.

La espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica espectroscópica que se fundamenta en la absorción de radiación electromagnética en el intervalo del infrarrojo medio (4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1}). Aunque el fundamento real de la técnica es más complejo, se puede asumir que la absorción de radiación infrarroja de una determinada longitud de onda está asociada con cambios en la vibración de un cierto enlace que forma parte de la molécula objeto de análisis. Por esta razón, el espectro de infrarrojos proporciona información cualitativa y también cuantitativa sobre las especies analizadas. En el caso particular que nos ocupa en este trabajo, a partir de la información obtenida en un espectro de FTIR se puede construir la “huella metabólica” de las muestras analizadas.

El análisis mediante FTIR de muestras biológicas, es un método no invasivo y rápido. Por ello numerosas líneas de investigación en el campo de la reproducción están comenzando a utilizar esta técnica en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la fertilidad.

El perfil de los espectros de FF bovino obtenidos en este estudio coincide con los descritos por Thomas y cols. (2000) en la especie humana. En estos espectros, es posible distinguir con claridad las bandas espectrales más representativas de algunos compuestos mayoritarios presentes en el FF bovino: ácidos grasos (3000-2900 cm^{-1}), proteínas (2000-1400 cm^{-1}) y polisacáridos (1200-1000 cm^{-1}).

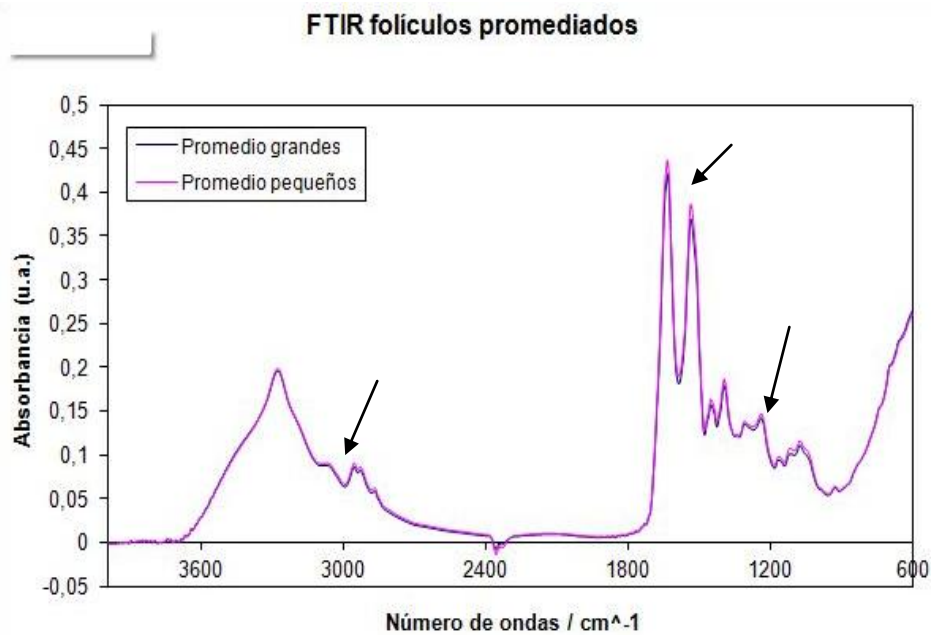


Fig. : Promedio de los espectros de FF obtenidos mediante FTIR.

El análisis mediante LDA de los espectros de FF bovino permite clasificar con un mayor éxito las muestras procedentes de folículos pequeños (90.3% éxito) que las procedentes de folículos grandes (57.1% éxito). El bajo porcentaje de clasificaciones correctas en el caso de FF procedente de los folículos grandes podría estar provocado por la forma en que tuvo que realizarse la recogida de muestras. Los ovarios utilizados, procedentes del

matadero central de Asturias, son almacenados en un mismo contenedor independientemente del animal del que procedan. Esto hace imposible identificar los dos ovarios procedentes de un mismo animal, lo que es necesario si se quiere establecer con certeza si el fluido folicular aspirado de folículos grandes pertenezca realmente al folículo dominante y no a un folículo de la cohorte que haya alcanzado mayor tamaño o a un quiste.

Notablemente, en los estudios realizados en la especie humana la clasificación de las muestras de FF procedentes de folículos pequeños es más heterogénea que la de las muestras procedentes de folículos grandes (Thomas y cols. 2000) (33). Es posible que la existencia de diferencias bioquímicas entre el FF de diferentes especies pueda explicar la disparidad de estos resultados.

El estudio de la composición bioquímica del FF en distintas situaciones fisiológicas ha permitido establecer una correlación entre ciertos compuestos y distintos parámetros relacionados con la fertilidad. Así, Sinclair y cols. (2008) (34), determinaron el valor que la composición de aminoácidos y ácidos grasos tiene para predecir el desarrollo de ovocitos y embriones bovinos cultivados *in vitro*. El estudio realizado por estos autores, en el que se combinó la información obtenida sobre el desarrollo de ovocitos cultivados *in vitro* hasta el estadio de blastocisto con el análisis mediante MS del fluido folicular que lo rodeaba, permitió establecer que determinados aminoácidos como la alanina

y la glicina podrían servir para predecir el potencial de desarrollo de los ovocitos, principalmente en el caso de ovocitos de peor calidad. Pues determinaron que la composición de estos aminoácidos se relaciona con la morfología de su complejo cumulus-ovocito y con el desarrollo postfertilización *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, y que la adición de estos aminoácidos al medio de cultivo mejora el desarrollo de embriones bovinos (38). Por el contrario, en este estudio, no se encontró ninguna correlación entre la concentración de ácidos grasos totales en el FF, ni con las concentraciones de los distintos ácidos grasos estudiados y el desarrollo *in vitro* postfertilización de los ovocitos cultivados.

Utilizando una metodología similar, Bender y cols. (2010) (35) analizaron el FF de 13 vacas lecheras Holstein-Friesian tras su primer parto (modelo de baja fertilidad) y de 15 novillas de la misma raza (modelo de alta fertilidad) en distintas fases del ciclo del estro. Tras la sincronización del ciclo en ambos grupos se procedió a la extracción y análisis del FF. Se determinaron diferencias en la composición metabólica del FF entre vacas y novillas y también entre los folículos dominantes y subordinados. De un total de 37 ácidos grasos identificados, el ácido palmítico, el ácido esteárico y el pool total de ácidos grasos saturados que, según la literatura afectan de forma negativa a la maduración *in vitro* de ovocitos, al desarrollo y función de las células de la granulosa, a la tasa de formación de blastocistos (36) y a la calidad embrionaria (39), aparecen en mayor cantidad en el FF de vacas durante el periodo

posparto que en el FF de novillas. También se determinó, coincidiendo con los estudio de Sinclair y cols. (2008) (34) que la presencia de algunos aminoácidos como la alanina, glicina y L-glutamina tienen un efecto positivo en la fertilidad. Estos resultados ponen de manifiesto que el microambiente folicular en el que tiene lugar el desarrollo de ovocitos en vacas tiene desventajas en comparación con el FF de novillas, lo que puede contribuir a dilucidar las causas de las diferencias en la fertilidad que existen entre vacas y novillas.

La complejidad de la espectrometría de masas para el análisis del FF en estos estudios impide que este tipo de metodología se pueda realizar de forma rutinaria en los laboratorios de reproducción con el fin de establecer p.e. qué ovocito entre todos los recuperados tras una OPU, tiene mayor viabilidad o si un determinado animal (tras un parto) se encuentra en el estado óptimo para ser sometida a un tratamiento de TRA.

Por el contrario el empleo del análisis de FF mediante espectroscopia FTIR podría de forma rápida, económica y simple identificar “huellas metabólicas” relacionados con la viabilidad de ovocitos y/o con la fertilidad. Lo que en última instancia podría contribuir a dilucidar las causas y encontrar soluciones a los problemas reproductivos en ganado vacuno de leche consecuencia de los programas de selección genética.

7. CONCLUSIONES:

El análisis espectroscópico de FF bovino mediante FTIR ha permitido obtener espectros que reflejan la “huella” metabólica del FF.

El análisis discriminantes lineal (LDA) de los espectros obtenidos del FF procedente de folículos de diversos tamaños permite clasificar con un alto porcentaje de éxito los folículos pequeños.

La espectroscopia FTIR en combinación un análisis estadístico clasificatorio como el LDA, podría utilizarse para establecer correlaciones entre perfil metabólico del fluido folicular bovino y distintas situaciones fisiológicas (diferentes momentos del ciclo estral, gestación...).

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. F, López-Gatius. «Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain.» *Theriogenology*, 2003: 89-99.
2. Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. «Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows.» *Journal Reproduction and Development.*, 2012: 10-16.
3. Dobson H, Smith RF, Royal MD, Sheldon IM. «The high producing dairy cow and its reproductive performance.» *Reprod Domest Anim*, 2007: 17-23.
4. Wathes D. C, Brickell J. S, Bourne N. E, Swalia A, Cheng Z. «Factors influencing heifer survival and fertility on comercial dairy farms.» *Animal* 2, 2008: 1135-43.
5. Friggens NC, Disenhaus C, Petit HV. «Nutritional sub-fertility in the dairy cow: towards improved reproductive management through a better biological understanding.» *Animal*, 2010: 1997-213.
6. Garnsworthy PC, Sinclair KD, Weeb R. «Integration on physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows.» *Animal*, 2008: 1144-52.
7. LeBlanc S. «Assesing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle.» *J Reprod Dev.*, 2010: 1-7.

8. O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. «Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentration in ewes.» *J Reprod Fertil* 118, 2000: 303-13.
9. Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. «Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle.» *Anin Reprod Sci* 78, 2003: 345-70.
10. Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. «Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development.» *Theriogenology* 55, 2001: 1323-40.
11. Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ. «Reduced fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II: Mecahnisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows.» *Reprod Dom Anim* 43., 2008: 623-32.
12. Wiltbank MC, Sartori R, Sangsritavong S, López H, Haughian JM, Fricke PM, Gumen A. «Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows.» *J Dairy Sci*, 2001: 84.
13. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. «Fertilizacion and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter.» *J Dairy Sci.*, 2002: 2803-2812.

14. Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. «Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows.» *J Reprod Fertil*, 1990: 581-591.
15. Van Knegsel ATM, Van den Brand H, Graat EAM, Dijkstra J, Jorritsma R, Decuyper E, Tamminga S, Kemp B. «Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones.» *J Dairy Sci*. 90, 2007a: 1467-76.
16. Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. «Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences.» *J Anim Sci* 83 (Suppl E), 2004: E63-E64.
17. Bilby TR, Guzeloglu A, MacLaren LA, Staples CR, Thatcher WW. «Pregnancy, bovine somatotropin and dietary n-3 fatty acid in lactating dairy cows: II Endometrial gene expression related to maintenance pregnancy.» *J Dairy Sci* 89, 2006: 3360-75.
18. Ireland J.J, Roche J.F. «Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins.» *Endocrinology*, 1983: 150-6.
19. Ginther O.J, Knopf L, Kastelic J.P. «Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy.» *Biol. Reprod.* 41, 1989: 247-54.
20. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana J.C. «Follicular growth and ovarian dynamics in mammals.» *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1997: 3-21.

21. Gosden RG, Hunter RHF, Telfer C & Brown N. «Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid.» *Journal of Reproduction and Fertility*. 82, 1988: 813-825.
22. Zeron Y, Ocherety A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Aray A. «Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrana properties and fatty acid composition of follicles.» *Reproduction* 121, 2001: 447-454.
23. Leroy JL, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruiff A, Genicot G & Van Soom AV. «Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro.» *Reproduction* 130, 2005: 485-495.
24. Booth PJ, Humpherson PG, Watson TJ & Leese HJ. «Aminoacid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro.» *Reproduction* 130, 2005: 665-668.
25. Preis KA, Seidel GJ & Gardner DK. «metabolomic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes.» *Reproduction* 130., 2005: 475-483.
26. Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, Yamashita N, Kato O, Sakkas D. «Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer.» *Fertil Steril*. 94, 2010: 535-542.

27. Botros L, Sakkas D, Seli E. «Metabolomics and its application for non-invasive embryo assesment in IVF.» *Mol Hum Reprod*, 2008: 679-90.
28. Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC. «Gas chromatography/mass spectrometry in metabolomic profiling of biological fluids.» *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2008: 202-11.
29. Singh R & Sinclair. «Metabolomics: approaches to assesing oocyte and embryo quality.» *Theriogenology 68*, 2007: 56-62.
30. Ellis D, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW & Goodacre R. «metabolomic fingerprint as a diagnostic tool.» *Future medicine.*, 2007: 1243-1266.
31. Baskind N.E, McRae C, Sharma V, Fisher J. «Undertanding subfertility at a molecular level in the female through the application of molecular magnetic resonance (NMR) spectroscopy.» *Human Reproduction Update. No 2.*, 2011: 228-241.
32. Dunn WB, Ellis DI. «Metabolomics: current analitycal platforms and methodologies: TrAC.» *Trends Analyt. Chem 24*, 2005: 285-294.
33. Thomas N, Goodacre R, Timmins EM, Gaudoin M, Fleming R. «Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles.» *Human Reproduction Vol 15*, 2000: 1667-1671.
34. Sinclair KD, Lunn LA, Kwong WY, Vonnacott K, Linforth RST, Craigon J. «Aminoacid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development.» *BioMedicine Online. Vol 16 No 8*, 2008: 859-868.

35. Bender K, Walsh S, Evans ACO, Fair T, Brennan L. «Metabolite concentrations in follicular fluids may explain the differences in fertility between heifers and lactating cows.» *Reproduction*, 2010: 1470-1626.
36. Vanholder T, Leroy JL, Soom AV, Opsomer G, Maes D, Coryn M, Kruif A. «Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro.» *Animal Reproduction Science* 87., 2005: 33-44.
37. Matoba S, Bender K, Fahey A, Mamo S, Brennan L, Lonergan P, Fair T. «Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential.» *Reproductive, Fertility and Development.*, 2012.
38. Lee ES & Fukui. «Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocyst.» *Biology of Reproduction* 55, 1996: 1383-89.
39. Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen MA, Lomax M, McEvoy TG. «Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of fatty acid content and viability of bovine blastocyst produced in vitro.» *Reproduction, Fertility and Development* 15, 2003: 275-284.

9. ANEXOS

- ANEXO 1:

PROCEDIMIENTO PARA LA RECOGIDA DE OVARIOS

- 1) Lunes a las 7:30 de la mañana telefonar al matadero (985744512). Preguntar por José María o por algún veterinario y comprobar si va haber vacas y a qué hora comenzará el sacrificio. Habitualmente sacrifican terneros/as al principio (si hay), y después las vacas. Entre 8:30 y 9 el personal hace una parada, por lo cual los sacrificios de vacas suelen comenzar a esta hora. Pero siempre se debe comprobar esto para salir del centro con la debida anticipación.
- 2) Material: Ropa adecuada (botas, prendas impermeables, protección para cabeza o pelo y guantes desechables de látex **SIN TALCO**). Nevera conteniendo 2 frascos de suero, bote para añadir agua caliente y un termómetro protegido en su funda de plástico. Tijeras romas. Placa de polispan para evitar que los frascos choquen durante el transporte.
- 3) Añadir agua caliente a la nevera hasta alcanzar la temperatura de 30° C, rodeando los frascos que contienen el líquido, sin que éstos lleguen a flotar. No es necesario cubrir los frascos por completo.
- 4) Antes de comenzar a introducir ovarios, esperar que el líquido del frasco alcance una temperatura mínima de 25° C.

- 5) Introducir los ovarios en el líquido del frasco según van siendo separados del resto de vísceras, manteniendo el frasco tapado todo el tiempo que sea posible (no hace falta enroscar la tapa).
- 6) Periódicamente, comprobar la temperatura del agua: cuando se alcancen 25 ° C volver a añadir agua hasta alcanzar los 30° C. No hace falta volver a comprobar la temperatura del interior del frasco.
- 7) Antes de salir del matadero: poner la temperatura del agua a 30° C.

A TENER EN CUENTA

- No importa que el líquido se derrame cuando el frasco se encuentra lleno de ovarios.
- No introducir ovarios de terneras muy jóvenes (preguntar al operario): sólo vacas o novillas.
- Esperar a tener un mínimo de 100 ovarios (50 vacas) antes de regresar al laboratorio. Si parece que no va a haber vacas suficientes, regresar cuando se hayan sacrificado todas. Si la salida se demora más tarde de las 12:30, regresar con lo que se haya recogido hasta esa hora.
- No introducir ovarios que provengan de vísceras que han permanecido mucho tiempo fuera de la canal (no más de 30 minutos).
- Ante cualquier duda: telefonar al laboratorio (Enrique o Carmen).

