

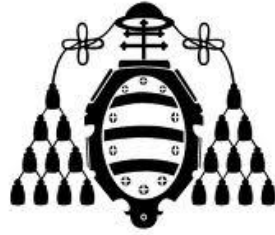
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN
BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

**Análisis de programas y protocolos de
preparación de hembras bovinas para
realización de OPU en la obtención de
ovocitos para FIV**

Jimena González González

Junio de 2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

D. Antonio Gómez Peinado, director veterinario del **Instituto Español de Genética y Reproducción Animal**, en Talavera de la Reina.

INFORMA:

Que la alumna **Jimena González González** ha realizado bajo su supervisión el Trabajo Fin de Máster titulado “**Análisis de programas y protocolos de preparación de hembras bovinas para realización de OPU en la obtención de ovocitos para FIV**”, dentro del programa del Máster “**Biología y Tecnología de la Reproducción**”.

Dicho trabajo cumple con las directrices exigidas y por ello autoriza la presentación del mismo. Para lo cual firma la presente en Talavera de la Reina a 03 de junio de 2013.

Fdo. Antonio Gómez Peinado.

Quisiera agradecer al tutor de este trabajo, Antonio Gómez Peinado, por la información y la orientación dada y hacerme sentir como una más de su equipo.

Del mismo modo dar las gracias a Carmen Díez Monforte, Daniel Martínez Bello y José Néstor Caamaño Gualdoni, profesores del Máster de Biología y Tecnología de la Reproducción, por socorrerme en la búsqueda de artículos.

A mis compañeras Paloma, Yaiza, Patricia y Diana por solucionarme muchas dudas que iban surgiendo durante el proceso de elaboración de este trabajo y por darnos apoyo mutuamente.

A mi familia.

A mis verdaderos amigos.

A los animales que me hacen querer mi profesión.

ÍNDICE:

I.	INTRODUCCIÓN.....	5
	1. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS.....	6
	2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA BOVINA.....	10
	3. OVUM PICK-UP (OPU).....	11
	4. OVOCITOS OBTENIDOS POR OPU PARA FIV	13
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
	1. MATERIAL.....	16
	2. METODOLOGÍA.....	17
IV.	RESULTADOS.....	19
V.	DISCUSIÓN.....	25
VI.	CONCLUSIONES.....	28
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	29

I. INTRODUCCIÓN.

Un factor clave en el desarrollo de la especie humana fue la domesticación de los animales, lo que permitió un mayor desarrollo cultural del ser humano al no tener que preocuparse de la búsqueda de sustento y disponer así de más tiempo para el desarrollo de la actividad intelectual. Surge la ganadería, que se define como la crianza y manejo de animales con fines de producción para su aprovechamiento. Actualmente la ganadería es una importante actividad económica dentro del sector primario y está cada vez más intensificada en los países desarrollados. En este sentido cobra gran importancia el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) para aumentar la eficiencia reproductiva del ganado y así conseguir un mayor número de descendientes de lo que sería posible por reproducción normal y obtener una mejora genética de los rebaños.

Estas técnicas también pueden ser aplicadas a modelos animales en estudios experimentales de la fisiología y la patología de la reproducción humana. Existen limitaciones legales, éticas y prácticas que impiden la investigación con seres humanos, sobre todo en la investigación básica. Es por ello que los modelos animales se han utilizado desde hace siglos para superar estos obstáculos. Dentro de los modelos animales usados se han encontrado varias similitudes en la fisiología reproductiva de la mujer y la vaca, tales como aspectos relacionados con la ovogénesis, foliculogénesis, dinámica folicular, selección del folículo dominante y patrones hormonales. Además la vaca ha sido propuesta como un modelo valioso para la investigación del envejecimiento reproductivo en las mujeres (1). Los avances en el desarrollo y aplicación de nuevas TRA son de una importancia relevante ya que estas técnicas, en humana, se aplican generalmente a parejas con problemas de fertilidad y grandes deseos de tener descendencia.

La biotecnología de la reproducción comprende las técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. El progreso de las mismas fue significativo por su impacto productivo y su aplicación en medicina para la prevención y tratamiento de enfermedades animales y humanas (2). Aunque debemos tener en cuenta que las técnicas más complejas suponen un coste elevado, lo que las hace inaccesibles a productores de países en desarrollo, limitando su uso en una población de animales reducida y de alto valor genético en los países más industrializados.

1. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS.

Las biotecnologías reproductivas que se aplican actualmente van desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación de animales. Su impacto radica en la consecución de una mejora reproductiva. Son importantes en sí mismas y combinadas para llevar a cabo procedimientos más complejos (sirva de ejemplo el uso de la IA en producción de embriones *in vivo* para una posterior transferencia).

La IA en bovinos es una técnica simple, efectiva y de bajo costo. Como ventajas y aplicaciones de esta técnica destaca el aumento del progreso genético mediante el uso intensivo de machos de alto valor, efecto sanitario al impedir la transmisión de enfermedades venéreas, posibilidad de empleo de toros de genética superior que se encuentren incapacitados para la monta natural, posibilidad de prescindir de la presencia del semental en la ganadería reduciendo así costes y riesgos de manejo, control de cruces y descendencia en el rebaño, etc. Una variación es la IA profunda, con lo que se puede reducir la dosis de semen empleada, importante en el uso de semen congelado y semen sexado.

Con el desarrollo de la IA aparece la necesidad de procesar el semen recolectado y de diseñar una técnica para su conservación. En 1940 en Estados Unidos se confeccionaron las primeras pajuelas para congelación (2). Esta metodología permite conservar el semen por tiempo indefinido facilitando así la creación de bancos de germoplasma y el transporte y comercialización del material genético. Mediante el uso de la citometría de flujo se pueden separar los espermatozoides de un eyaculado entre los que portan el cromosoma X y los que portan el cromosoma Y, obteniendo así semen sexado. Entre los posibles usos del semen sexado se encuentran la producción animal (posibilita una racionalización de la explotación de los rebaños), investigación, animales transgénicos, uso asociado a otras TRA como es la FIV y la transferencia de embriones, usos en medicina humana, etc. Es un procedimiento con un coste elevado y presenta menor fertilidad, siendo las dosis de inseminación más reducidas. (3).

Así como la IA permite el uso más eficiente de machos de calidad superior, con la técnica de superovulación y transferencia de embriones (TE) se consigue un aumento de la tasa reproductiva de hembras de alto valor genético, superando la capacidad reproductiva máxima de un ternero por vaca y año. Otras aplicaciones de la TE son la obtención de descendencia de vacas con problemas de fertilidad, creación de bancos de germoplasma (útiles en la conservación de razas en peligro de extinción), transporte y

comercialización internacional de animales, control de enfermedades, etc. La técnica consiste en estimular farmacológicamente la superovulación de las hembras seleccionadas como donantes (mediante la combinación de GnRH, PGF_{2α}, progesterona y hCG), IA o monta natural a tiempo fijo de las donantes, lavado uterino entre los días 6 y 8 tras la IA para recuperar los embriones. Tras un proceso de búsqueda y selección de los embriones se procede a su cargado en pajuelas para la transferencia a hembras receptoras o para su congelación y posterior conservación. Las hembras receptoras son tratadas farmacológicamente para conseguir la sincronización de su ciclo con el de las donantes. La situación en Europa de la producción *in vivo* de embriones bovinos se refleja en la siguiente tabla (Fig. 1).

Country	N° of flushed donors	N° of embryos collected	N° of transferable embryos	N° of transferable embryos/flush
Belgium	1022	7062	3213	3.1
Denmark	447	3780	3025	6.8
Finland	418	4317	2557	6.1
France	5665	50660	29966	5.3
Germany	2215	24055	14780	6.7
Ireland	420	4074	2077	5.0
Italy	2103	19680	-	6.2
The Netherlands	4045	44495	27609	6.2
Spain	626	6919	3135	5.0

Switzerland	533	5733	3880	7.3
UK	5186	14780	13976	2.7

Figura 1: *Bovine In Vivo Embryo Production 2011(4). Los 11 países europeos con mayor producción de embriones in vivo.*

La producción de embriones *in vitro* (PIV) representa la tercera generación de TRA (5). Permite producir embriones a bajo coste (si los ovocitos se obtienen de hembras sacrificadas en matadero), obtención de descendencia de hembras de alto valor genético que deban ser sacrificadas, aprovechamiento de animales con problemas de infertilidad, aumenta el rendimiento reproductivo de hembras seleccionadas, facilita la utilización de semen sexado, aumenta la eficacia de los procesos de selección mediante la aplicación del diagnóstico genético preimplantacional (6). La PIV consta de una serie de etapas: la obtención de los ovocitos puede tener dos orígenes, o bien proceder de ovarios de hembras sacrificadas en matadero (es lo más habitual, de fácil obtención y bajo coste, aunque se desconoce la condición fisiológica y/o patológica del animal) o ser obtenidos de hembras vivas mediante la técnica del Ovum Pick Up (OPU) que consiste en la aspiración folicular vía transvaginal ecoguiada y que se procede a describir en detalle más adelante. Los ovocitos obtenidos deben ser madurados *in vitro*. Posteriormente, tras la capacitación de los espermatozoides, se procede a la fecundación *in vitro* (FIV). Los embriones obtenidos se mantienen en medios de cultivo definidos hasta su transferencia o criopreservación. Los embriones producidos *in vitro* presentan una serie de limitaciones con respecto a los producidos *in vivo* como son la menor viabilidad, menor número de células en la masa celular interna, mayor incidencia de anomalías cromosómicas, menor tasa de gestación, mayor tasa de pérdida fetal, etc. (3). La situación a nivel mundial de la PIV se refleja en la siguiente tabla (Fig. 2). En la última década la transferencia de embriones producidos *in vitro* sufrió un gran aumento a nivel mundial, aunque el número de transferencias sigue siendo menor a la de embriones producidos *in vivo* (Fig. 3), debido a las limitaciones de la maduración *in vitro* de los ovocitos y las condiciones de fertilización (8).

Continents	Transferrable Embryos	Number of Transferred Embryos			
		FRESH	FROZEN	TOTAL & PERCENTAGE	
AFRICA	0	0	0	0	0.00%
ASIA	116614	15993	6510	22503	6.62%
EUROPE (8 cts)	7155	3412	2249	5661	1.67%
N. AMERICA	43058	25778	2322	28100	8.27%
S. AMERICA	268310	256888	12235	269123	79.23%
OCEANIA	15012	13644	654	14298	4.21%
TOTAL	450549	315715	23970	339685	100.00%
2009 Totals	376576	283188	22761	305949	
Per Cent Change	+19.64%	+11.49%	+5.31%	+11.03%	

Figura 2: Producción *in vitro* de embriones bovinos a nivel mundial en 2010. (7).

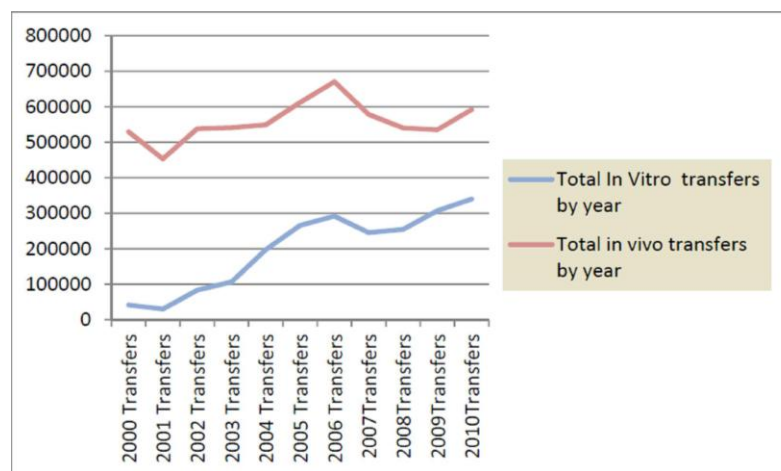


Figura 3: Comparativa entre el número de embriones *in vivo* e *in vitro* transferidos anualmente a nivel mundial en la pasada década. (7).

Las técnicas de micromanipulación son TRA de alta complejidad, necesitan equipo y personal sofisticado. La intracitoplasmatic sperm injection (ICSI) consiste en inyectar con una micropipeta un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro para su fecundación. Mediante microcirugía se pueden obtener mellizos idénticos tras la división de una mórula en dos hemi-embryones (2); sexado tras biopsia embrionaria, trasplante nuclear para la producción de clones, microinyección de células a un blastocisto para la producción de quimeras y generar individuos transgénicos (3), son otras aplicaciones de la micromanipulación.

2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA BOVINA.

El conocimiento de la anatomía del aparato reproductor de la vaca, es necesario para realizar con éxito la técnica de OPU, ya que debemos identificar y fijar el ovario vía rectal e interpretar ecográficamente las distintas estructuras ováricas, especialmente los folículos que van a ser puncionados.

La estructura ovárica en la vaca comprende dos zonas: una central o medular constituida esencialmente por el entrecruzamiento de fibras conectivas y musculares lisas con gran cantidad de vasos y una zona cortical que contiene los folículos y los cuerpo lúteos en diferentes estados de desarrollo, disponiéndose entre estas estructuras el estroma ovárico constituido por fibroblastos, fibrocitos y tejido conectivo (9). (Fig. 4).

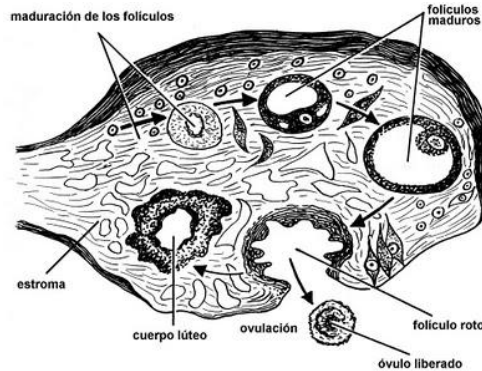


Figura 4: Estructura del ovario. (10).

Ecográficamente los folículos se observan como cavidades anecogénicas de 15 a 20 mm. de diámetro y con una pared fina de 1 a 2 mm. Cavidades con un diámetro mayor a 25 mm. se consideran quistes foliculares (11).

El estro, en la vaca, se observa, de media, cada 21 días, con una duración media de 18 horas y suele ser independiente de la estación del año. La ovulación se produce unas 30 horas después del inicio del celo. El crecimiento folicular se caracteriza por la presencia de 2 a 3 olas foliculares (fig. 5) por ciclo que se ven precedidas de un pequeño pico de FSH. Cada ola implica el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos de la reserva ovárica total y la selección de un folículo dominante que adquiere receptores para la LH y sigue creciendo con niveles bajos de FSH y madurando hasta alcanzar la fase preovulatoria, mientras que los otros se atresian (12).

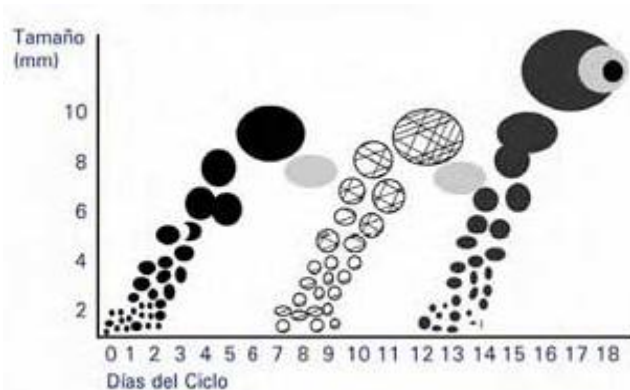


Figura 5: *Dinámica de crecimiento folicular con tres olas foliculares.*

Las hormonas implicadas en cada momento del ciclo son la FSH (hormona foliculo estimulante) que estimula el crecimiento de los folículos, la LH (hormona luteinizante) que produce la ruptura del folículo dando lugar a la ovulación. Tras ésta se origina el cuerpo lúteo que secreta progesterona, hormona indispensable en la preñez. Si el ovocito no se fecunda el cuerpo lúteo desaparece gradualmente por acción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y se da inicio a otro ciclo sexual (fig. 6).

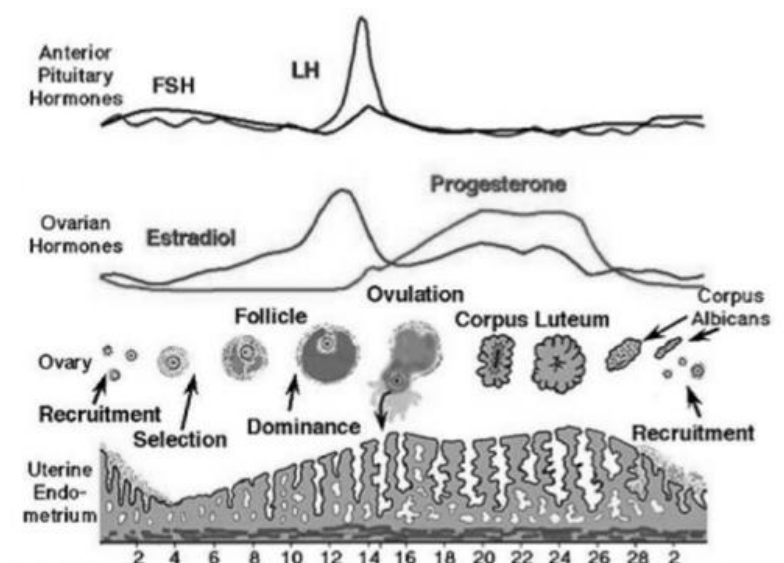


Figura 6: *Acción hormonal durante el ciclo estral.*

3. OVUM PICK UP (OPU).

La Ovum Pick Up (OPU) es la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía. Se usa por primera vez en ganado bovino en Holanda en 1988, pero su empleo rutinario como TRA veterinaria tiene lugar a partir de 1994 (13). Previamente a

su desarrollo, el procedimiento propuesto para la obtención de ovocitos de animales vivos era la laparoscopia transvaginal o paralumbar (14), siendo ésta una técnica invasiva, laboriosa y con riesgos derivados en adherencias y peritonitis.

La OPU posibilita la obtención de ovocitos, destinados a la PIV de embriones, de ovarios de hembras vivas y por tanto de genética conocida, permitiendo así acelerar los procesos de selección genética vía materna principalmente. Con la OPU se solventan las limitaciones del uso de ovarios de hembras sacrificadas, que imposibilita repetir la recolección de ovocitos de un mismo individuo y, además, el número de gametos que se recuperan es muy limitado con respecto a la reserva ovárica total (15). La misma técnica de punción transvaginal se utiliza para eliminar folículos dominantes en ciclos de superovulación y también para recolectar tejido ovárico (15).

Es una técnica con muchas posibilidades ya que puede ser usada de forma intensiva (hasta dos veces por semana durante dos meses consecutivos) (16); en vacas adultas independientemente de su normalidad reproductiva, sobre hembras gestante (primer tercio de gestación) o vacías, en hembras que no responden a los tratamientos de superovulación, en vacas viejas con trastornos reproductivos y en terneras prepúberes a partir del 6^o-8^o mes de edad (13).

El éxito de la OPU se mide mediante la tasa de recuperación de ovocitos expresando el porcentaje sobre el total de folículos aspirados (17).

Los factores principales que controlan el éxito de la OPU pueden agruparse en dos grandes categorías (18). El primer grupo se refiere a los aspectos técnicos: procedimiento de aspiración y experiencia del operador, frecuencia e intervalo entre las sesiones de punción, tipo y diámetro de la aguja, presión de vacío de aspiración, influencia del bisel de la aguja. La variación de estos aspectos técnicos se traduce no en un aumento del número de complejos cúmulo-ovocitos (COCs) recuperados sino en un aumento de la calidad de los mismos, con menor número de ovocitos desnudos aspirados. El segundo grupo considera los aspectos biológicos: estado fisiológico de la hembra, momento del ciclo estral, edad, raza, estimulación previa a la OPU. Según diferentes autores la mejora más significativa en cuanto al rendimiento de la calidad de los ovocitos se consigue con programas de pre-estimulación con gonadotrofinas (13), (19), (20), (21).

La producción in vitro de embriones bovinos con ovocitos obtenidos a partir de OPU a nivel europeo se refleja en la siguiente tabla (fig. 7).

Country	N° of OPU sessions	N° of oocytes collected	N° of transferable embryos	N° of embryo/OPU sessions
France	265	2208	524	2.0
Germany	1012	4564	3217	3.2
Italy	168	2434	423	2.5
The Netherlands	3530	28678	3814	1.1
Turkey	-	100	56	-
Total	4975	37984	8034	-

Figura 7: Bovine in vitro production 2011 (4).

4. OVOCITOS OBTENIDOS POR OPU PARA FIV.

Mediante la aspiración folicular transvaginal se recogen los complejos cúmulo-ovocitos (COCs). Éstos deben ser identificados, aislados y clasificados para la posterior FIV.

La clasificación (6) se hace en función del aspecto del citoplasma y del número y aspecto de las capas que constituyen el *cumulus oophorus*. Un citoplasma homogéneo y oscuro indica buen potencial para el desarrollo y ovocitos con un cúmulo compacto, formado por varias capas de células, presentan mayores porcentaje de éxito de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata.

Del tal modo, morfológicamente se clasifican en cuatro tipos: A, B, C y D (fig. 8).

- Tipo A: *Cumulus* intacto, capas múltiples (>4) y compactas.
- Tipo B: Capas múltiples de células del *cumulus* (1-3).
- Tipo C: Ovocitos desnudos.
- Tipo D: Capas celulares del *cumulus* expandidas.

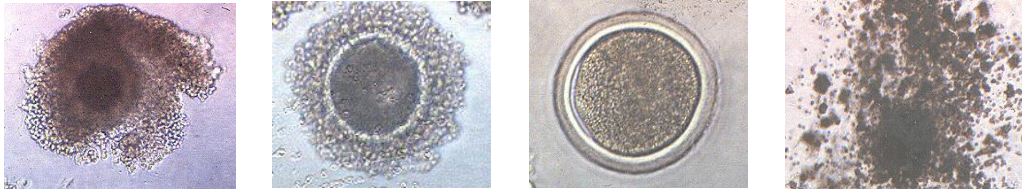


Figura 8: *Ovocitos tipo A – B – C – D. (17).*

Los ovocitos de tipo A y B fertilizados mediante FIV consiguen dividirse en un alto porcentaje (80% los tipo A y 77% los tipo B), siendo los únicos tipos de ovocitos que llegan a blastocistos (40% de los tipo A y 20% de los tipo B). Los tipos C y D consiguen dividirse en un porcentaje significativamente menor (40% los tipo C y 34% los tipo D), no llegando a completar su desarrollo hasta blastocisto (17).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Una variable técnica a tener en cuenta durante la realización de la OPU, es la presión de vacío de aspiración y su relación con el diámetro de la aguja de punción, ya que es un factor limitante de la tasa de recuperación de ovocitos y del número de blastocistos producidos *in vitro*.

La raza también influye en la eficiencia de los programas de OPU, en cuanto al número de folículos detectados y aptos para ser aspirados, número y calidad de ovocitos recolectados, viabilidad de los mismos, etc. El estado nutricional de la hembra, el estrés térmico, etc. afectan también a la calidad ovocitaria.

El intervalo entre sesiones de OPU condiciona la calidad del ovocito y la posterior tasa de producción *in vitro* de embriones.

Describiremos más detalladamente las diferencias que existen entre el número y la calidad de los ovocitos de hembras que han sido estimuladas previamente a la OPU frente a las que no han sido tratadas. Así como los diferentes programas de preparación recomendados para OPU.

Con este trabajo se pretende comparar los resultados obtenidos por diferentes autores con respecto a los factores que controlan el éxito de la OPU, es decir, número y calidad de ovocitos para PIV, centrándose en la estimulación previa.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. MATERIAL.

Para una correcta ejecución de la técnica de OPU es necesaria la anestesia epidural de la hembra con clorhidrato de lidocaína (1 ml/100 kg al 2%) (22) para reducir los esfuerzos expulsivos y facilitar la manipulación de los ovarios vía rectal. Según el temperamento del animal puede ser necesaria una sedación con xilacina (0,05-0,1 mg/kg IV) o detomidina (5-15 µg/kg IV) (22).

El equipo necesario para OPU se compone de tres partes principales: un ecógrafo con un transductor (sonda), un sistema de guía para la aguja de punción conectado a un sistema de recolección del líquido folicular aspirado y una bomba de succión (18).

Cualquier ecógrafo capaz de producir imágenes de alta resolución puede ser adecuado para este propósito, si bien la elección del tipo de sonda es una variable importante en el proceso de OPU. Existen diferencias entre distintos autores. Actualmente ya son muchos los equipos dotados de transductores bi-frecuencia (5-7,5 MHz.). En cuanto al tipo de sonda, la mayoría de autores describen el uso de transductores de tipo convex o micro-convex, y apenas se describe el uso de transductores lineales para OPU (14), ya que con los transductores de tipo convexo se pueden visualizar folículos pequeños de menos de 5 mm. de diámetro.

El transductor para OPU se coloca junto con la guía de punción en un mango de OPU de 60 cm. de longitud, que se introduce vía vaginal (1), (13). Por la guía se introduce la aguja de punción que mediante un sistema de conducción de silicona, teflón o de otro material plástico, se conecta con un tubo de 50 ml. Falcon graduado donde se recoge el líquido folicular aspirado. Este tubo se mantiene a temperatura de 37°C durante el proceso. Los autores coinciden en el uso de agujas desechables, por razones sanitarias, para evitar pérdida de bisel después de varios usos (lo que dificultaría la punción y causaría mayor traumatismo en el ovario) y por razones económicas. La longitud recomendada de la aguja para punción es de 40 a 50 mm. El diámetro utilizado varía según los autores de 18 a 20 G.

La aguja de punción se conecta a una pequeña bomba de vacío que permite la aspiración de los folículos.

La raza de vacas empleadas en los distintos estudios varía según lo estudiado en cada caso, la disposición de animales, el lugar donde se lleva a cabo la investigación,

etc. En Europa los estudios se hacen principalmente sobre animales de la raza productora de leche por excelencia, Holstein friesian (1), (18), (20), frente a razas europeas de producción cárnica (1), (23). Otros autores se centran en estudiar si existen diferencias entre el ganado de tipo cebuino o *Bos indicus* frente al *Bos taurus* (14), (18), (24).

2. METODOLOGÍA.

La vaca a la que se le realiza la OPU se coloca en un sistema de contención, sedada si es necesario, pero siempre en estación. Se le retiran las heces del recto, se le administra la anestesia epidural para manipular fácilmente el recto y los ovarios sin que el animal haga esfuerzos de expulsión. La vulva y la región perineal se limpian y desinfectan, se introduce el mango de OPU (transductor y guía de punción) por la vagina suficientemente lubricado y protegido por una camisa sanitaria. El transductor se orienta hacia uno de los lados del cuello uterino, al lado ipsilateral del ovario que vamos a puncionar. Vía rectal se fija el ovario sobre la sonda ecográfica y se procede a la punción.

Según los distintos autores la presión de vacío ejercida para la aspiración folicular varía de 40 a 400 mmHg. Debemos tener en cuenta que la aspiración exacta en la punta de la aguja va a depender de su diámetro y de la longitud y diámetro del circuito de aspiración (14), (17), (18). En los distintos estudios analizados se utilizan presiones de 50 mmHg. (13), 75 mmHg.(1), (25) y 85 mmHg. (26).

La punción ecoguiada se describe a continuación. El folículo (zona anecogénica) se encuentra en el trayecto de dos líneas de biopsia, entre las que se pasa la aguja de punción. En la ecografía se puede seguir la trayectoria de la aguja, se ve la punta biselada dentro del folículo. Cuando se acciona la bomba de vacío el líquido folicular se va aspirando y los folículos se colapsan. (Fig. 9).

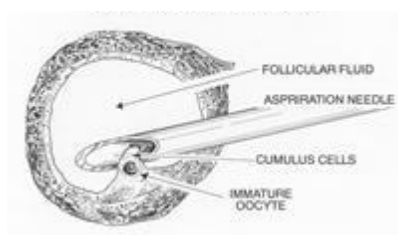


Figura 9: Aspiración del líquido folicular junto con un ovocito inmaduro (17).

El líquido folicular recolectado es filtrado (con un filtro de 50µm. de poro) y lavado (con Phosphate Buffered Saline o PBS) para pasar a la búsqueda y clasificación de los COCs.

La estimulación hormonal de las donantes es necesaria en vacas con actividad ovárica baja, para estimular un mayor crecimiento folicular. También se emplean los tratamientos hormonales para hacer estudios comparativos de su efectividad. Las principales hormonas empleadas son:

- $PGF_{2\alpha}$ para provocar la luteolisis.
- Progesterona: para sincronización de celos.
- GnRH: acción FSH y LH.
- FSH: hormona folículo estimulante. Estimula el crecimiento folicular. Es una hormona de vida media corta que debe ser administrada dos veces al día en los protocolos de estimulación (18), (23).
- LH: hormona luteinizante. Estimula la maduración folicular y la ovulación.
- PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante) o eCG (gonadotropina coriónica equina): acción folículo estimulante de vida larga. Sólo es necesaria una administración (23).

La ablación del folículo dominante (DFR) se describe en algunos protocolos de preparación para la OPU (19), (27).

IV. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios, comparando la estimulación ovárica hormonal frente a la ausencia de la misma, previa a la OPU, se describen en las siguientes tablas.

Se hace una breve descripción del protocolo seguido por cada uno de los autores, ya que difieren en el tipo de hormonas empleadas así como en las pautas de estimulación.

Se valora el éxito de la OPU mediante la tasa de folículos aspirados, ovocitos recolectados por sesión, tasa de división tras la FIV, tasa de blastocistos viables de día 7.

Comparación de resultados de la OPU en vacas estimuladas hormonalmente con FSH y vacas no estimuladas (13), (17), (18), (21), (1). (Fig. 10, 11, 12 y 13).

	Ovocitos/sesión (n)	División (%)	Embriones/Ovocitos (%)	Embriones/sección (n)
CON FSH	13.2	65.6	26.0	3.3
SIN FSH	6.85	59.45	18.1	1.25

Figura 10: Estudio comparativo entre animales tratados y no tratados con FSH previa OPU (17), (21).

	Número de ovocitos/OPU	Nº ovocitos viables/OPU	%blastocistos/OPU
CON FSH	4.9-10.6	4.8-10.1	1.1-2.4
SIN FSH	3.9-5.3	3.8-5.2	0.8-1.4

Figura 11: Estudio comparativo entre animales tratados y no tratados con FSH previa OPU (13).

	Nº de folículos/OPU	Nº de ovocitos/OPU	Embriones de calidad I y II
CON FSH	12.3	8.6	1.38
SIN FSH	8.9	6.2	0.96

Figura 12: Estudio comparativo entre animales tratados y no tratados con FSH previa OPU (18).

	Nº folículo	Nº ovocitos	% división	% blastos
CON FSH	16.1±8.3	8.9±4.5	89.8±8.1	44.6±21.3
SIN FSH	9.4±3.0	4.4±2.7	60.7±22.3	21.9±5.8

Figura 13: Estudio comparativo entre animales tratados y no tratados con FSH previa OPU (1).

Según los datos obtenidos en estos estudios se puede concluir que la administración de FSH previamente a las sesiones de OPU se traduce en un aumento del número de folículos y de ovocitos recolectados por sesión y de su tasa de división y desarrollo hasta blastocisto.

Otro de los protocolos de estimulación combina la aplicación de un dispositivo de norgestomet (progestágeno) para sincronización de las hembras, seguido de la ablación del folículo dominante, posteriormente se aplican 4 inyecciones de FSH separadas 12 h. Por último 48 h. después de la última inyección de FSH se realiza la OPU. En este artículo (23) se analizan varias sesiones de OPU realizadas en un periodo de tres años. (Fig. 14)

	OPU/FIV sessions 1996-1999 NON-stimulated	OPU/FIV sessions 1999-2003 FSH-stimulated
Sessions of best producing animals	160	49
Follicles	10.6±4.6	24.9±18.4
Oocytes	6.1±3.8	21.7±14.9
Embryos	1.6±1.7	6.4±6.4
Embryos (%)	26	29

Sessions of worst producing animals	147	69
Follicles	4.5 ± 2.6	9.4 ± 4.9
Oocytes	1.9 ± 1.7	6.7 ± 4.2
Embryos	0.2 ± 0.5	1.7 ± 2
Embryos (%)	11	25

Figura 14: Resultados de OPU/FIV, después de un período de 3 años, en subpoblaciones de animales buenos y malos productores, y de animales estimulados con FSH y no estimulados ($p < 0.05$). (23).

Se ponen de manifiesto, con este estudio retrospectivo, los mejores resultados en número de folículos, ovocitos y embriones en las hembras tratadas con FSH. Además debemos observar que el estudio sobre las vacas tratadas es más reciente, lo que se traduce en una mejora en los materiales y metodología de aplicación de la técnica de OPU.

Otros autores estudiaron los efectos de la estimulación con FSH y el número de ovocitos recogidos en sesiones de OPU previas y posteriores a la estimulación en el mismo grupo de animales. El protocolo de tratamiento de las hembras fue el siguiente: el D0 se trató a las vacas con PGF_{2α} para provocar la luteolisis y así sincronizarlas, saliendo en celo el D3. Se les realizó dos sesiones de OPU (D7 y D10). Los D12, D13 y D14 se estimularon con FSH y se les practicó otras dos sesiones de OPU en D16 y D20 (25). Los resultados se reflejan en la siguiente tabla. (Fig. 15).

	OPU 1	OPU 2	OPU 3	OPU 4
Nº de ovocitos totales	3.5	4.4	8.1	6.2
Grupo 1	0.42	1.08	1.08	1.50
Grupo 2	0.92	1.00	1.58	1.75
Grupo 3	0.75	1.42	2.42	1.00
Grupo 4	1.33	1.17	3.00	1.92

Figura 15: Número de ovocitos totales en cada sesión de OPU y distribuidos en los 4 grupos de trabajo. ($p < 0.01$). (25).

Se pone de manifiesto, según la tabla anterior, un aumento en el número de ovocitos recolectados tras la estimulación de las vacas con FSH.

La comparativa entre animales no tratados y tratados con FSH junto con ablación del folículo dominante (DFR) se hace en la siguiente tabla (Fig. 16) El protocolo de tratamiento consiste en la ablación del folículo dominante, a las 36 h. tratamiento con FSH dos veces, OPU a las 48 h. de la última administración de FSH (19).

	Nº de folículos	Nº de ovocitos	Nº de blastocistos
Vacas NO tratadas	-	0.6±0.8	0.7±0.7
DFR + OPU (72 h.)	-	-	1.2±1.3
DFR + FSH	16.0±5.0	10.6±4.5	2.1±1.2

Figura 16: Resultados de la OPU tras el tratamiento con FSH y DFR (ablación del folículo dominante). ($p < 0.05$). (19).

El protocolo de DFR seguido del tratamiento con FSH previo a la OPU, resultó el más productivo, frente a no tratar en absoluto a los animales o solo hacer DFR.

Otra hormona utilizada en protocolos de estimulación es la PMSG. (Fig. 17).

	Nº de folículos/OPU	Nº de ovocitos/OPU
CON PMSG	7.1	4.2
SIN PMSG	4.3	1.8

Figura 17: Éxito de la OPU con tratamiento con PMSG vs. sin PMSG (18).

Se observa una respuesta positiva al tratamiento previo a la punción folicular con PMSG en el número de folículos y ovocitos por sesión de OPU.

En un estudio (27) se compara el éxito de la OPU tras un protocolo de estimulación con GnRH vs. un protocolo sin tratamiento hormonal pero con ablación del folículo dominante (fig. 18).

	Estimulación con GnRh	Ablación del folículo dominante (RDF)
Número de folículos	19.33 ± 5.94	13.00 ± 5.62
COCs tipo I	10.58	26.41
COCs tipo II	8.23	9.43
COCs tipo III	29.41	11.32
Ovocitos desnudos	20.00	45.28
Ovocitos maduros	31.76	7.54
COCs totales	48.23	47.16
División 48h. tras la FIV	18/41 (43%)	8/25(36%)

Figura 18: Comparación entre tratamiento con GnRH vs. RDF. ($p < 0.05$) (27).

Este estudio concluye que se obtiene un mayor número de folículos tras la estimulación con GnRH. En cuanto al tipo de ovocitos recolectados, el número de COCs tipo I y desnudos es significativamente mayor tras la ablación del folículo dominante, mientras que tras el tratamiento hormonal se obtiene un mayor número de ovocitos tipo III y maduros. No se observan diferencias significativas en cuanto a la tasa de división a las 48 de la FIV.

Los protocolos de superovulación con FSH buscan la obtención de ovocitos más competentes para FIV.

En otro estudio se observan diferencias entre la calidad/viabilidad de los ovocitos obtenidos por OPU y los intervalos entre las sesiones de aspiración (Fig. 19) (17).

Esquema	Intervalo (días)	Sesiones (n)	Ovocitos/OPU (n)	Embriones/ovocito (%)
3-4	3	516	7.2	19.7
	4	502	6.6	17.1
7	7	48	9.1	13.5

2-5	2	259	3.9	14.1
	5	259	4.0	10.5

Figura 19: *Relación entre el intervalo de sesiones y el número de ovocitos recolectos por sesión y la tasa de producción de embriones. (17).*

La tasa de producción de embriones *in vitro* se ve aumentada cuando las sesiones siguen un protocolo de 3-4 días entre OPU.

V. DISCUSIÓN.

Son muchos los factores que afectan al éxito de la OPU. Desde aspectos técnicos como el tipo de equipo utilizado, experiencia del operador, diámetro de la aguja de punción, presión de vacío de aspiración, hasta aspectos biológicos como son la raza de las hembras a las que se les realiza la OPU, estado nutricional de los animales, estrés térmico (24), la aplicación de programas de tratamientos hormonales previos a la OPU, etc.

Los equipos de ecografía actuales presentan en su mayoría una resolución suficiente para la realización de la OPU. La principal diferencia radica en el tipo y frecuencia de sonda utilizada. Algunos autores describen la utilización de transductores de 5 MHz. de frecuencia (1), (25), otros utilizan 6,5 MHz. (15), (23), (26) y también se describe el uso de sondas de 7,5 MHz. (13), (18), (28). La penetración disminuye cuando la frecuencia aumenta, así una sonda de 7,5 MHz. penetra de 4 a 5 cm. mientras que la de 5 MHz. lo hará de 8 a 10 cm. (11). Muchos de los equipos actuales presentan la posibilidad de modificar la frecuencia del transductor.

Las sondas utilizadas son de tipo convexas o microconvexas, apenas se describe el uso de sondas lineales. Se encontraron diferencias significativas para la capacidad de visualización de folículos pequeños (2-5 mm.) a favor de las sondas convexas frente a las lineales, no encontrándose diferencias con respecto a la visualización de folículos de mediano y gran tamaño (>5 mm.) (15). La principal ventaja de las sondas lineales es su versatilidad, no estando limitado su uso a la técnica de OPU, mientras que su principal inconveniente es el limitado espacio entre el transductor y la aguja.

Según los artículos revisados, se encontraron diferencias en el diámetro de las agujas de punción utilizadas. Éstos varían entre 20 G (13), 19 G (14) o 18 G (14) (15) (23). Los estudios indican que un diámetro mayor de 18 G se asocia con una mayor tasa de recuperación de ovocitos pero también con mayor daño del estroma ovárico y mayor cantidad de sangre en el líquido folicular. Diámetros menores a 19 G reducen la tasa de recuperación de ovocitos (14).

Las diferentes presiones ejercidas por la bomba de vacío afectan al número y calidad de ovocitos aspirados. Presiones menores de 50 mmHg. no son suficientes para una adecuada recolección de COCs. (14), (15). Por encima de 50 mmHg. se reduce el porcentaje de desarrollo *in vitro* de ovocitos a blastocistos (1), (15), (17) y presiones superiores a 120 mmHg. dañan las células de las distintas capas del cúmulo (14). De tal

manera en los distintos estudios analizados se utilizan presiones de 50 mmHg.(13), 75 mmHg. (1), (25) y 85 mmHg. (26).

Las razas empleadas en los distintos estudios varían según lo que se quiera estudiar, la disposición de animales, lugar del mundo donde se lleva a cabo la investigación, etc. Muchos de los artículos analizados utilizan la raza Holstein Friesian de forma única (20), otras razas de producción cárnica como German Simmental (1), blanco azul belga (23), asturiana de los valles (26), murciano levantina (27) o comparando entre sí razas de producción láctea vs. producción cárnica (1), (28), (29). Algunos autores muestran un mayor número de ovocitos recuperados por OPU en vacas de raza charolesa en comparación con vacas frisonas, sin diferencias en el desarrollo hasta blastocisto de los ovocitos recuperados (29).

Otros artículos se centran en buscar diferencias entre vacas del género *Bos taurus* y *Bos indicus* (tipo cebuino) (14), (15), (18), (24). Algunos autores describen un mayor número de folículos visualizados y reclutados para OPU en animales *B. indicus* (14), (24), frente a otros que describen un mayor número de folículos de tamaño grande en las razas europeas (18). Un estudio realizado sobre el mismo número de animales *B. indicus* y *B. taurus*, mantenidos en iguales condiciones ambientales y de nutrición, concluye que los animales del género *B. indicus* presentan un mayor número de folículos visualizados, un mayor número de ovocitos aspirados por sesión y un mayor porcentaje de división y supervivencia de blastocistos en día 7 (24). En cuanto a sus cruces, se concluye que presentan una tasa superior de ovocitos recolectados por sesión de OPU, frente a las razas puras (15) y un porcentaje superior de embriones producidos *in vitro* (15), (18).

El factor más importante y determinante que limita o modifica considerablemente el éxito de la técnica de OPU, es la estimulación previa o no de la vaca con gonadotrofinas. La estimulación hormonal con GnRH, FSH y LH se hace de forma rutinaria en animales con bajo crecimiento folicular. Con modificaciones en las dosis y pautas de administración se consigue un aumento del número de folículos a puncionar (23). Son muchos los estudios que comparan los resultados de éxito de la OPU tras el tratamiento hormonal con FSH y sin su administración (1), (13), (15), (17), (18), (19), (20), (21), (23), (28). Concluyendo en un aumento del número de folículos/OPU, ovocitos/OPU, tasa de embriones viables (1), (13), (17), (18), (21), (23), (25) tras la estimulación con esta hormona. Resulta clara la acción de la FSH sobre el crecimiento

folicular (1), (18), no así sobre la calidad ovocitaria. Aunque un estudio reciente concluye en un aumento en la calidad de los ovocitos tras la estimulación (30). Los tratamientos con FSH pueden inducir asincronía entre maduración folicular/ovocitaria y entre maduración nuclear/citoplasmática del ovocito. En folículos mayores de 6 mm. tiene un efecto positivo sobre la calidad de los ovocitos y tasa de blastocistos *in vitro* (18).

Otros autores realizan la estimulación hormonal con GnRH (27), (31). También se describe el uso de PMSG o eCG en protocolos de estimulación (1), (18). Concluyendo en un aumento del número de folículos y ovocitos tras la administración de la hormona.

En algunos de los protocolos estudiados se describe la ablación del folículo dominante (DFR) (19), (27) ya que su presencia reduce el desarrollo y competencia de los folículos secundarios (14). Comparada la ablación con el tratamiento hormonal, se describe un aumento del número de folículos a aspirar tras la administración de GnRH sin diferencias en el número de ovocitos recolectados y su tasa de división a las 48 h. de la FIV (27). La ablación por sí misma aumenta la tasa de blastocistos frente a hembras control sin tratar, el aumento es aún mayor si se asocia la ablación folicular con un tratamiento hormonal a base de FSH (19).

El intervalo entre sesiones de OPU también puede afectar a la tasa de PIV de embriones, resultando la obtención de un mayor porcentaje de embriones por ovocito recolectado cuando las sesiones de OPU se hacen regularmente espaciadas 3-4 días (17).

VI. CONCLUSIONES.

La OPU es una técnica de reproducción asistida de última generación, que permite aumentar la eficiencia genética y reproductiva de hembras valiosas y vivas.

Para su realización se necesita disponer de material, equipo y personal cualificado; lo que limita su uso por razones prácticas y económicas frente a la producción *in vitro* de embriones bovinos a partir de ovocitos de hembras sacrificadas. Si bien, la desventaja del uso de ovarios de matadero como fuente de ovocitos para PIV, radica en el desconocimiento del estado sanitario y genético de los animales, imposibilidad de repetición, etc.

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo para la realización de este trabajo podemos concluir:

- La sonda recomendada es de tipo convexa, que facilita la visualización de los folículos de menor tamaño, con una frecuencia de 5,0-7,5 MHz.
- El diámetro idóneo de la aguja de punción para OPU es de 18-19 G. Diámetros inferiores reducen la tasa de recuperación de ovocitos y diámetros mayores dañan el estroma ovárico y producen mayor sangrado.
- La presión de vacío idónea oscila entre 50-85 mmHg., siempre dependiendo del diámetro de la aguja de punción. Presiones menores reducen la tasa de recuperación de ovocitos y presiones mayores a 100-120 mmHg. dañan los COCs.
- Existen diferencias en cuanto a la raza utilizada en el estudio: resultan más eficientes las razas menos seleccionadas y sometidas a un menor estrés productivo (razas de producción cárnica frente a producción láctea). Además el género *Bos indicus* presenta un mayor número de folículos reclutados, número de ovocitos aspirados por sesión y mayor porcentaje de blastocistos de día 7, que las razas del género *Bos taurus*.
- Son varios los protocolos de estimulación descritos, pero predomina el tratamiento de las hembras donadoras con FSH. Según los artículos analizados podemos concluir que la estimulación con FSH se traduce en un aumento del éxito de la OPU, con un mayor número de folículos y ovocitos recolectados y una mayor tasa y supervivencia de blastocistos tras la FIV.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Matthiesen M. M. Effect of donor age on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes obtained by repeated OPU from nonstimulated and FSH-superstimulated German Simmental heifers and cows at different life cycle stages. Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. München, 2011.
2. Palma G. A., Brem G. Gustavo A. Biotecnología de la reproducción. En: Palma G. A. Biotecnología de la reproducción. 1ª ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ©Gustavo A. Palma. 2001.
3. Barañao L. Biotecnología en reproducción animal. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Agrobiotecnología. 2011.
4. Knijn H. National Statistical Data of Embryo Transfer Activity in Europe (2011). 28th Annual Meeting A.E.T.E. – Saint Malo, France, 7th – 8th September 2012.
5. Mermillod P. et al. In vitro production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), November 7-10.
6. Díaz Corujo A. Obtención de ovocitos, maduración y fecundación *in vitro*. Estudio de la esterilidad, fertilización *in vitro*. Ginefiv.
7. Stroud B. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report.
8. Pfeifer L. F. M., Schneider A., Correa M. N. Factors that affect the *in vitro* production of bovine embryos: a review. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2008; 21:109-120.
9. Quintela Arias L. A., Díaz de Pablo C., García Herradón P. J., Peña Martínez A. I., Becerra González J. J. Ecografía y reproducción en la vaca. Universidade de Santiago de Compostela. 2006.
10. Garrido A. La biotecnología aplicada a la reproducción. Prosegran blog. 2011. <http://jairoserano.com/2011/05/la-biotecnologia-aplicada-a-la-reproduccion>

11. Hivorel P., Deletang F., Martino A. Ecografía del aparato genital de los rumiantes. Ceva, salud animal. Serie Reprology. 2005.
12. Ptaszynska M. Compendium de reproducción animal. 9ª ed. Editado por Intervet Internacional bv. 2007.
13. Ruiz López S. Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. Cría y salud, nº 31, 58-63. 2010 <http://es.scribd.com/doc/32729927/cys-31-58-63-OVUM-PICK-UP-OPU-en-bovinos-Aplicaciones-en-Biotecnologia-de-la-reproduccion/>
14. Marcondes Seneda M., Fernandes da Silva K., Constantino Max M., Garbelini Gomes R., Aires Lisboa L., Fortes Pontes J. H. Aspiración de ovocitos por ultrasonografía transvaginal y producción de embriones. Departamento de Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná. http://www.invitrobrasil.com.br/pdf/pesquisa/14-Seneda_MM_et_al_1.pdf/
15. Boni R. Ovum Pick-Up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. Department of Animal Science, University of Basilicata, Potenza, Italy. Anim Reprod., v.9, n.3, p.362-369, Jul/Sept. 2012.
16. Congelación de embriones bovinos producidos in vitro. Última actualización 17/10/2003 <http://www.albeitar.portalveterinaria.com/noticias/>
17. Reproducción Asistida en Bovino usando Ovum Pick Up (OPU) y Fecundación *In Vitro*. Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA – Madrid. 2009 http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_50_8_CORDOBA.pdf/
18. Bols P. Punción folicular (Ovum Pick-Up, OPU) en la vaca. En: Palma G. A. Biotecnología de la reproducción. 1ª ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ©Gustavo A. Palma. 2001.
19. Chaubal S. A., et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. Theriogenology. 65:1631-48. 2006. (Abstract).

20. Blondin P., Bousquet D., Twagiramungu H., Barnes F., Sirard M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod.* 2002 Jan;66(1):38-43. (Abstract).
21. Merton J. S., et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology.* 59: 651-74. 2003. (Abstract).
22. González Cantalapiedra A. Curso práctico de cirugía de bovinos. Granja Escuela de Luces – Colunga – Asturias. 17 y 18 de mayo de 2013.
23. De Roover R., Feugang J. M. N., Bols P. E. J., Gericot G. Hanzen Ch. Effects of Ovum Pick-Up and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production. *Reprod Dom Anim* doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x ISSN 0936-6768
24. Baruselli P. S., et al. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4), 134-141 (2012)
25. Cech S., Havlicek V., Lopatarova M., Vyskocil M., Dolezel R. Effects of superstimulation with FSH on follicular population and recovery rate of oocytes in the growing phase of the first and second follicular wave. *Vet. Med. – Czech*, 47,2002(2-3):33-37.
26. Hidalgo C. O., et al. Primeros terneros producidos *in vitro* tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Arch. Zootec.* 51:411-422.2002.
27. García J. R., Romero-Aguirregomez J., Astiz S., Poto A., Ruiz S. OPU oocyte yield and early embryo development after follicular ablation or exogenous GnRH (Dalmarelin) in Murciano-Levantina cows. 28th Annual Meeting A.E.T.E. – Saint Melo, France, 7th – 8th September 2012
28. Gamarra G., Lacaze S., Marquant Le Guienne B., Ponsart C. Set-up of ovum pick up and *in vitro* embryo production in midatest: first results. 28th Annual Meeting A.E.T.E. – Saint Melo, France, 7th – 8th September 2012
29. Karadjole M., et al. The efficiency of Ovum Pick Up and *in vitro* embryo development in Charolais and Holstein-Friesian cows. 26th Annual Meeting A.E.T.E. – Kuopio, Finland, 10th-11th September 2010.

30. Presicce G. A., et al. Oocyte Source and Hormonal Stimulation for In Vitro Fertilization Using Sexed Spermatozoa in Cattle. *Veterinary Medicine International*. 2011:8 (Abstract).
31. Astiz S., Romero-Aguirregomezcorta J., Poto A., Ruiz S. Synchronization protocol for bovine OPU-IVP embryo transfers of Murciano-levantina breed in recipients in a dairy farm: preliminary results. 28th Annual Meeting A.E.T.E. – Saint Melo, France, 7th – 8th September 2012