



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

RESPUESTA FOLICULAR A LA APLICACIÓN INTRAOVÁRICA DE PLASMA
AUTÓLOGO RICO EN PLAQUETAS EN OVEJAS

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

ANDREA SÁNCHEZ CHÁVEZ

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rangel Santos, Ph.D.**



APROBADA



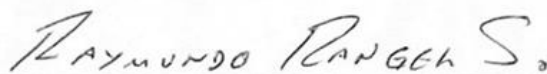
Chapingo, Estado de México, diciembre de 2023.

RESPUESTA FOLICULAR A LA APLICACIÓN INTROVÁRICA DE PLASMA AUTÓLOGO RICO EN PLAQUETAS EN OVEJAS

Tesis realizada por **ANDREA SÁNCHEZ CHÁVEZ**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

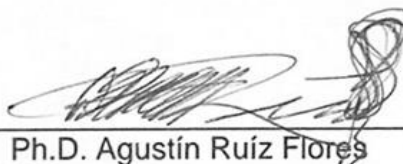
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph.D. Raymundo Rangel Santos

ASESOR:



Ph.D. Agustín Ruíz Flores

ASESOR:



Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

DEDICATORIA

A mi madre, **Genoveva Chávez Regino**, quien ha sido mi soporte a lo largo de mi vida, por ser mi mayor admiradora y por ser el pilar fundamental en la búsqueda de mi crecimiento personal.

A mi padre, **Benjamín Sánchez Vega**, quien ha sido mi inspiración, esto es un reflejo del interés por la zootecnia que cultivó en mí desde temprana edad.

A mis hermanas, **Celsa, Yasmin y Ana**, mis valientes confidentes, por ser el respaldo incondicional y la chispa para perseguir mis sueños, por alentarme a superar los desafíos y alcanzar metas más allá de mis límites.

A mi sobrina, **Ilse**, por su constante admiración y el privilegio de ser su inspiración; sé que con su determinación y capacidad podrá alcanzar cualquier meta que se proponga.

A mi compañero de vida, **Carlos Mireles**, por su inquebrantable apoyo a lo largo de este proyecto; por la calidez en mis días más desafiantes y la alegría compartida en los triunfos; por ser mi ancla y mi cómplice.

A mis amigos, **Carlos, Narda, Guadalupe, Mauricio, Noé y Alvin**, por hacer que este recorrido fuera más significativo, por sus risas compartidas y experiencias vividas.

"I'm an animal reproduction scientist, and you, what's your superpower?"

Con cariño,

Andrea Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la luz que hizo el camino más fácil durante mi paso por la maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi *alma mater*, por alojarme durante dos años más y permitirme fortalecer mis conocimientos.

Al Posgrado en Producción Animal y Departamento de Zootecnia, por darme la oportunidad de ser parte de este programa distinguido y cumplir una meta más en mi crecimiento personal y académico.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por el respaldo financiero otorgado hacia mi persona.

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos, aunque su exigencia fue un desafío constante, agradezco sinceramente cada lección impartida y cada conocimiento transmitido, pues ha sido a través de eso que me ha permitido crecer tanto profesional como personalmente.

Al Ph.D. Agustín Ruíz Flores y Dr. Demetrio Ambríz García, por haber sido una guía y apoyo constante a lo largo de mi trayectoria académica.

A mis compañeros y alumnos de licenciatura, que colaboraron durante la fase de campo, su apoyo fue fundamental para el éxito de este proyecto, en especial a Carlos Mireles.

Con gratitud,

Andrea Sánchez.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Andrea Sánchez Chávez
Fecha de nacimiento	12 de abril de 1999
Lugar de nacimiento	Pachuca de Soto, México.
CURP	SACA990412MHGNHN08
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula Profesional	13026961

Desarrollo académico

Maestría en Ciencias (2022-2023)	DEIS en Zootecnia Posgrado en Producción Animal Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura (2017-2021)	DEIS en Zootecnia Universidad Autónoma Chapingo
Preparatoria (2014-2017)	Preparatoria Agrícola Universidad Autónoma Chapingo

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE FIGURAS EN EL ARTÍCULO.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Literatura citada.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Fisiología reproductiva de la oveja.....	5
2.1.1. Dinámica folicular y ciclo estral.....	5
2.1.2. Foliculogénesis	6
2.1.3. Factores que afectan el desarrollo folicular	7
2.2. Estimulación folicular con gonadotropinas exógenas	8
2.2.1. Gonadotropina coriónica equina (eCG)	8
2.2.2. Hormona folículo estimulante (FSH)	9
2.2.3. Combinación de FSH-eCG	9
2.3. Uso de plasma rico en plaquetas () como estimulador del desarrollo folicular	10
2.3.1. Definición y composición del plasma rico en plaquetas	10

2.3.2. Obtención y procesamiento del plasma rico en plaquetas	11
2.3.3. Activación y posible mecanismo de acción del plasma rico en plaquetas	13
2.3.4. Aplicaciones clínicas del PRP en la reproducción animal	14
2.3.5. Aplicación intraovárica de plasma rico en plaquetas	15
2.4. Literatura citada.....	18
3. FOLLICULAR RESPONSE TO INTRAOVARIAN APPLICATION OF AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA IN EWES.....	23
Abstract	24
Acknowledgments.....	33
Funding.....	33
Conflicts of interest.....	33
Literature cited.....	34

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales componentes del plasma rico en plaquetas (PRP), adaptado de Seckin et al. (2022).	11
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Activación de plaquetas y liberación de factores de crecimiento 14

LISTA DE FIGURAS EN EL ARTÍCULO

Fig. 1. Means of the weekly behavior of the follicular population of 11 Dorper ewes after intraovarian application of 50 μ L of platelet-rich plasma (PRP) in the right ovary and saline solution (TES) in the left. *Indicates significant differences ($p < .01$). **Indicates significant differences ($p < 0.001$)..... 29

Fig. 2. Ultrasound images of ovaries from a Dorper ewe in the 4th week after PRP administration. 30

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El manejo reproductivo en ovinos se basa principalmente en la manipulación del ciclo estral con hormonas exógenas para imitar o modificar la dinámica folicular. Aunque estas prácticas se han realizado a lo largo del tiempo, los avances científicos actuales en la fisiología ovárica y las biotecnologías reproductivas permiten la modificación de protocolos existentes y la búsqueda de nuevas alternativas. Esto no solo para mejorar los índices de fertilidad, sino también abordar las crecientes preocupaciones sobre la seguridad alimentaria e impacto ambiental asociadas con dichos protocolos (Munther et al., 2022).

El desarrollo acelerado de folículos está regulado principalmente por hormonas, mecanismos celulares y moleculares que permiten que después de una fertilización natural o asistida, el ovocito asegure su sobrevivencia y se convierta en feto (Peña et al., 2007). La ovulación múltiple en ovinos se induce mediante la aplicación de diferentes fuentes hormonales. Entre las hormonas más empleadas se incluyen la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Simonetti et al., 2008), no obstante, su efectividad es variable e inconsistente (Martínez-Rojero et al., 2017).

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtiene de la sangre mediante centrifugación y separación de sus diferentes componentes, los cuales incluyen plasma (55 %), glóbulos rojos (41 %) y, plaquetas y glóbulos blancos (4 %) (Holcomb et al., 2015). En las plaquetas y glóbulos blancos están contenidos diferentes fuentes de factores de crecimiento que, al entrar en contacto con receptores y células del ovario, estimulan el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Sills & Wood, 2019). En estudios recientes se evaluó la eficiencia de la aplicación intraovárica del PRP tanto en humanos como en especies animales. En mujeres, Hosseini et al. (2017) encontraron un aumento en la población de folículos antrales y primordiales; por su parte Sills et al. (2018) reportaron una respuesta favorable en el reclutamiento folicular. Asimismo, ratas en estado de infertilidad tratadas con PRP presentaron activación y desarrollo

folicular (Marchante et al., 2023). Igualmente, en vacas se reportó un aumento en la respuesta en el reclutamiento folicular y en la ovulación (Cremonesi et al., 2020).

En el segundo apartado de este escrito se presenta la revisión de literatura de la presente investigación en donde se explica detalladamente la fisiología reproductiva de la oveja. Se define qué es el plasma rico en plaquetas (PRP) y sus principales componentes. Además, se mencionan los usos potenciales que ha tenido en especies pecuarias, forma de aplicación y propósito de estudio.

En el último capítulo, con el objetivo de evaluar el uso del PRP en la población folicular a través del tiempo, se presentan los resultados de la investigación sobre la comparación en número de folículos de ≥ 2 mm entre ovarios de la misma oveja, después de la aplicación intraovárica de PRP o solución salina.

1.1. Literatura citada

- Cremonesi, F., Bonfanti, S., Idda, A., & Lange-Consiglio, A. (2020). Improvement of embryo recovery in Holstein cows treated by intra-ovarian platelet-rich plasma before superovulation. *Veterinary Sciences*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010016>
- Holcomb, J. B., Tilley, B. C., Baraniuk, S., Fox, E. E., Wade, C. E., Podbielski, J. M., et al. (2015). Transfusion of plasma, platelets, and red blood cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 ratio and mortality in patients with severe trauma: the PROPPR randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 313(5), 471-482. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.12>
- Hosseini, L., Shirazi, A., Naderi, M. M., Shams-Esfandabadi, N., Borjian, B. S., Sarvari, A., Sadeghnia, S., Behzadi, B., & Akhondi, M. M. (2017). Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(4), 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.04.007>
- Marchante, M., Buigues, A., Ramirez-Martin, N., Martinez, J., Pellicer, N., Pellicer, A., & Herraiz, S. (2023). Single intraovarian dose of stem cell- and platelet-secreted factors mitigates age-related ovarian infertility in a murine model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(5), 561.e1-561.e17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.01.018>
- Munther, A. A., Mohammed, T. R., & Majeed, A. F. (2022). Effect of Culture Medium on in vitro Fertilization in Local Iraqi Ewes. *Archives of Razi Institute*, 77(5), 1561-1567. <https://doi.org/10.22092/ari.2022.357978.2124>
- Martínez-Rojero, R., Mejía-Villanueva, O., Zarco-Quintero, L., Mastache-Lagunas, A., & Reyna-Santamaría, L. (2017). Evaluation of a superovulation protocol for embryo transfer in Creole ewes from the Guerrero Mountain. *Abanico Veterinario*, 7(3), 30-36. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.3>
- Peña, J. M., Góngora, O. A., & Estrada, L. J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 942-954. <https://doi.org/10.21897/rmvz.439>
- Sills, E. S., Rickers, N. S., Li, X., & Palermo, G. (2018). First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecological Endocrinology*, 34(9), 756-760. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1445219>
- Sills, E. S., & Wood, S. H. (2019). Autologous activated platelet-rich plasma injection into adult human ovary tissue: molecular mechanism, analysis,

and discussion of reproductive response. *Bioscience Reports*, 39(6), BSR20190805. <https://doi.org/10.1042/BSR20190805>

Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O. E., Carou, N., Alberio, R. H., Abecia, J. A., & Palacín, I. (2008). Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 227-237. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.020>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fisiología reproductiva de la oveja

2.1.1. Dinámica folicular y ciclo estral

El ciclo estral de la oveja se caracteriza por una serie de fases y eventos que ocurren en el sistema reproductivo. La dinámica folicular se refiere a los cambios en el desarrollo y la actividad de los folículos ováricos.

El ciclo estral en ovejas tiene una duración aproximada de 16 a 17 d durante la época reproductiva con pequeñas diferencias entre razas en no más de 1 d (Bartlewski et al., 2011). El ciclo comprende cuatro etapas (proestro, estro, metaestro y diestro), también se puede dividir en dos fases (folicular y lútea). Gordon (2004) menciona que, la fase folicular (proestro y estro) inicia con un aumento en la actividad hormonal en donde se produce el crecimiento del folículo preovulatorio, así como la expresión del comportamiento estral presentando receptividad a la monta; en esta fase ocurre un pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) dando como resultado la ovulación. Además, señala que, la fase lútea (metaestro y diestro) inicia con la ovulación, la cual se considera una etapa de transición para las dos fases; en esta se da la formación del cuerpo lúteo (CL) en donde las prostaglandinas regulan su función asegurando una producción adecuada de progesterona para preparar al útero para una posible implantación, que en caso de no presentarse se convierte en CL en regresión.

La dinámica folicular como mencionan Espinoza-Villavicencio et al. (2007), está regulada por funciones endocrinas y factores de crecimiento (GF), se caracteriza por el crecimiento y regresión de los folículos hasta que estos lleguen a ovular, generalmente en cada ciclo ocurren entre dos o tres oleadas foliculares, donde algunos folículos que se encuentran en reposo entran a reclutamiento para continuar su crecimiento. Finalmente, en ovejas, uno o dos folículos se convierten en dominantes, mientras que los demás sufren atresia.

En detalle, la dinámica folicular se divide en reclutamiento, selección y dominancia. Driancourt (1991) y Espinoza-Villavicencio et al. (2007) describen las primeras dos fases de la siguiente manera. En la primera, una oleada de folículos primordiales crece por acción de algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) hasta llegar a un estado preantral donde se mantendrán en reposo hasta que se vuelven dependientes de las gonadotropinas, es decir, serán reclutados por el aumento en las concentraciones (1.8 a 3.2 ng mL⁻¹, aprox.) de la hormona folículo estimulante (FSH) en sangre; por cada ciclo ovárico de la oveja se rescatan solo un grupo de folículos antrales que son meióticamente competentes, mientras que los demás sufren atresia. En la segunda, señalan que, de forma pasiva el folículo o los folículos más grandes para el caso de las ovejas (1 a 4) inhiben de forma indirecta el crecimiento de los folículos reclutados de menor tamaño, al reducir la FSH por debajo del umbral necesario para su sobrevivencia; resultando en la selección de él o los folículos dominantes, estos folículos producirán estradiol para estimular el crecimiento y la diferenciación de las células, e inhibina para evitar la sobreestimulación. Finalmente, está la etapa de dominancia folicular. Según Tabarez y Grajales (2021), en esta fase ya se ha seleccionado el mejor folículo para continuar desarrollándose, aunque no existe evidencia de que efectivamente esa dominancia sea total; se ha encontrado que se pueden seleccionar de 4 a 5 folículos, donde aquellos folículos antrales a la par de los preovulatorios pueden ovular, como ocurre en ovejas prolíficas.

2.1.2. Foliculogénesis

La foliculogénesis es un proceso en el cual los folículos crecen y se desarrollan desde la etapa de folículos primordiales hasta llegar a estadio preantral y antral, en donde la mayoría culminan en atresia y, rara vez llegan a ovular (López et al., 1993). Los ovarios de las ovejas tienen de 12,000 a 86,000 folículos pequeños y de 100 a 400 en desarrollo; estos folículos tardan aproximadamente seis meses en pasar de 0.06 mm hasta la etapa preovulatoria (6-8 mm) (Cahill, 1981).

Hafez y Habez (2002) describen que, en la foliculogénesis de las ovejas, el estro está influenciado por uno o dos folículos de mayor tamaño al secretar más estrógenos. Asimismo, mencionan que, el crecimiento final de estos oscila entre 12 a 34 d en donde serán FSH/LH dependientes; el crecimiento folicular se lleva a cabo mediante procesos como la proliferación y diferenciación celular controlada por hormonas de las células de la teca y granulosa. Este proceso resulta en folículos con mayor producción de estradiol susceptibles a LH; los folículos con un diámetro de 2 mm se reclutan, se seleccionan e inmediatamente se detiene el reclutamiento folicular.

2.1.3. Factores que afectan el desarrollo folicular

Diversos factores intervienen en el crecimiento folicular, y a su vez afectan el progreso en programas de superovulación. La nutrición adecuada es esencial para la salud reproductiva. Sin embargo, las vías por las cuales interfiere la nutrición aún no se han esclarecido por completo, se sabe que hormonas metabólicas como la insulina y el factor de crecimiento insulínico (IGF), interactúan con las gonadotropinas en las gónadas; tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2) colaboran sinérgicamente con las gonadotropinas para estimular la proliferación celular (Webb et al., 1999).

En programas de superovulación existen efectos de factores asociados con las gonadotropinas y protocolos que se utilizan. Por ejemplo, en extractos de pituitaria utilizadas, se sugiere que la FSH sea pura o que contenga una baja cantidad de LH, para que exista una mejor respuesta superovulatoria; además en un estudio en bovinos se encontró que la FSH recombinante bovina de acción extralarga (bscrFSH) en una dosis única, mejora la respuesta ovárica (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Por otra parte, Karl et al. (2023) demostraron que dosis altas de FSH causan alteraciones en las funciones celulares del cúmulo y los oocitos, especialmente en ausencia de un estímulo ovulatorio, dando como resultado, complejos cumulo-ovocito que no pueden utilizarse en fecundación *in vitro*.

Sejian et al. (2019) mencionan que otro factor que influye en la reproducción es el estrés por calor, ya que interfiere a nivel de genes; entre ellos se encuentran los que codifican la hormona de crecimiento (GH), hormona liberadora de gonadotropinas, así como los receptores para, hormona de crecimiento (GHR), hormona folículo estimulante (FSHR), progesterona (PR) y, estradiol, entre otros. Estos genes participan en el crecimiento fisiológico del animal.

2.2. Estimulación folicular con gonadotropinas exógenas

2.2.1. Gonadotropina coriónica equina (eCG)

Como bien sostienen Hafez y Habez (2002), la eCG es una glicoproteína placentaria derivada del suero de yeguas gestantes, se secreta entre los 40 y 70 d en donde alcanza concentraciones séricas máximas; posteriormente ocurre un descenso que coincide con la degeneración de las copas endometriales asociadas, además tiene actividad biológica análoga a la FSH y LH. Debido a las capacidades de la eCG, se ha utilizado en ovinos en dosis moderadas de 200 a 500 UI, para inducir el desarrollo folicular y la ovulación, sobre todo en periodos de anestro; la eCG tiene una vida media larga (21 h) atribuible a la presencia significativa de ácido siálico que la protege de la degradación hepática, lo que posibilita su aplicación en una inyección única (Murphy, 2012).

A pesar de que la eCG se utiliza desde 1951 en programas de sincronización y superovulación, su respuesta es variable. Azawi y Al-Mola (2010) encontraron un menor número de cuerpos lúteos (CLs) en ovejas superovuladas con eCG (1 200 UI) que las que recibieron FSH (4.41 vs. 8.75, respectivamente); además, encontraron gran cantidad de folículos sin ovular (2.33, $p<0.05$). Por su parte, Şen (2020), en un estudio realizado en temporada reproductiva, no encontró diferencias significativas ($p>0.05$) en el número de folículos en ovejas tratadas con eCG (600 UI) y las que recibieron inyecciones de FSH. Mientras que, en el mismo estudio, se encontró que, los folículos con eCG fueron más grandes y el número de CLs totales fue mayor que con FSH (1.5 vs. 0.7, respectivamente),

resultando en una respuesta similar para eCG en época no reproductiva con 1.2 CLs.

2.2.2. Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH es una glicoproteína gonadotrópica que se secreta en la adenohipófisis, fue descubierta en la década de los 50, donde se hicieron los primeros aislamientos a partir de ovinos, bovinos, porcinos y humanos; en la hembra se une a los receptores de FSH presentes en la membrana de las células de la granulosa en donde su principal función es estimular el crecimiento folicular, así como la producción de estrógenos en el ovario (Ando, 2016).

En la reproducción animal asistida de ovejas, la FSH se utiliza principalmente en programas de superovulación en dosis decrecientes en conjunto con la aplicación de progesterona, sin embargo, aún no se tienen resultados favorables. Se ha reportado una respuesta superovulatoria de 80 % mediante la aplicación de FSH (40–40, 30–30, 20–20 y 10–10, mg), tasa de ovulación de 7.8, y 4.7 embriones transferibles en época no reproductiva (Luna-Palomera et al., 2019). Mientras que en la época reproductiva en un estudio de Azawi y Al-Mola (2010), con aplicación de FSH (350, 250, 200 y 150 UI) reportaron un promedio de 8.75 CLs, y 4.83 embriones recuperados. Recientemente en ovejas productoras de carne, se compararon dos tipos de FSH, se reportaron 13.9 CLs y 9.4 embriones transferibles con Folltropin-V, mientras que con FSH-P se reportó 10.6 y 5.4, respectivamente (Aybazov et al., 2023).

2.2.3. Combinación de FSH-eCG

La FSH-eCG se pueden utilizar en conjunto en programas reproductivos, sin embargo, frecuentemente se encuentran algunas desventajas. Por ejemplo, en un estudio se aplicaron 200 mg de FSH en el tratamiento 1, mientras que en el 2 se aplicaron 200 mg de FSH más 300 UI de eCG. Con respecto a la respuesta superovulatoria, tasa de ovulación, tasa de recuperación y ovocitos fertilizados no hubo diferencias significativas ($p>0.5$), sin embargo, en embriones

transferibles hubo una mayor respuesta con FSH que con FSH+eCG (4.7 vs. 1.1, respectivamente) (Luna-Palomera et al., 2019).

2.3. Uso de plasma rico en plaquetas (PRP) como estimulador del desarrollo folicular

2.3.1. Definición y composición del plasma rico en plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un compuesto biológico regenerativo que tiene aplicaciones en diferentes campos médicos, como cirugía plástica, trastornos musculoesqueléticos, dermatología, odontología y recientemente se ha incluido en la estimulación y rejuvenecimiento ovárico (Sills & Wood, 2023).

El PRP se obtiene de la sangre que se divide en, eritrocitos (41 %), plasma (55 %) y plaquetas más leucocitos (4 %), después de la centrifugación el plasma presenta una concentración de 5 a 10 veces más de plaquetas y otras moléculas (Holcomb et al., 2015). Las plaquetas son células sin núcleo encargadas de prevenir las hemorragias; además, en el PRP también están contenidos una gran cantidad de factores de crecimiento (Cuadro 1), citoquinas, quimiocinas, factores de coagulación e inhibidores, proteínas y mediadores inmunes (Atkinson et al., 2021).

Los componentes presentes en el PRP han demostrado tener acción en la síntesis del colágeno, crecimiento y proliferación celular, angiogénesis, quimiotaxis de fibroblastos y de células inmunitarias, activación de macrófagos, diferenciación de células epiteliales y, migración y mitosis de células endoteliales, entre otros (Seckin et al., 2022). Algunos de los GF que tienen actividad a nivel folicular son los siguientes: el FGF incrementa de manera significativa la proliferación de células tecales, así como de la granulosa y del estroma (Pintucci et al., 2002). El PDGF potencia la migración de células estromales desde las fimbrias hasta el folículo ovulatorio (Yeh et al., 2016). El SDF-1 α se ha asoció con folículos de mayor tamaño (Holt & Col, 2006) y el TGF- β 1 participa en la

regulación de la sobrevivencia del folículo además de la apoptosis y angiogénesis (Dragovic et al., 2007).

Cuadro 1. Principales componentes del plasma rico en plaquetas (PRP), adaptado de Seckin et al. (2022).

Factores de crecimiento (GF)	-Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) -Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) -Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) -Factor de crecimiento epidérmico (EGF) -Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) -Factor de crecimiento tegumentario-β1 (TGF-β1) -Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GCSF)	Quimiocinas y citocinas	-Interleucina-1β (IL-1β) -Interleucina-8 (IL-8) -Ligando de CD40 -Factor plaquetario 4 (PF4) -Proteína inflamatoria de macrófagos-1α (MIP-1α) -Factor-1α derivado de células estromales (SDF-1α) -Ligando de quimiocina con motivo C-C 2 y 5 (CCL2, CCL5)
Proteínas adhesivas	-Factor de von Willebrand (FVW) -Fibrinógeno -Trombospondina-1 y -2 -Laminina-8	Factores de coagulación y sus inhibidores	-Factor V -Factor IX -Antitrombina -Factor S -Proteasa nexina-1 y -2

2.3.2. Obtención y procesamiento del plasma rico en plaquetas

El PRP se obtiene de la sangre, que puede ser autóloga o heteróloga, la cual se coloca en tubos con anticoagulante, generalmente con citrato, después por medio de centrifugación diferencial se eliminan los glóbulos rojos y blancos, para

finalmente lograr altas concentraciones de plaquetas en el plasma; en la mayoría de los estudios con PRP se prepara de forma local, aunque existe comercialmente. Es importante saber que, a causa de esta variación, puede contener una pequeña contaminación de glóbulos rojos y blancos que ocasionen efectos negativos (Atkinson et al., 2021).

La forma de preparación es variable en cada uno de los trabajos publicados. Moreno et al. (2015) mencionan que, todas las preparaciones deben ser en condiciones asépticas para evitar la contaminación de la muestra, ya que el producto se inyecta en el organismo, se debe realizar preferentemente en cabinas de flujo laminar sobre todo cuando requiere un proceso de activación. Además, estos mismos autores argumentan que, no siempre se obtiene el mismo volumen de plasma, por lo que se debe contar en el tubo, la fracción de PRP a partir de la fracción de glóbulos blancos hacia arriba. Algunos estudios presentan, entre otras variaciones, una sola centrifugación mientras que otros realizan dos centrifugaciones con el objetivo de concentrar más las plaquetas, a continuación, se describen diferentes formas de preparación del PRP reportadas en algunos estudios.

En uno de los primeros estudios que se reportaron con aplicación intraovárica de PRP, Sills et al. (2018) indican que después de extraer 8 mL de sangre, se centrifugó a temperatura ambiente a $1,500 \times g$ por 5 minutos en donde la sangre se separó en 3 fases (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plasma), se retiraron 3 mL del sobrenadante, ya que se considera plasma pobre en plaquetas, la parte restante se consideró PRP. Chang et al. (2019), en la utilización de PRP para infusión uterina procesaron la muestra por doble centrifugación, se recolectaron 15 mL de sangre en jeringas con citrato dextrosa, posteriormente se centrifugó a $300 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, después se transfirió el plasma y se centrifugó a $700 \times g$ por 15 minutos y se descartaron tres cuartas partes del sobrenadante quedando la fracción de PRP. Mientras que en otro estudio el procedimiento fue diferente a los anteriores sobre todo en la forma de centrifugar, se menciona que la sangre se recolectó en bolsas con citrato-fosfato-dextrosa-

adenina, y se centrifugó a $100 \times g$ por 30 minutos, se recolectó el plasma total y se llevó a una segunda centrifugación a $1,500 \times g$ durante 10 minutos en donde se consideró el primer tercio inferior del tubo como PRP (Cremonesi et al., 2020a).

2.3.3. Activación y posible mecanismo de acción del plasma rico en plaquetas

Las plaquetas son fragmentos de células conocidos como megacariocitos. Estos presentan una gran cantidad de receptores para glicoproteínas, integrinas y proteínas G, que, al unirse a ellas, inducen la señalización intracelular resultando en un aumento significativo en los niveles de calcio citoplasmático, que a su vez provoca que los gránulos liberen su contenido (factores de crecimiento, etc.) (Atkinson et al., 2021).

La activación de plaquetas de igual manera que el método de preparación presenta variaciones entre estudios (Figura 1). Por ejemplo, Sfakianoudis et al. (2018) y (2019) no reportaron una activación química de plaquetas, sin embargo, tuvieron resultados significativos a favor del PRP. Además, Seckin et al. (2022) mencionan que la activación no es necesaria, ya que las plaquetas se pueden activar de forma mecánica con el simple hecho de realizar la centrifugación. Por otro lado, Dhurat y Sukesh (2014) mencionan que al realizar la inyección intraovárica y ser un tejido blando, estas se pueden activar con el colágeno existente en el ovario de forma natural. Lo anterior es contrario a otros autores quienes reportan la activación química de las plaquetas para que estas puedan liberar los factores de crecimiento. Hosseini et al. (2017) realizaron una activación con trombina para coagular el PRP, posteriormente el coágulo se sometió a otra centrifugación a $4000 \times g$ por 5 minutos, el sobrenadante se consideró PRP final. Mientras que Hsu et al. (2020) utilizaron 10 % de gluconato como activador del PRP.

El mecanismo de acción en el ovario aún no está claro, aunque existen algunas posibles respuestas. Al aplicar PRP intraovárico, los ligandos de los factores de crecimiento actúan mediante sus receptores participando en la diferenciación

celular, además se cree que existe presencia de células madre ováricas que puedan producir ovocitos (Johnson et al., 2004). También se ha considerado que las respuestas favorables se pueden deber a que el PRP tiene acción proangiogénica, es decir, que estimula los vasos estromales que irrigan los folículos primordiales en el ovario (Kakudo et al., 2014).

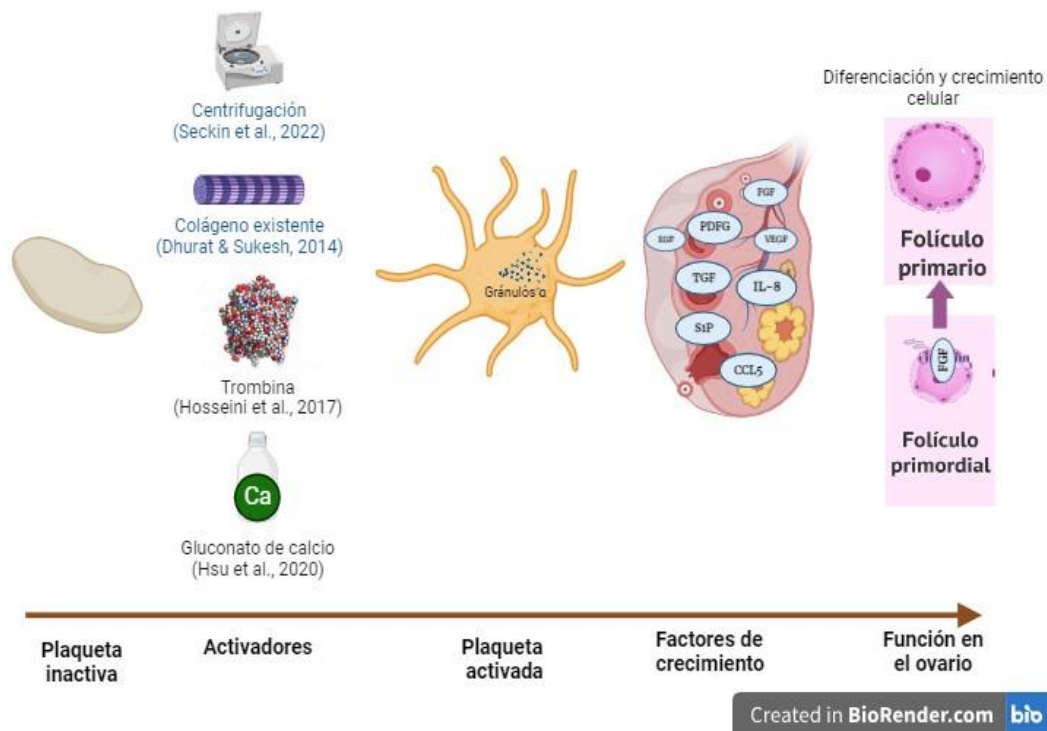


Figura 1. Activación de plaquetas y liberación de factores de crecimiento.

2.3.4. Aplicaciones clínicas del PRP en la reproducción animal

Aparte de la aplicación intraovárica de PRP, que se explicará más adelante, también se han realizado estudios mediante infusión uterina de este compuesto. En un experimento se analizaron nueve ratones con PRP humano, en los que se provocaron lesiones en los cuernos uterinos. Posteriormente, en 7 d se inyectó PRP unilateralmente, con una concentración de $1,871,000 \text{ células } \mu\text{L}^{-1}$ en el cuerno derecho. Los resultados de este estudio se evaluaron por exámenes histológicos 7 d después, se encontró que en los cuernos uterinos sin aplicación de PRP hubo degeneración del endometrio, pérdida de luz y poco estroma,

contrario a los que recibieron el tratamiento, ya que en este se detectaron glándulas proliferadas y células del estroma endometrial (Kim et al., 2020).

En equinos también se ha reportado el uso de PRP con fines reproductivos. En una investigación se inyectaron 15 mL de PRP vía intrauterina (12 a 48 h antes de la inseminación) a 18 yeguas con un manejo reproductivo anterior fallido, se demostró que el uso de esta técnica no presentó efectos negativos, al contrario, se registró una tasa de preñez de 61 % (Pasch et al., 2021). En otro estudio con PRP liofilizado (las muestras de PRP se sometieron a una inactivación de posibles patógenos en cámaras con rayos UV y riboflavina), se compararon tres tratamientos; el primero (n = 32) fue el grupo control, el segundo (n = 32) recibió 20 mL de PRP fresco y el tercero (n = 9) 20 mL de PRP liofilizado; los dos últimos se aplicaron por infusión en el útero; se realizó el apareamiento mediante celo y monta natural, 30 d después se hizo la detección de la preñez por ultrasonido (Dawod et al., 2021). Estos autores observaron que las yeguas en el grupo 3 tardaron menos días en entrar en estro (7.66) en comparación con el grupo 2 (9.62) y el grupo 1 (21.06); con el PRP se obtuvo un grosor en el endometrio mayor en comparación con el PRP liofilizado y grupo control (7.33 vs. 6.86 y 5.87 mm, respectivamente); la tasa de preñez resultó favorecida por el PRP liofilizado (66 %), seguido por PRP puro (50 %) y finalizando con el grupo control (6.25 %); no se registraron diferencias significativas para diámetro del folículo; además, la edad y número de partos de la hembra no interfirió entre tratamientos. Lo anterior, demuestra los beneficios de dichas técnicas en los tratamientos de yeguas con problemas de fertilidad.

2.3.5. Aplicación intraovárica de plasma rico en plaquetas

Referente a la aplicación intraovárica en humanos, el primer estudio que reportó datos sobre formación de blastocistos en respuesta a este tratamiento fue realizado por Sills et al. (2018). Estos autores evaluaron a cuatro mujeres con pronóstico de fertilidad pobre, se inyectaron 5 mL por cada ovario, se recuperaron de 4 a 7 ovocitos por cada paciente después de 10 d. Recientemente, en otro estudio con un total de 469 mujeres infértiles se aplicaron de 2 a 4 mL por ovario

con una concentración de 900,000 plaquetas μL^{-1} , se registró una disminución significativa en la concentración de FSH (5.6 mUI mL^{-1}) en todas las mujeres de 32 a 46 años, además se registró 24 a 25 % de embarazo para cada uno de los grupos de edad (32-27, 38-42, 43-46 años) (Fraidakis et al., 2023).

En lo que se refiere a animales, se han realizado pruebas piloto en ratas, conejos, y vacas con resultados prometedores. Marchante et al. (2023) evaluaron el efecto del PRP intraovárico en ratones (simulando a mujeres), se utilizaron 36 ratones divididos en 3 grupos (8, 20 y 36 semanas de edad), se aplicaron 10 μL por cada ovario; los resultados fueron favorables para todos los grupos de edad ya que se registró la activación de los folículos, así como un aumento en el número de folículos primordiales en ratones menopaúsicos. En un estudio reciente con 24 conejas, se aplicaron 0.5 mL de PRP en complemento a tratamientos con D-galactosa, se encontró mediante análisis histopatológico un aumento en los folículos para el grupo con PRP en comparación con el control (45.54 vs. 38.65, respectivamente); además, hubo una disminución significativa del número de folículos atrésicos a favor del PRP (20 vs. 29) dos semanas después de la aplicación (Al-Alywi et al., 2023).

En grandes especies hasta donde se sabe, solo se han reportado dos estudios con aplicación intraovárica de PRP. Cremonesi et al. (2020a) aplicaron 5 mL de PRP a ocho vacas Holstein en el ovario derecho con una concentración de 1×10^9 plaquetas mL^{-1} y no detectaron diferencias significativas antes de la superovulación, sin embargo, posterior a ello sí hubo diferencias en número de folículos comparado con el grupo control (20 vs. 11.33), de igual manera que para el número de blastocistos con 6.63 para el grupo control y 14.75 para ovarios tratados con PRP. Más tarde Cremonesi et al. (2020b), en un segundo estudio en vacas con hipofunción ovárica, se aplicaron 5 mL a cinco individuos, pero ahora en cada ovario, mientras se tuvo otro grupo de seis vacas control con suero fisiológico; los resultados fueron favorables en un aumento en las concentraciones de progesterona después de 4 semanas, finalmente se detectó

preñez en 4 de las 5 vacas que recibieron el tratamiento, mientras que ninguna de las vacas testigo resultó gestante.

2.4. Literatura citada

- Ando, H. (2016). Follicle-Stimulating Hormone. En Y. Takei, Hironori, A., & Kazuyoshi, T. (Eds.), *Handbook of Hormones* (pp. 101). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00129-X>
- Al-Alywi, A. S., Al-Zubaidi, S. F., & Al-Yasaei, A. M. R. (2023). Injection of Platelet Rich Plasma Intra-Ovarian to Treat Inactive Ovaries in Rabbits. *International Journal of Veterinary Science*, 12(4), 539-544. <https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2022.222>
- Atkinson, L., Martin, F., & Sturmey, R. G. (2021). Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: too much too soon? *Human Reproduction*, 36(7), 1737-1750. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab106>
- Aybazov, M., Selionova, M., Trukhachev, V., Malorodov, V., Yuldashbayev, Y., & Easa, A. A. (2023). Embryo production and transplantation in non-breeding season of meat sheep breeds by stimulating superovulation with different follicle-stimulating hormone preparations. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(2):230-237. <https://doi.org/10.1111/rda.14279>
- Azawi, O. I., & Al-Mola, M. K. M. A. (2010). A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 799-801. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9489-2>
- Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>
- Chang, Y., Li, J., Wei, L. N., Pang, J., Chen, J., & Liang, X. (2019). Autologous platelet-rich plasma infusion improves clinical pregnancy rate in frozen embryo transfer cycles for women with thin endometrium. *Medicine*, 98(3), e14062. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014062>
- Cremonesi, F., Bonfanti, S., Idda, A., & Lange-Consiglio, A. (2020a). Improvement of embryo recovery in Holstein cows treated by intra-ovarian platelet-rich plasma before superovulation. *Veterinary Sciences*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010016>
- Cremonesi, F., Bonfanti, S., Idda, A., & Lange-Consiglio, A. (2020b). Platelet Rich Plasma for Regenerative Medicine Treatment of Bovine Ovarian Hypofunction. *Frontiers in Veterinary Science*, 13(7), 717. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00517>
- Dawod, A., Miro, J., Elbaz, H. T., Fahmy, H., & Abdoon, A. S. (2021). Effect of intrauterine infusion of equine fresh platelets-rich plasma (PRP) or lyophilized PRP (L-GFequina) on ovarian activity and pregnancy rate in

- repeat breeder purebred Arabian mares. *Animals*, 11(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/ani11041123>
- Dhurat, R., & Sukesh, M. S. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7, 189-197. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>
- Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Thompson, J. G., Armstrong, D. T., & Gilchrist, R. B. (2007). Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biology of Reproduction*, 76, 848-857. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057471>
- Espinoza-Villavicencio, J. L., Ortega, P. R., Palacios, E. A., Valencia, M. J., & Aréchiga, F. C. F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93-99. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000200006&lng=es&tlng=es
- Fraidakis, M., Giannakakis, G., Anifantaki, A., Skouradaki, M., Tsakoumi, P., Bitzopoulou, P., Kourpa, S., Zervakis, A., & Kakouri, P. (2023) Intraovarian Platelet-Rich Plasma Injections: Safety and Thoughts on Efficacy Based on a Single Centre Experience With 469 Women. *Cureus* 15(5): e38674. <https://doi.org/10.7759/cureus.38674>
- García, S. A. (2015). *Respuesta ovulatoria y embrionaria con FSH y FSH/LH en combinación de eCG en ovejas pelibuey*. [Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Posgraduados]. Repositorio institucional del Colegio de Posgraduados: <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/2689?locale-attribute=es>
- Gordon, I. (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI Publishing.
- Hafez, E. S. E., & Habez, B. (2002). Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. *Reproducción e inseminación artificial en animales 4ª. ed.* (pp. 68-81), México: McGraw-Hill Interamericana.
- Holcomb, J. B., Tilley, B. C., Baraniuk, S., Fox, E. E., Wade, C. E., Podbielski, J. M., et al. (2015). Transfusion of plasma, platelets, and red blood cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 ratio and mortality in patients with severe trauma: the PROPPR randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 313(5), 471-482. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.12>
- Holt, J. E., Jackson, A., Roman, S. D., Aitken, R. J., Koopman, P., & McLaughlin, E. A. (2006). CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary

- follicle transition in the neonatal mouse ovary. *Developmental Biology*, 293, 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.012>
- Hosseini, L., Shirazi, A., Naderi, M. M., Shams-Esfandabadi, N., Borjian, B. S., Sarvari, A., Sadeghnia, S., Behzadi, B., & Akhondi, M. M. (2017). Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(4), 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.04.007>
- Hsu, C. C., Hsu, L., Hsu, I., Chiu, Y. J., & Dorjee, S. (2020). Live birth in a woman with premature ovarian insufficiency receiving ovarian administration of platelet-rich plasma (PRP) in combination with gonadotropin: a case report. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 1-5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00001>
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979), 145-150. <https://doi.org/10.1038/nature02316>
- Kakudo, N., Morimoto, N., Kushida, S., Ogawa, T., & Kusumoto, K. (2014). Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. *Medical Molecular Morphology*, 47(2), 83-89. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0045-9>
- Karl, K. R., Schall, P. Z., Clark, Z. L., Ruebel, M. L., Cibelli, J., Tempelman, R. J., Latham, K. E., & Ireland, J. J. (2023). Ovarian stimulation with excessive FSH doses causes cumulus cell and oocyte dysfunction in small ovarian reserve heifers. *Molecular Human Reproduction*, 29(10), gaad033. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaad033>
- Kim, J. H., Park, M., Paek, Y. J., Lee, W-S., Song, H., & Lyu, S. W. (2020). Intrauterine Infusion of Human Platelet-Rich Plasma Improves Endometrial Regeneration and Pregnancy Outcomes in a Murine Model of Asherman's Syndrome. *Frontiers in Physiology*, 11, 105. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00105>
- López-Sebastián, A., J. Santiago-Moreno, J. S. M., G., de Bulnes, A., & García-López, M. (1993). Aspectos Característicos de La Fisiología Reproductiva de la Oveja. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*, 3(2). Recuperado a partir de: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14102>
- Luna-Palomera, C., Macías-Cruz, U. & Sánchez-Dávila, F. (2019). Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 1283-1288. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01801-9>

- Marchante, M., Buigues, A., Ramirez-Martin, N., Martinez, J., Pellicer, N., Pellicer, A., & Herraiz, S. (2023). Single intraovarian dose of stem cell- and platelet-secreted factors mitigates age-related ovarian infertility in a murine model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(5), 561.e1-561.e17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.01.018>
- Moreno, R., Gaspar Carreño, M., Jiménez Torres, J., Alonso Herreros, J. M., Villimar, A., & López Sánchez, P. (2015). Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora [Methods to obtain platelet-rich plasma and osteoinductive therapeutic use]. *Farmacia Hospitalaria*, 39(3), 130-136. <https://doi.org/10.7399/fh.2015.39.3.7998>
- Murphy, B. D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9(3), 223-230. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6057f7783717068b46e2>
- Pasch, L., Schmidt, A., & King, W. (2021). Clinical observations after pre breeding intrauterine plasma infusion in 18 mares inseminated with thawed frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 99, 103389. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103389>
- Pintucci, G., Froum, S., Pinnell, J., Mignatti, P., Rafii, S., & Green, D. (2002). Trophic effects of platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thrombosis and Haemostasis*, 88(5), 834-842. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613311>
- Seckin, S., Ramadan, H., Mouanness, M., Kohansieh, M., & Merhi, Z. (2022). Ovarian response to intraovarian platelet-rich plasma (PRP) administration: hypotheses and potential mechanisms of action. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39, 37-61. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02385-w>
- Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Rashamol, V. P., Pragna, P., Devaraj, C., & Bhatta, R. (2019). Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. *Small Ruminant Research*, 173, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.02.009>
- Şen, U. (2020). Real-time assessment of the superovulatory effect of FSH and eCG with laparoscopy at different seasons in Akkaraman ewes. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(2), 291-299. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.133644>
- Sfakianoudis, K., Simopoulou, M., Nitsos, N., Rapani, A., Pantou, A., Vaxevanoglou, T., Kokkali, G., Koutsilieris, M., & Pantos, K. (2019). A case series on platelet-rich plasma revolutionary management of poor

responder patients. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 84(1), 99-106. <https://doi.org/10.1159/000491697>

- Sfakianoudis, K., Simopoulou, M., Nitsos, N., Rapani, A., Pappas, A., Pantou, A., Chronopoulou, M., Deligeoroglou, E., Koutsilieris, M., & Pantos, K. (2018). Autologous Platelet-Rich Plasma Treatment Enables Pregnancy for a Woman in Premature Menopause. *Journal of Clinical Medicine*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/jcm8010001>
- Sills, E. S., Rickers, N. S., Li, X., & Palermo, G. (2018). First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecological Endocrinology*, 34(9), 756-760. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1445219>
- Sills, E. S., & Wood, S. H. (2023). Multichannel Recovery Potential with Activated Autologous Intraovarian Platelet-Rich Plasma and Its Derivatives. *Medicines*, 10(7), 40. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines10070040>
- Tabarez, A., & Grajales, H. (2021). Ovinos. En A. Galina, C. (Ed.), *Reproducción de los animales domésticos*. UNAM.
- Webb, R., Gosden, R., Telfer, E., & Moor, R. (1999). Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science*, 68(2), 257-284. <https://doi.org/10.1017/S1357729800050293>
- Yeh, C-H., Chen, P-C., Chen, C-H., Hsu, C-F., Huang, R-L., Ding, D-C., & Chu, T-Y. (2016). Platelet-derived growth factor in the ovarian follicle attracts the stromal cells of the fallopian tube fimbriae. *Plos one*, 11, e0158266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158266>

This chapter was sent to the Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias in October 2023 as a technical note.

3. FOLLICULAR RESPONSE TO INTRAOVARIAN APPLICATION OF AUTOLOGOUS PLATELET-RICH PLASMA IN EWES

Andrea Sánchez-Chávez ^a

Raymundo Rangel-Santos ^{a*}

Agustín Ruíz-Flores ^a

Demetrio Alonso Ambriz-García ^b

Fausto Cremonesi ^c

Ana Lange-Consiglio ^c

Alfredo Lorenzo-Torres ^a

Juan González-Maldonado ^d

^a Universidad Autónoma Chapingo, Posgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia, Estado de México, C.P. 56230, México.

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biología de la Reproducción, Ciudad de México, C.P. 09340, México.

^c Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, LODI, 26900, Italy.

^d Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ciencias Agrícolas, Mexicali, C. P. 21705, México.

*Corresponding author: rangelr@correo.chapingo.mx

Abstract:

Platelet-rich plasma (PRP) contains a high concentration of growth factors, which positively stimulates endometrial and follicular growth. The objective was to evaluate the ovarian follicular population after the intraovarian application of PRP. The study was conducted at Universidad Autónoma Chapingo in México. Eleven Dorper ewes were used. Blood samples were collected from the jugular vein in tubes containing sodium citrate. The samples were centrifuged at 100 *g* for 30 min, and the serum was centrifuged at 1,500 *g* for 10 min. Only the lower third of the tube with a higher platelet concentration ($12,500 \times 10^6$ platelets mL^{-1}) was kept. Through laparoscopy, 50 μL of PRP was administered to the right ovary of each ewe (PRP), while the left ovary received 50 μL of saline solution and was considered the control (TES). The population of follicles ≥ 2 mm in size on both ovaries was determined weekly for nine weeks with an ultrasound and a 7.5 MHz rectal transducer. The number of follicles was analyzed with the MIXED procedure of SAS. The follicular population was similar ($p > .05$) between PRP and control ovaries in weeks 0, 1, and 2. However, there were significant differences ($p < .05$) for weeks 3 (7.16 ± 0.52 vs. 5.98 ± 0.48), 4 (10.50 ± 0.52 vs. 6.13 ± 0.48), 5 (8.70 ± 0.52 vs. 5.46 ± 0.48), 6 (8.43 ± 0.54 vs. 5.91 ± 0.54), 7 (9.09 ± 0.49 vs. 6.27 ± 0.50), 8 (8.45 ± 0.49 vs. 6.09 ± 0.49) 9 (9.08 ± 0.46 vs. 7.44 ± 0.46). In conclusion, the intraovarian application of autologous PRP increased the follicular population from weeks 3 to 9 post-treatment.

Keywords: Platelets, Ewes, Antral follicles

Received: 17/10/2023

The growth of small follicles depends on follicle stimulating hormone (FSH). High concentrations of FSH stimulate the development of follicular waves [1], but these levels decrease within the following 3 to 5 days [2]. However, even under those conditions, one or several follicles develop and become dominant [3]. These follicles might develop to a preovulatory stage and even ovulate if they coincide with a low progesterone concentration.

The total follicle population at different stages of development of the sheep ovaries ranges from 12,000 to 86,000 [4]. Nonetheless, few of them reach the preovulatory stage and ovulate due to the processes of atresia and selection [5]. Response to hormonal treatments influences application of assisted reproductive technologies, and such response has been associated with the population of antral follicles present on the ovarian surface at the time of its application [6,7]. Several alternatives have been evaluated to modify the follicle population, including nutritional manipulation [8], genetics [4], and application of different sources of exogenous gonadotropins [9]. Nonetheless, results are still unreliable, and other alternatives should be considered. Platelet-rich plasma (PRP) may be a feasible alternative for improving outcomes of mammalian superovulation programs by increasing the follicular population. PRP is a compound obtained by centrifuging blood and removing red and white blood cells [10]; the result is a platelet-rich fraction. Platelets contain a high concentration of growth factors, such as PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β), VEGF (vascular endothelial growth factor), and cytokines, such as PF4 (platelet 4) and CD40L contained mainly in α granules [11], and have positive effects on gestation and stimulation of endometrial and follicular growth. A recent study found that intraovarian PRP increased the follicular population ($p < .05$) in supplemented cows in gonadotropin programs relative to untreated cows (20.00 ± 9.17 and 11.33 ± 2.89 , respectively) [12]. However, the study of intraovarian PRP application effects on sheep reproductive performance has received little attention. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of intraovarian application of PRP on the population of ovarian antral follicles ≥ 2 mm size in ewes.

The present research utilized eleven healthy multiparous, non-pregnant Dorper ewes with 3.5 average body condition score. The ewes were fed a balanced ration according to their physiological requirements, and water was offered *ad libitum*. The study was conducted on the sheep farm of Universidad Autónoma Chapingo, located in the central part of México. The experiment was conducted according to the guidelines of the Ethical Committee (No. CECBS23-13) of Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico.

For PRP preparation, 2.7 mL of blood was obtained from the jugular vein of each ewe with sterile needles and sterile vacutainer tubes, containing sodium citrate as an anticoagulant. The blood samples were stored at 4°C from collection until PRP administration to animals, not exceeding more than 3 h. The blood was centrifuged at 100 *g* for 30 minutes, causing its separation into three phases: a) red blood cells at the bottom of the tube, b) leucocyte phase located in the middle part, and c) platelet-rich plasma in the upper part (800-1,000 μ L). The platelet-rich plasma was then withdrawn and placed in sterile 10 mL tubes for a second centrifugation (1,500 *g* for 10 minutes) to obtain a high concentration of platelets in the lower phase (1/3 of the total) and a platelet-poor plasma (PPP) (2/3 of the total) in the upper part of the tube. This part was removed, and the remaining fraction was adjusted with the PPP to obtain a $12,500 \times 10^6$ platelets mL^{-1} concentration, as suggested in other studies [13,12].

The number of follicles ≥ 2 mm in the two ovaries of each ewe was determined just before application of the treatments and every week for the following nine weeks, regardless of the day of the estrous cycle. Follicular population was measured in ewes in a quadrupedal standing position by a single experienced technician using an ultrasound (Aloka Prosound

2, Japan) equipped with a 7.5 MHz transrectal probe. The ewes were not given feed or water for 18 h before each ultrasonography revision.

For the administration of platelet-rich plasma, the left ovary of each ewe was injected with 50 μL of saline solution; this was considered a control group (TES). The right ovary of each ewe received 50 μL of platelet-rich plasma ($12,500 \times 10^6$ platelets mL^{-1}). Treatments were administered through laparoscopy procedures using a 5 mm lens and a French semen applicator with an aspic (IVM Technologies, France) [14]. Briefly, the ewes were fasted and anesthetized by intravenous administration of 2.3 mg of 10% xylazine (Procin, Pisa) and 7.7 mg of ketamine (Anesket, Pisa) per 10 kg^{-1} of body weight. The anesthetized ewes were placed in a surgical trolley at approximately 45° . The area in front of the udder was washed, shaved, and disinfected just before laparoscopic inspection. The abdominal cavity was insufflated with air using a 6 mm reusable trocar inserted on the left side. This trocar was also used to introduce a 5 mm rigid laparoscopic endoscope. Along the middle line of the ewe's abdominal wall, an incision was made to allow insertion of a 5 mm ovarian manipulator (designed by the author), and a 5 mm laparoscopic Babcock grasper (Vetovation, USA). A third 3 mm reusable trocar (designed by the author) was inserted and used to introduce the French semen device for PRP application. The dose of PRP was determined considering reference results from other studies [11,12], as well as results from preliminary studies in our laboratory with ovaries of ewes obtained from a slaughterhouse.

In the present study, the PRP and saline solution were applied directly into the middle part of the ovary, avoiding insertion of the needle on a visible corpus luteum or large antral follicles ($>5 \text{ mm}$). Insertion at the base of the ovary was also avoided to minimize the occurrence of hemorrhage [15].

For the statistical analysis, the response variable was follicular population, which was determined by counting the number of follicles ≥ 2 mm in size present on the surface of the ovaries by ultrasonography. The statistical analysis was conducted following a repeated measures design, considering the ovary as the experimental unit. The treatments were the control group (TES) and the group with PRP administration (PRP). The results were analyzed with the MIXED procedure of SAS [16]. The least-squares means $\pm$ standard error (LSM $\pm$ SE) are reported throughout the document. The statistical model used is as follows:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_{xt} + S_{j(i)} + \epsilon_{ij}$$

where:

Y_{ij} = Follicles number in the j^{th} replicate of the i^{th} follicular response of the ewes; μ = general mean; T_i = Fixed effect of the i^{th} follicular response; β_{xt} = Regression coefficient of observations taken in different periods; S_j = Random effect associated with the j^{th} ewes within the i^{th} treatment; ϵ_{ij} = random error associated with the count of the j^{th} numbers follicles in the i^{th} follicular response of the ewes, which $\epsilon_{ij} \sim \text{NIID}(0, \sigma^2_e)$ was assumed. The differences between treatments were compared using Tukey. Data with $p < 0.05$ were considered significant.

To the best of our knowledge, this is the first time the ovarian antral follicle population has been reported for nine weeks following intraovarian PRP administration in ewes. The results are shown in Fig. 1. Likewise, the population of follicles in an ovary treated with PRP or TES is shown in Fig. 2. The follicular population in both ovaries showed no significant differences ($p > 0.35$) before administering the treatments. The population of

follicles decreased in both groups one week after treatment administration but recovered in the second week. For the following 3 to 9 weeks, the population of follicles remained without significant ($p > 0.05$) changes in the control group. However, for the same period, the population of follicles increased ($p < 0.05$) in the group treated with PRP. Comparisons among the groups showed a higher ($p < 0.01$) population of follicles for the group treated with PRP from weeks 3 to 9.

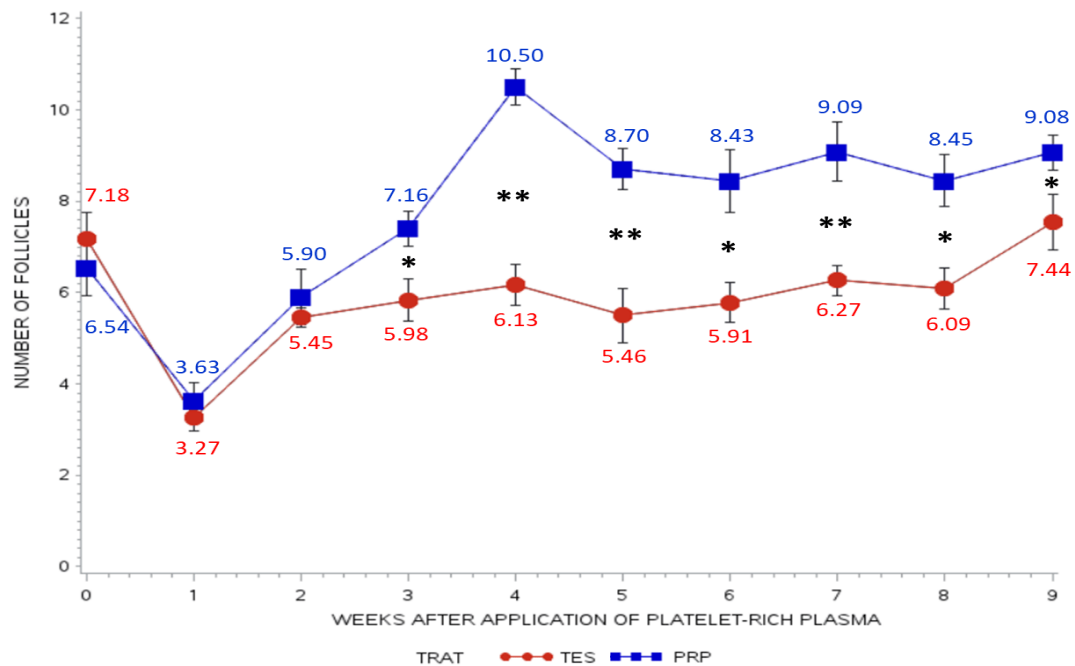


Fig. 1. Means of the weekly behavior of the follicular population of 11 Dorper ewes after intraovarian application of 50 µL of platelet-rich plasma (PRP) in the right ovary and saline solution (TES) in the left. *Indicates significant differences ($p < .01$). **Indicates significant differences ($p < 0.001$).

Application of PRP was initially used for clinical purposes, but recently its use has also included the treatment of different reproductive issues [17]. PRP is a compound usually obtained from blood from the same individual to be treated (autologous) [15], but it can also be from a different individual (heterologous) [18]. Regarding preparation, compounds are usually used fresh [19] or frozen [20,21], but lyophilized compounds [19,22] have also been successfully used.

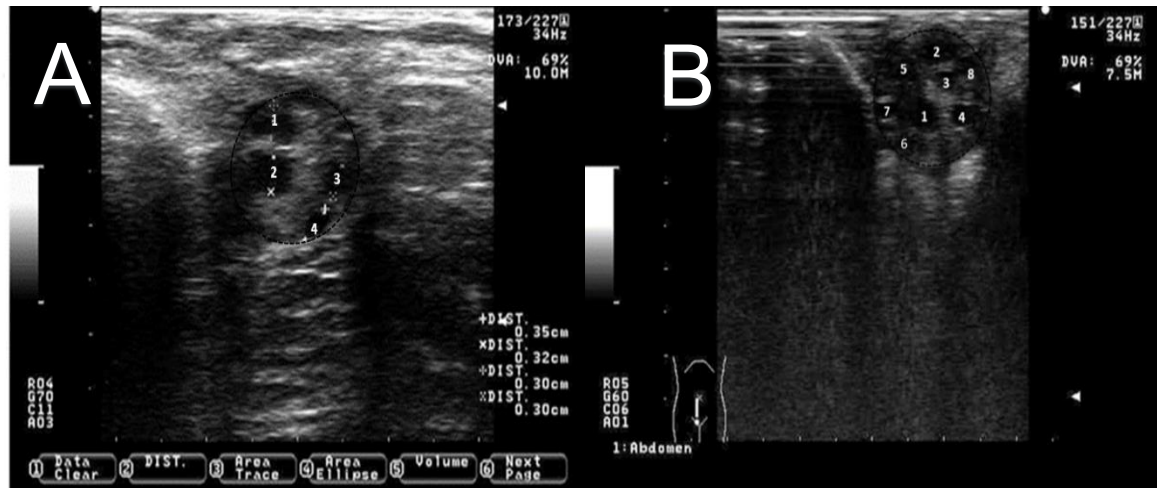


Fig. 2. Ultrasound images of ovaries from a Dorper ewe in the 4th week after PRP administration. (A) Ovary without PRP administration showing 4 antral follicles. (B) Ovary treated with PRP showing 8 antral follicles.

Although PRP has been utilized mainly for clinical purposes in humans and animals [23,24], its application has recently been tested for reproductive purposes [25]. Thus, intrauterine PRP administration was reported to increase pregnancy rate in several species, including humans [26, 27], mice [28], rats [25], cattle [13], and mares [29,19,30]. In other studies, it was also reported to increase the endometrial thickness in mares [19]. Moreover, intraovarian PRP application has also been evaluated.

In our study, although nonsignificant, the decrease in the follicle population observed in the first week after the administration of the treatments probably reflects stressful conditions due to injection into the ovary. However, one week later, the follicular population recovered values similar to those found at the beginning of the study.

This study showed a significant increase in the antral follicle population following intraovarian PRP administration from weeks 3 to 9. Presumably, the positive effect of PRP is due to the high content of different types of growth factors, as has been suggested in other studies [31,32,11], but we did not determine the concentration of growth factors

in our study. However, other studies have shown a direct effect of some growth factors present in PRP on the ovary. For instance, VEGF increased the proportion of antral follicles [33], and FGF induced the development of primordial follicles to primary follicles [34]. The results agree with those reported in humans [31], where PRP administration significantly increased the number of primordial and small antral follicles. Furthermore, the administration of PRP promoted follicle activation and development in young, advanced maternal aged, and old mice [35]. Similarly, it has been shown that PRP application impacts follicular recruitment in infertile women [11] and healthy cows [12]. However, PRP administration does not appear to affect the Graafian follicular diameter in mares [19].

The significant increase in the follicle population following PRP administration from weeks 3 to 9 has considerable implications. In cattle, a higher ovulatory response was reported in superovulated dairy cows treated with PRP than in those receiving saline solution [12]. The treatment effect was also reflected in a higher number of transferable embryos in cows receiving PRP [12].

Application of PRP increases Anti-Mullerian Hormone (AMH) and E_2 , but decreases FSH blood concentration [11]. Production of AMH in females is from granulosa cells of growing preantral and small antral follicles, thus providing a good representation of the dynamic follicle reserve [36]. In cattle, AMH and antral follicle count (AFC) have been found to present relatively high correlations ranging from 0.59 to 0.88 [37]. As expected, results from other studies indicate that circulating AMH concentrations were positively associated with AFC in both trio allele carrier and non-carrier high fecundity bovine genotypes [38].

In general, PRP administration appears to be a feasible alternative for use as a complement to improve the efficiency of reproductive treatments such as estrus synchronization and superovulation protocols. However, more studies are needed before any practical recommendations are suggested. In conclusion, the intraovarian administration of autologous plasma rich in platelets in Dorper ewes significantly increased the ovarian antral follicular population for seven weeks.

Acknowledgments

The authors thank the Postgraduate in Animal Production of Chapingo Autonomous University, as well as the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for their support for the present study.

Funding

The research obtained its funding from the Universidad Autónoma Chapingo and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Literature cited:

1. Walker SK, Kelly JM, Hebart ML, Swinbourne AMS, Weaver AC, Kleemann DO. Ovarian follicle dynamics in ewes treated with intra-vaginal progesterone pessaries. 2. Factors affecting timing of estrus and reproductive outcomes following artificial insemination. *Theriogenology*. 2023;202(5):103-109.
2. Adams GP, Singh J. Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. In: Richard M, Hopper DVM, Diplomat ACT, editors. *Bovine Reproduction*. 2nded. John Wiley & Sons, Inc.;2021, 292-323.
3. Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod*. 2002;67(4):1099-1105.
4. Cahill LP, Mariana JC, Mauléon P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil*. 1979;55(1):27-36.
5. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu F, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*. 2001;65(3):638-647.
6. Bartlewski PM, Alexander BD, King WA. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. *Small Rumin Res*. 2008;75(2-3):210-216.
7. Brasil OO, Moreira HN, Souto GPL, da Silva GCM, Ramos FA. Ovarian assessment for pre-selection of embryo donor ewes. *Small Rumin Res*. 2022;216:106803.
8. Smith P, Stanton JL, Quirke L, Juengel JL. Gestational nutrition 1: alterations to gestational nutrition can increase indicators of fertility in sheep. *Reproduction*. 2019;157(3):199-213.

9. Khan SU, Jamal MA, Su Y, Wei HJ, Qing Y, Cheng W. Towards improving the outcomes of multiple ovulation and embryo transfer in sheep, with particular focus on donor superovulation. *Vet Sci.* 2022;9(3):117.
10. Atkinson L, Martin F, Sturmey RG. Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: too much too soon? *Hum Reprod.* 2021;36(7):1737-1750.
11. Sills ES, Rickers NS, Li X, Palermo G. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(9):756-760.
12. Cremonesi F, Bonfanti S, Idda A, Lange-Consiglio A. Improvement of embryo recovery in Holstein cows treated by intra-ovarian platelet rich plasma before superovulation. *Vet Sci.* 2020;7(1):16.
13. Lange-Consiglio A, Cazzaniga N, Garlappi R, Spelta C, Pollera C, Perrini C, Cremonesi F. Platelet concentrate in bovine reproduction: Effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13(1):65.
14. McKelvey WA, Robinson JJ, Aitken RP, Henderson G. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology.* 1985;24(5):519-535.
15. Cakiroglu Y, Saltik A, Yuceturk A, Karaosmanoglu O, Kopuk SY, Scott RT, et al. Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging (Albany NY).* 2020;12(11):10211-10222.
16. SAS. *SAS User's Guide Statistics (Version 9.4)*. Cary: SAS Inst.; 2023.

17. Lin Y, Qi J, Sun Y. Platelet-rich plasma as a potential new strategy in the endometrium treatment in assisted reproductive technology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:707584.
18. Barrionuevo DV, Laposy CB, Abegão KGB, Nogueira RMB, Nai GA, Bracale BN, et al. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab Anim*. 2015;49(3):209-214.
19. Dawod A, Miro J, Elbaz HT, Fahmy H, Abdoon AS. Effect of intrauterine infusion of equine fresh platelets-rich plasma (PRP) or lyophilized PRP (L-GF^{equina}) on ovarian activity and pregnancy rate in repeat breeder purebred Arabian mares. *Animals (Basel)*. 2021;11(4):1123.
20. McClain AK, McCarrel TM. The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):292.
21. Brokhman, P. & Galea, M. A. A novel method for the preparation and frozen storage of growth factors and cytokines obtained from platelet-rich plasma. *Journal Cartilage Joint Preservation*. 2023;3(2):100089.
22. Bors SI, Dascalu DL, Bors A, Fahmy HM, Kandil OM, Abdoon ASS. Intraovarian injection of reconstituted lyophilized growth-promoting factor extracted from horse blood platelets (L-GF^{equina}) increases oocytes recovery and in vitro embryo production in Holstein cows. *Animals (Basel)*. 2022;12(19):2618.
23. Bos-Mikich A, De Oliveira R, Frantz N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(5):753-756.

24. Soares CS, Babo PS, Reis RL, Carvalho PP, Gomes ME. Platelet-Derived products in veterinary medicine: a new trend or an effective therapy? *Trends Biotechnol.* 2021;39(3):225-243.
25. Ling L, Xiaoyan L, Sheng L, Xiaohan W, Zhiyan X, Cuifang H. Platelet-rich plasma improves pregnancy rate and repairs endometrial injury in patients with repeated implantation failure. *J Biomater Tissue Eng.* 2021;11(5):879-885.
26. Nazari L, Salehpour S, Hosseini MS, Moghanjoughi PH. The effects of autologous platelet-rich plasma in repeated implantation failure: a randomized controlled trial. *Hum Fertil (Camb).* 2020;23(3):209-213.
27. Zamaniyan M, Peyvandi S, Gorji HH, Moradi S, Jamal J, Poor AFY, et al. Effect of platelet-rich plasma on pregnancy outcomes in infertile women with recurrent implantation failure: a randomized controlled trial. *Gynecol Endocrinol.* 2020;37(2):141-145.
28. Kim MK, Yoon JA, Yoon SY, Lyu SW, Lee SW. Platelet-rich plasma increases hif1a and hif2a in endometrium affecting live birth rates in Murine Asherman's syndrome model. *Fertil Steril.* 2021;116(3), supplement: e175-e176.
29. Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JAJr, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with Platelets-rich plasma before and after AI. *Theriogenology.* 2017;104(12):120-126.
30. Pasch L, Schmidt A, King W. Clinical observations after pre breeding intrauterine plasma infusion in 18 mares inseminated with thawed frozen semen. *J Equine Vet Sci.* 2021;99(4):103389.

31. Hosseini L, Shirazi A, Naderi MM, Shams-Esfandabadi N, Borjian Boroujeni S, Sarvari A, Sadeghnia S, Behzadi B, Akhondi MM. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reprod Biomed Online*. 2017;35(4):343-350.
32. Shwetha HR, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: a review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(3):367-374.
33. Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology*. 2008;149(7):3313-3320.
34. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):123-130.
35. Marchante M, Buigues A, Ramirez-Martin N, Martinez J, Pellicer N, Pellicer A, et al. Single intraovarian dose of stem cell- and platelet-secreted factors mitigates age-related ovarian infertility in a murine model. *Ame J Obstet Gynecol*. 2023;228(5):561.e1-561.e17.
36. Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, et al. Regulation of Anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol. Reprod*. 2011;84(3):560-571.
37. Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1219-1225.

38. García-Guerra A, Motta JCL, Melo LF, Kirkpatrick BW, Wiltbank MC. Ovulation rate, antral follicle count, and circulating anti-Müllerian hormone in Trio allele carriers, a novel high fecundity bovine genotype. *Theriogenology*. 2017; 101:81-90.