



# **EFFECTO DEL ESTATUS OVÁRICO SOBRE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS**

Médico Veterinario Edgar Ricardo Moreno Jerez

Tesis  
Para optar al Grado Académico de  
Magister en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, Diciembre de 2018



# **EFFECTO DEL ESTATUS OVÁRICO SOBRE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS**

**Med. Veterinario Edgar Ricardo Moreno Jerez**

## **Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Mariana Caccia. Doctora en Ciencias Biológicas

**Codirector:** Diego F. Dubeibe Marín. Master en Ciencia Animal

## **Tribunal Examinador de Tesis**

MSc. PhD. M. Belén Rabaglino .....

M.V. Dr. (M.B.A) Humberto Tribulo .....

M.V. MSc. PhD Pablo Bosch .....

**Presentación formal académica Córdoba, 05 de Diciembre de 2018**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Dra. MARIANA CACCIA, directora del proyecto por la aceptación de asesoría para la culminación de esta investigación; su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido invaluable, tanto para el proyecto como para mi formación como investigador.

MSc DIEGO DUBEIBE, Codirector por su importante asesoría, guía, aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis.

M.V. ALDEMAR CHAVEZ, por su disponibilidad y suministro de medios para la experimentación, además de su compartir en lo que respecta a técnicas operativas de laboratorio.

IRAC y UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, por la oportunidad de cursar estudios de maestría y su aporte académico en mi formación profesional.

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA, por facilitar siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

ALEJANDRA ARIAS, SILVIA RESTREPO, PABLO TIBADUIZA Y JORGE GARCIA, estudiantes UCC, por el apoyo práctico en las largas jornadas de laboratorio.

Dr DANIEL MARTÍNEZ, Por su apoyo incondicional en el desarrollo estadístico de la investigación.

## DEDICATORIA

A **DIOS** ese ser supremo invisible pero presente, quien a pesar de mis debilidades y defectos me permite despertar a diario con mayores expectativas y el deseo de superación personal y de hacer mejor el hoy que el ayer; a la memoria de mis padres: **HUMBERTO Y ANA FRANCISCA**, quienes se empeñaron en inculcar en mi valores y principios que me permiten calificar como humano útil a la sociedad, fueron mi mano derecha y mi sostén para lograr llegar a ser lo que hoy soy; a **MI FAMILIA Y AMIGOS**, por aceptarme tal como soy y estar presente en los momentos que he necesitado una palabra de aliento y motivación.

**EDGAR RICARDO**

## Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la ciclicidad de la hembra bovina sobre la tasa de recuperación y competencia de ovocitos sometidos a maduración y fertilización in vitro (FIV). Pares de ovarios de cada animal fueron obtenidos de manera individual en un matadero local. Inicialmente fueron clasificados de acuerdo a la presencia de cuerpo lúteo (CL), como provenientes de vacas cíclicas (VC) y en ausencia de CL, como procedentes de vacas no cíclicas (VNC). Posteriormente, para establecer la influencia directa del CL, los ovarios se clasificaron en tres grupos diferentes, ovarios originarios de vacas no cíclicas (NCL), ovarios con presencia de CL (CL+), ovarios provenientes de VC, pero sin presencia de (CL-). En cada una de las clasificaciones propuestas fueron realizados dos experimentos. El primero consistió en recuperar los ovocitos por ovario por grupo experimental, y evaluar la calidad del ovocito. Posteriormente, los ovocitos de calidad 1 y 2 se sometieron a maduración in vitro (MIV). A las 7, 14 y 22 horas, 10 a 15 ovocitos fueron coloreados con tinción de orceina al 2% para evaluar la maduración nuclear. En el segundo experimento, ovocitos de calidad 1 y 2 fueron recuperados de los ovarios y se fertilizaron con espermatozoides de toro Brahman durante 18 horas en FIV. Los cigotos fueron cultivados in vitro (CIV), en co-cultivo con células de *cúmulus* durante 7 días en condiciones de MIV y FIV. Se evaluó la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos el día 4 y 6 del CIV respectivamente. El primer experimento reveló una mayor recuperación de ovocitos de ovarios VNC, recuperando un mayor número de ovocitos por ovario de calidad tipo 1. En la maduración nuclear, los ovocitos de ovarios VC tuvieron una mayor y más avanzada maduración nuclear, no obstante, al evaluar los ovarios en forma individual, los ovocitos recuperados de ovarios CL+, presentaron una baja competencia meiótica. En el segundo experimento, la tasa de clivaje fue mayor en los ovocitos de ovarios VC comparado con VNC, sin embargo, la tasa de blastocisto fue más alta en los embriones producidos a partir de ovocitos recuperados de ovarios VNC. Se concluye para el efecto del CL sobre la recuperación, la calidad y competencia ovocitaria, que los ovocitos provenientes de ovarios con CL tuvieron una competencia ovocitaria inferior en comparación con los ovocitos provenientes

de ovarios sin CL, sugiriendo que la presencia del CL en los ovarios afecta la producción *in vitro* de embriones en la especie bovina.

Palabras clave: Recuperación ovocitaria, calidad morfológica de CCOs, competencia ovocitaria, maduración ovocitaria, tasa clivaje, tasa blastocisto.

## **Abstract**

The aim of the study was to determine the influence of the cyclicity of the bovine female regarding the recovery rate and the oocyte competence in oocytes subjected to maturation and in vitro fertilization (IVF). Cow ovaries were collected at a local slaughterhouse and classified according to the presence of corpus luteum (CL) as cyclic cow (CC) or as non-cyclic cow (NCC) in the absence of CL. To establish the influence of the CL on oocyte quality, the ovaries were classified in CL+, CL- and non-CL (NCL). Two experiments were conducted. The first evaluated oocyte recovery and quality. Afterwards, quality 1 and 2 oocytes were submitted to in vitro maturation (IVM). At 7, 14 and 22 hours, 10 to 15 oocytes were stained with orcein 1% to evaluate nuclear maturation. In the second experiment, quality 1 and 2 oocytes were recovered and fertilized with Brahman bull sperm during 18 hours in IVF. The zygotes were in vitro co-cultured (IVC), during 7 days. Cleavage and blastocyst rate were evaluated at day 4 and 6 of IVC. The first experiment revealed superior oocyte recovery from NCC ovaries, recovering more type-1 oocytes per ovary. In the nuclear maturation, the oocytes from CC ovaries had a greater nuclear maturation, although the oocytes recovered from ovaries with a CL, presented lower meiotic competence. In the second experiment, the cleavage rate was greater in oocytes from CC ovaries than NCC ovaries, however, the blastocyst rate was higher in the embryos from NCC ovaries than CC ovaries. We concluded that, oocytes recovered from ovaries with a CL had inferior oocyte competence than oocytes originated from ovaries without CL, suggesting that the CL could influence oocyte competence and therefore the outcome of in vitro embryo production in bovine species.

Keywords: oocyte retrieval, oocyte competence, morphologic quality of cumulus oocyte complexes, oocyte maturation, cleavage rate, blastocyst rate.

## Tabla de contenido

Capítulo I.....	15
Introducción.....	15
Hipótesis.....	18
Objetivos .....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Capítulo 2 .....	20
Materiales y métodos.....	20
Recolección y transporte de los ovarios .....	20
Grupos experimentales .....	21
Recuperación de los complejos <i>cúmulus</i> -ovocitos (CCOs).....	21
Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.....	22
Evaluación de maduración nuclear.....	24
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV). .....	29
Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV).....	31
Diseño experimental .....	32
Análisis estadístico .....	33
Capítulo 3 .....	35
Resultados .....	35
Experimento 1. ....	35
Análisis de la recuperación, calidad morfológica de los ovocitos y maduración nuclear en ovocitos de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC)..	35
Maduración nuclear en vacas cíclicas (VC) y No cíclicas (VNC). .....	37
Análisis del porcentaje del clivaje y desarrollo de blastocisto a partir de ovocitos recuperados de ovarios VC y VNC. ....	38
Experimento 2.....	39
Análisis de la recuperación, calidad morfológica y maduración nuclear en los ovocitos provenientes de ovarios CL+, CL- y NCL.....	39
Maduración nuclear, tres grupos experimentales CL-, CL+ y NCL. ....	41
Análisis del porcentaje del clivaje y desarrollo de blastocisto a partir de ovocitos recuperados de ovarios CL+, CL- y NCL. ....	42

Capítulo 4 .....	44
Discusión .....	44
Conclusiones .....	52
Bibliografía.....	53

## Lista de figuras

Figura 1 Ovarios de matadero separados en bolsas zip-lock.....	20
Figura 2. Líquido folicular con sedimento rico en complejos <i>cúmulus</i> - ovocitos .....	22
Figura 3. (A)- gotas con medio de maduración-(B)- gotas con medio de lavado .....	24
Figura 4. (A)- Desnudamiento de los ovocitos en caja de 4 pozos;( B)- fijación de los ovocitos en la lámina, para someterla a una solución fijadora. ....	25
Figura 5 (A)- tinción orceína acética al 2% por capilaridad; (B)- lavado solución fijadora ácido acético-etanol.....	26
Figura 6. Ovocito bovino en estado de Vesícula Germinativa. Se observa detalle de la cromatina (a) y membrana nuclear (b). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x. ....	27
Figura 7. Ovocito bovino en estado de Vesícula Germinativa. Se observa detalle de la cromatina (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x. ....	27
Figura 8. Ovocito bovino en estado de Metafase I. Se observa detalle de la cromatina condensada (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x. ....	28
Figura 9. Ovocito bovino en estado de Anafase I. Se observa detalle de la separación de los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula (a) (b) unidos por las fibras del huso (c). Tinción con aceto orceína al 2%. 1000x. ....	28
Figura 10. Ovocito bovino en estado de Telofase I. Se observa detalle de los dos grupos de cromosomas condensados (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x. .....	29
Figura 11. Ovocito bovino en estado de Metafase II. Se observan los dos grupos de cromatina. Uno condensado (a) y otro correspondiente al corpúsculo polar (b). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x. ....	29
Figura 12. Columnas de Percoll (Gradientes 90, 60 y 30%).....	30
Figura 13. A, gotas de lavado para FIV; B, gotas de medio de FIV. ....	31
Figura 14. Ovocitos promedio por ovario, por colecta, de ovarios provenientes de VC versus VNC. ....	35

Figura 15. Número de ovarios procesados, ovocitos recuperados, y promedio de ovocitos por ovario, por colecta, grupos experimentales CL-, CL+ y NCL..... 39

Figura 16. Promedio de ovocitos por ovario, por colecta y grupo experimental (CL+, CL-, y NCL). ..... 42

## Lista de tablas

Tabla 1. Promedio de complejos <i>cúmulus</i> -ovocitos recuperados de ovarios provenientes de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC). .....	36
Tabla 2. Calidad morfológica de los ovocitos recuperados a partir de ovarios provenientes de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC). .....	36
Tabla 3. Promedio del porcentaje de la maduración nuclear de ovocitos (media $\pm$ error estándar) a las 7, 14 y 22 horas de los grupos experimentales VC y VNC. ....	37
Tabla 4. Porcentaje de clivaje y porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos a fecundar y de los embriones clivados, en dos grupos experimentales (VC y VNC). ....	38
Tabla 5. Promedio de complejos <i>cúmulus</i> -ovocitos recuperados de ovarios provenientes de los grupos experimentales CL-, CL+ y NCL. ....	40
Tabla 6. Calidad morfológica de los ovocitos recuperados a partir de los grupos experimentales ovarios CL-, CL+ y NCL. ....	40
Tabla 7. Promedio del porcentaje de la maduración nuclear de ovocitos (media $\pm$ error estándar) a las 7, 14 y 22 horas de los grupos experimentales CL+, CL- y NCL. ....	41
Tabla 8. Porcentaje de clivaje y porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos a fecundar y de los embriones clivados, en tres grupos experimentales CL+, CL- y NCL. ....	43

## Lista de abreviaturas y símbolos

- ANA I: Anafase I.
- BSA: Albumina sérica bovina.
- CCOs: Complejos cumulus-ovocitos.
- CIV: Cultivo *in vitro*.
- CL: Cuerpo lúteo.
- CL+: Ovario con cuerpo lúteo.
- CL-: Ovario sin cuerpo lúteo.
- EE: Error estándar.
- FIV: fertilización *in vitro*.
- FSH: Hormona folículo estimulante.
- IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
- LH: Hormona Luteinizante.
- MIV: Maduración *in vitro*.
- mL: Mililitro.
- MI: Metafase I.
- MII: Metafase II.
- NaCl: Cloruro de sodio.
- NCL: Ningún ovario con cuerpo lúteo.
- OPU: Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía.
- PIV: Producción *in vitro*.
- QVG: Quiebre de vesícula germinativa.
- PVA: Alcohol pilivinílico.
- SFB: Suero fetal bovino.
- SOF: Medio de fluido oviductual sintético
- Spz: Espermatozoides.
- TALP: Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato.
- TEL I: Telofase I.
- TCM-199: Medio de cultivo tisular.
- UI: Unidades internacionales.

μg: Microgramo.

μl: Microlitro.

VC: Vacas cíclicas.

VG: Vesícula germinativa.

VNC: Vacas no cíclicas.

## Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIV) es una herramienta biotecnológica de la reproducción asistida que brinda la posibilidad de acelerar el progreso genético de los animales, implicando una amplia recuperación de embriones de hembras genéticamente superiores, para que produzcan un mayor número de crías, lo que no sería posible mediante el apareamiento tradicional (Godke, *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años, esta biotecnología presenta una alta variabilidad en los resultados, la tasa promedio de producción de embriones hasta el estado de blastocisto no supera el 40,6% según datos la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (International Embryo Transfer Society “IETS”) (Baruselli *et al.*, 2015), resultados que contrastan con lo observado en condiciones *in vivo*, donde los niveles de desarrollo a blastocisto alcanzan un 80% (Rizos *et al.*, 2002).

Para la producción *in vitro* de embriones se pueden utilizar ovocitos provenientes de vacas vivas, a través de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (*ovum pick up* [OPU]) o de ovarios de vacas faenadas. En cada sesión de OPU, comúnmente se obtiene una población muy heterogénea de ovocitos con diferentes potenciales de desarrollo, hecho que pudiese contribuir a la variabilidad y la ineficiencia de los resultados señalados anteriormente. Sin embargo, esta técnica posibilita maximizar el aprovechamiento de ovocitos que fisiológicamente sufren atresia, pero que poseen potencial de producción de embriones en el laboratorio (Bousquet *et al.*, 1999). En este caso, estudios realizados promueven que la punción folicular post-superovulación puede ser una alternativa viable, pues existe la posibilidad de incrementar la producción de embriones en el intervalo entre superovulaciones, hecho que se demostró en vacas sometidas a la punción folicular seriada, después del tratamiento de superovulación, presentando un aumento en la calidad de los ovocitos recolectados (Pfeifer *et al.*, 2011). En diferentes estudios de esta área, el desarrollo *in vitro* de los embriones

de ganado, se ha visto afectado por factores extrínsecos e intrínsecos de los ovocitos, que pueden interferir en la fertilización y desarrollo hasta la etapa de blastocisto (Rizos *et al.*, 2002). Entre los factores intrínsecos se dice que la presencia de un folículo dominante tiene un efecto inhibitor sobre el desarrollo de otros folículos a través de la secreción de inhibina y estradiol (Wolfsdorf *et al.*, 1997; citado por Ramos *et al.*, 2010). Por otro lado, se describió que los ovocitos derivados de folículos subordinados tienen menos capacidad de convertirse en embriones sanos que los ovocitos derivados de folículos en crecimiento (Hendricksen *et al.*, 2004). En la literatura se reportan protocolos de aspiración folicular en diferentes días del ciclo estral, donde el uso del estradiol en asociación con progesterona para la sincronización de la onda folicular tiene un efecto inhibitor sobre el desarrollo folicular (Bó *et al.*, 2002) y sobre su capacidad para inducir atresia folicular mediante la inhibición de la liberación de FSH (Caccia and Bó, 1998; Sartori *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2010). Sin embargo, hay estudios que evaluaron el mejor momento o intervalo para realizar la técnica de OPU, usando este tipo de protocolos para sincronizar los patrones de emergencia de la onda folicular. Los resultados mostraron un mayor efecto en la supresión de FSH y la aparición de una nueva onda folicular, pero no se pudo evitar o retrasar el establecimiento de la dominancia folicular, estos tratamientos no mejoraron el número y la calidad de los ovocitos recuperados o el número de embriones producidos (Ramos *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estas afirmaciones, es amplio el conocimiento sobre el desarrollo folicular y los efectos que pueden tener la fase del ciclo estral sobre la recuperación de ovocitos y la contribución para mejorar la eficacia de la PIV. Fisiológicamente el ovocito que será fertilizado proviene de folículos sanos, no obstante, los CCOs recolectados para la PIV se obtienen de folículos sin tener en cuenta la fase folicular; por lo que pueden estar sometidos a diferentes niveles de estradiol, progesterona, FSH y LH. La progesterona plasmática tiene efecto sobre la cantidad y calidad de los ovocitos, ya que permite que el folículo esté expuesto un periodo prolongado a pulsos de LH de baja amplitud, dando como resultado ovocitos de buena calidad (Penitente-Filho *et al.*, 2015). Sin embargo, estudios más recientes evaluaron el impacto del cuerpo lúteo (CL) en la calidad de ovocitos bovinos, mostrando que la presencia del CL tenía un

efecto negativo sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos ipsilaterales comparado con aquellos colectados de ovarios que no tenían CL (Hajarian *et al.*, 2016). Por otra parte, se sugirió que el fluido folicular en ovarios de ovinos sin CL, es más apropiado para la maduración de oocitos en comparación con el fluido proveniente de ovarios con CL (Shabankareh *et al.*, 2010). Después de la formación del CL, se forman nuevos vasos sanguíneos para su desarrollo, y el CL recibirá mayor flujo sanguíneo comparado con otras zonas del ovario (Shabankareh *et al.*, 2013). Por tanto, la disminución en el flujo sanguíneo a las células foliculares en los ovarios con CL produciría un suministro reducido de gonadotropinas y otros productos bioquímicos sistémicos y factores hormonales necesarios para el desarrollo folicular (Acosta and Miyamoto, 2004; Hajarian *et al.*, 2016).

La calidad de los ovocitos que ingresan al proceso de maduración *in vitro* (MIV), tiene influencia directa en la proporción de blastocistos que podrían ser obtenidos al finalizar el procedimiento, así, la calidad de los embriones producidos depende de las condiciones en las cuales se desarrolla el periodo de cultivo (CIV) (Lonergan and Fair, 2008). Unos autores apoyan la idea de que la calidad de los ovocitos puede ser más importante para el éxito del PIV que las condiciones de cultivo *in vitro* (Penitente-Filho *et al.*, 2015). Además, se han desarrollado estudios para distinguir los complejos cúmulo-ovocito competentes (CCOs) de los incompetentes (De Wit *et al.*, 2000). En este sentido, es posible inferir que la eficiencia de la PIV depende en gran medida de la calidad de las materias primas utilizadas para la producción de los embriones, en otras palabras, la capacidad que tengan los ovocitos para completar el proceso de maduración, ser fertilizados y desarrollarse como embriones viables (Landínez *et al.*, 2010).

Ha sido postulado que la calidad de los ovocitos depende de la calidad de los folículos en los cuales estos se desarrollan (Penitente-Filho *et al.*, 2015). Por su parte, la calidad de los folículos está directamente influenciada por la dinámica folicular presente en los ovarios, lo que obliga a la coexistencia, en un mismo período de tiempo, de folículos saludables y en crecimiento, y de folículos en diferentes grados de degeneración o atresia (Pfeifer *et al.*, 2011). Asimismo,

estudios realizados en esta área indican que el estado nutricional, el estado fisiológico, la edad (Yamamoto *et al.*, 2010), la etapa del ciclo estral (Tan and Lu, 1990; Wurth *et al.*, 1994), los niveles hormonales (Kruip and Dieleman, 1982) y otros factores inherentes a las vacas donadoras, pueden afectar la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos. Sin embargo, la completa identidad de los factores que determinan la competencia ovocitaria no ha sido totalmente dilucidada, y otros eventos no identificados podrían interferir en este aspecto.

Algunas veces, en sistemas de producción *in vitro* de embriones lo ovocitos que se utilizan provienen de ovarios de animales sacrificados en frigoríficos, de los cuales se desconoce su historia reproductiva y la etapa del ciclo estral, por lo que la calidad de los ovocitos recolectados es variable. A pesar de que se han estudiado ampliamente diferentes factores asociados con la heterogeneidad en la competencia de desarrollo de los ovocitos colectados de folículos en crecimiento, todavía, sigue siendo un reto para el éxito de la maduración *in vitro* (IVM) y la tasa de desarrollo embrionario (Hajarian *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, el objetivo de este trabajo fue investigar si existe una relación entre el estatus ovárico de las hembras bovinas donadoras sobre la competencia nuclear de los ovocitos, la tasa de clivaje y la producción de blastocistos *in vitro*.

## **Hipótesis**

La calidad y la cantidad de ovocitos recuperados en cada sesión de aspiración folicular varían en función del estatus cíclico de hembras bovinas donadoras, siendo una consecuencia directa de la presencia o ausencia del cuerpo lúteo al momento de realizar el procedimiento y su posterior sometimiento a maduración y fertilización *in vitro*.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la influencia de la ciclicidad de la hembra bovina y la presencia del cuerpo lúteo en el ovario sobre la tasa de recuperación y la competencia de los ovocitos recuperados y sometidos a maduración y fertilización *in vitro*.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de la ciclicidad de las vacas sobre la tasa de recuperación y la calidad morfológica de los complejos cúmulus-ovocitos recuperados.
2. Determinar la relación entre la ciclicidad y la competencia nuclear y citoplasmática de los ovocitos.
3. Evaluar el efecto de la presencia del cuerpo lúteo sobre la tasa de recuperación, la calidad y la competencia nuclear de los ovocitos durante la maduración y la fertilización *in vitro*.

## Capítulo 2

### Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cooperativa de Colombia (UCC), ubicado en el Centro Académico Agropecuario Guatiguará. El centro se localiza en el municipio de Piedecuesta (Santander, Colombia). Para esta investigación fueron utilizados ovarios recolectados de hembras bovinas faenadas en el frigorífico Río Frío, ubicado entre los municipios de Floridablanca y Girón (Santander, Colombia). Para el presente estudio no se tomó en cuenta la edad, la raza, ni la condición corporal de los animales.

### Recolección y transporte de los ovarios

Inmediatamente después del sacrificio, los ovarios recuperados fueron separados por pares correspondientes al mismo animal. El transporte de las piezas fue realizado en recipientes con aislamiento térmico el cual contenía solución salina fisiológica (NaCl) al 0,9% suplementada con antibióticos (penicilina G [100UI/mL] /Sulfato de estreptomicina [100µg/mL]), a una temperatura de 25 °C monitoreada permanentemente, (Figura 1). El traslado de los ovarios hasta el laboratorio de Reproducción Animal fue realizado en un tiempo menor a 3 horas.



**Figura 1 Ovarios de matadero separados en bolsas zip-lock**

## **Grupos experimentales**

Una vez en el laboratorio, para la primera fase del experimento, los ovarios fueron clasificados y separados en dos grupos distintos, según el presunto estatus cíclico: pares de ovarios con presencia de un cuerpo lúteo (en alguno de ellos), fueron clasificados como ovarios procedentes de hembras cíclicas (**VC**), y pares de ovarios sin presencia de cuerpo Lúteo ni folículo dominante (> 10 mm), fueron clasificados como ovarios de hembras no cíclicas (**VNC**).

En la segunda fase experimental, y con el objetivo de evaluar el efecto del cuerpo lúteo (CL) sobre las tasas de recuperación y competencia ovocitaria, los ovarios del grupo VC fueron individualizados, y pasaron a formar dos grupos diferentes: 1. Ovarios con cuerpo lúteo (**CL+**): Ovarios con presencia de un cuerpo lúteo con apariencia funcional, como se describió anteriormente, 2. Ovarios sin cuerpo lúteo (**CL-**): Ovarios sin presencia de un cuerpo lúteo, provenientes de vacas cíclicas, y 3. Ovarios de animales clasificados inicialmente como provenientes de VNC, continuaron en un mismo grupo, ahora denominado (**NCL**).

### **Recuperación de los complejos *cúmulus*-ovocitos (CCOs).**

Los ovarios fueron lavados en el mismo tipo de solución utilizada para el transporte, precalentada a 37°C y todos los tejidos sobrantes fueron retirados de los ovarios (Mayes y Sirard, 2001).

La recuperación de los complejos *cumulus*-ovocitos (CCOs) se realizó mediante aspiración folicular con una aguja calibre 18G x 1<sup>1/2</sup> acoplada a una jeringa de 5mL. El líquido folicular obtenido fue depositado en tubos cónicos para centrifuga (Falcon®, Franklin Lakes, USA) con capacidad de 50mL, y dejado en reposo durante 10min, con el objetivo de permitir que los CCOs presentes se decantaran (Figura 2). Para la búsqueda, el sedimento fue depositado en una caja de Petri (Falcon®, Franklin Lakes, USA) de 96mm con la ayuda de una Pipeta Pasteur plástica (Biosigma®, Valletta, Italia). La recuperación se realizó bajo lupa estereoscópica (Leica Zoom 2000®, Buffalo, USA) a 250 X.



**Figura 2. Líquido folicular con sedimento rico en complejos *cúmulus-ovocitos***

Todos los CCOs recolectados de los ovarios fueron clasificados en cuatro calidades diferentes teniendo en cuenta la apariencia de células del *cumulus* y del citoplasma de los ovocitos, de acuerdo con lo descrito por Leibfried y First (1979):

Tipo 1: CCOs con más de tres capas compactas de células del *cumulus*, citoplasmas homogéneos y completos dentro de la zona pelúcida.

Tipo 2: CCOs con menos de tres capas de células de *cumulus*, compactas o cubiertas parciales; citoplasmas homogéneos con zonas oscuras dentro.

Tipo 3: cubiertas celulares expandidas, dispersadas en una matriz oscura en forma de telas de araña, con citoplasmas irregulares en la mayor parte de los casos.

Tipo 4: con residuos de células del *cumulus* o desnudos, rodeados únicamente por la zona pelúcida y con citoplasmas regulares o irregulares.

### **Maduración *in vitro* de los ovocitos.**

Los CCOs clasificados como tipo 1 y tipo 2 fueron colocados en medio de maduración, que consistió en TCM-199 (Medio de cultivo para tejidos, SIGMA),

suplementado con 1,0mg/mL de alcohol polivinílico (PVA); 4,4mg/mL de piruvato de sodio; 4mg/mL de Glutamina; 3mg/mL de ácido ascórbico; 0,2mg/mL de myoinositol; 50µl/mL de estreptomicina; 50UI/mL de Penicilina; 100mM de cisteamina; 2,2mg/mL de bicarbonato de sodio, 0,05UI/mL de hMG (gonadotropina menopáusicas humana con actividad FSH y LH) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Luego de la elaboración del medio de maduración se realizaron las microgotas correspondientes para cada grupo experimental. Para ello se tomaron, bajo cabina de flujo laminar, cajas de Petri estériles de 33mm (Falcon®, Franklin Lakes, USA) y con micropipeta (capacidad de 10 - 100µL) se hicieron 5 gotas de 100µL de medio de maduración en cada caja de Petri, siendo recubiertas por aceite mineral (SIGMA) previamente filtrado.

Las 5 gotas/caja de Petri fueron distribuidas para cada uno de los tratamientos de acuerdo con el experimento y sus respectivas repeticiones, fueron llevadas a la incubadora para permitir su acondicionamiento en ambiente del 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 38,5°C, durante un tiempo mínimo de 2 h antes de la obtención de los CCOs.

Los CCOs seleccionados fueron lavados 5 veces en gotas de 100µl de medio de lavado (TCM/HEPES), y luego fueron distribuidos en grupos de 20 CCOs/gota de medio de maduración previamente equilibrados (Figura 3). La maduración fue realizada en incubadora a 38.5°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 22 h.



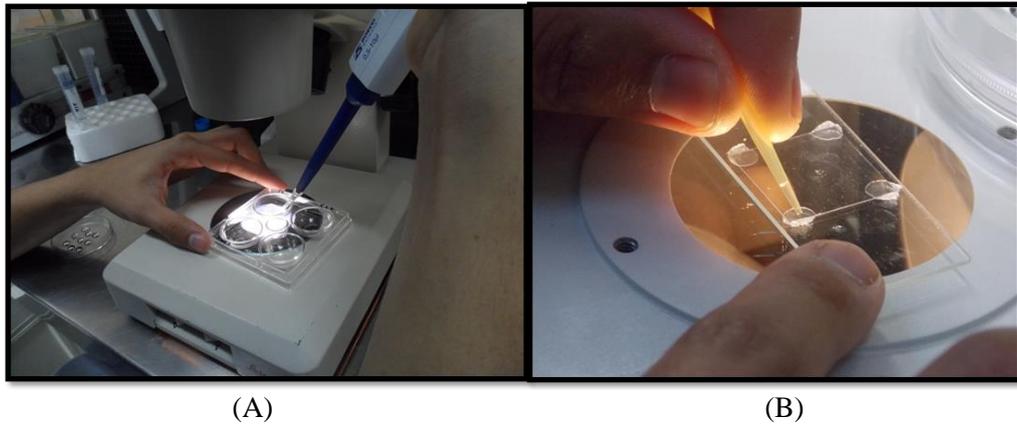
(A)

(B)

**Figura 3. (A)- gotas con medio de maduración-(B)- gotas con medio de lavado**

### **Evaluación de maduración nuclear.**

Para la evaluación de la maduración nuclear 10 de los CCOs, de cada una de las gotas correspondientes a cada grupo experimental, fueron retirados a las 7, 14 y 22h de cultivo. Los CCOs se depositaron en una caja de Petri de cuatro pozos (Falcon®, Franklin Lakes, USA) con 500 $\mu$ L de solución PBS (ViGro®, Bioniche) en cada uno de ellos. Posteriormente se procedió a retirar las células del *cúmulus* de forma mecánica con ayuda de una pipeta de 200 $\mu$ L, siempre observando en la lupa estereoscópica (200X) para tener mejor control durante el desnudamiento (Figura 4), y así, evitar rupturas en la membrana del ovocito o insuficiente desnudamiento que dificultara la posterior evaluación.



**Figura 4. (A)- Desnudamiento de los ovocitos en caja de 4 pozos; (B)- fijación de los ovocitos en la lámina, para someterla a una solución fijadora.**

Después del desnudamiento, los ovocitos fueron lavados para quitar el exceso de células del *cúmulus* que quedaron sueltas en el medio en el cual se desnudaron; para esto, los ovocitos se pasaron por 4 gotas de PBS, siempre manteniendo separado cada grupo experimental. Una vez lavados, los ovocitos fueron montados entre lámina y laminilla (portaobjeto y cubreobjetos) en una gota de  $2\mu\text{L}$  de PBS. Fue utilizada silicona líquida para su fijación y se ejerció suficiente presión para evitar la salida de los ovocitos durante la posterior manipulación.

Se preparó una solución fijadora compuesta de ácido acético y etanol al 90% en una proporción de 1:3 respectivamente. Los ovocitos destinados a la evaluación de la maduración nuclear fueron sumergidos en esta solución, y permanecieron allí durante 24 h en nevera a  $5^{\circ}\text{C}$ . Seguido de esto, se procedió a realizar la coloración con orceína acética al 2 %, para este propósito, la solución de orceína se aplicó por un lado de la laminilla con ayuda de una pipeta Pasteur y por el otro lado se puso un papel absorbente para ayudar a pasar por capilaridad el colorante y así lograr una tinción homogénea de los ovocitos (Prentice-Biensch *et al.*, 2012).

Después de la tinción, se contabilizaron cinco minutos, y posteriormente se realizó el lavado del exceso de colorante con la misma solución fijadora (Figura 5), realizando el mismo procedimiento empleado en la coloración de las láminas.

Luego del lavado, se sellaron los espacios entre la lámina y la laminilla utilizando esmalte con el propósito de evitar el secado de los ovocitos.



**Figura 5 (A)- tinción orceina acética al 2% por capilaridad; (B)- lavado solución fijadora ácido acético-etanol**

Se realizó la evaluación de la configuración de la cromatina, para determinar en qué fase de meiosis se encontraban los ovocitos, bajo microscopio óptico (Zeiss®, Jena, Alemania) a 400X, donde se tuvieron en cuenta los criterios de maduración in vitro (Gottardi and Mingoti, 2009). Tras observar la configuración de la cromatina, los ovocitos fueron clasificados en alguna de las siguientes fases de la meiosis: Vesícula germinativa (VG), Quiebre de vesícula germinativa (QVG), Metafase I (MI), Anafase I (ANA I), Telofase I (TEL I) y Metafase II (MII).

**Vesícula germinativa (VG):** Se caracteriza por la presencia de una membrana nuclear visible. La cromatina está dispuesta alrededor del nucléolo, caracterizada por una distribución irregular en estados iniciales y condensación de los cromosomas en estados más avanzados. Este estado es indicativo de inmadurez celular (Figura 6). (Gottardi and Mingoti, 2009).



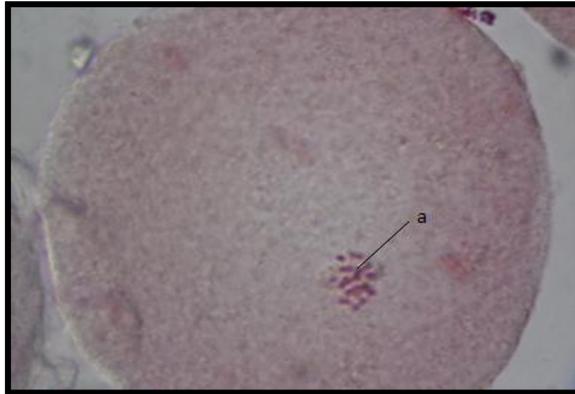
**Figura 6. Ovocito bovino en estado de Vesícula Germinativa. Se observa detalle de la cromatina (a) y membrana nuclear (b). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x.**

**Ruptura de la vesícula germinativa (RVG):** Desaparece la membrana nuclear y la cromatina se observa en un alto grado de condensación. Los cromosomas forman una agrupación individual y en ocasiones es posible observar vestigios de la membrana nuclear (Figura 7). (Gottardi and Mingoti, 2009).



**Figura 7. Ovocito bovino en estado de Vesícula Germinativa. Se observa detalle de la cromatina (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x.**

**Metafase I (MI):** Comparado al estado anterior se encuentran menos condensados los cromosomas y distribuidos en forma de puntos pequeños que en conjunto presentan un formando circular. Alternativamente los cromosomas pueden presentarse formando una fila (Figura 8). (Gottardi and Mingoti, 2009).



**Figura 8. Ovocito bovino en estado de Metafase I. Se observa detalle de la cromatina condensada (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x.**

**Anafase I (ANA I):** En este estado los cromosomas comienzan a dividirse en dos grupos, presentando la apariencia de estar siendo halados para extremos opuestos (Figura 9). (Gottardi and Mingoti, 2009).



**Figura 9. Ovocito bovino en estado de Anafase I. Se observa detalle de la separación de los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula (a) (b) unidos por las fibras del huso (c). Tinción con aceto orceína al 2%. 1000x.**

**Telofase I (TELI):** Los dos grupos de cromosomas se presentan altamente condensados y completamente separados (Figura 10). (Gottardi and Mingoti, 2009).



**Figura 10. Ovocito bovino en estado de Telofase I. Se observa detalle de los dos grupos de cromosomas condensados (a). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x.**

***Metafase II (MII):*** En este estadio uno de los grupos de cromosomas está condensando y presenta la apariencia descrita para la MI y el otro grupo de cromosomas, correspondiente al primer corpúsculo polar, permanece agrupado (Figura 11) (Xu and Oreve, 1986; Sirard *et al.*, 1986).



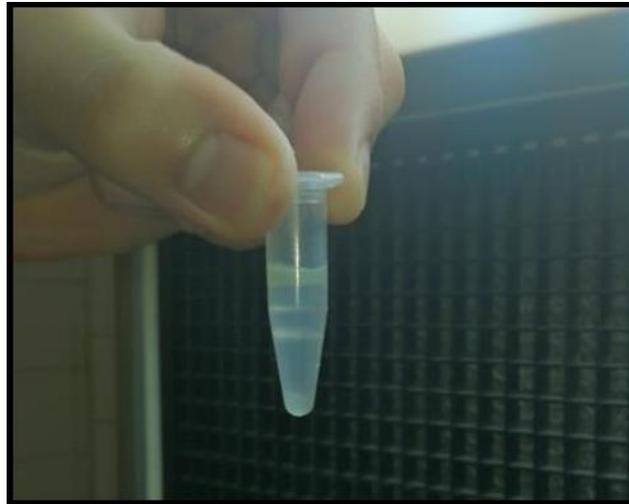
**Figura 11. Ovocito bovino en estado de Metafase II. Se observan los dos grupos de cromatina. Uno condensado (a) y otro correspondiente al corpúsculo polar (b). Tinción con aceto orceína al 2%. 400x.**

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

Los CCOs no seleccionados para la evaluación de la maduración nuclear, fueron llevados para seguir el proceso de fertilización *in vitro*, para este

procedimiento se utilizaron pajuelas de semen congelado de un mismo toro Brahman de fertilidad comprobada. El semen fue sometido a un procedimiento de selección y lavado por gradiente de Percoll. (Matás *et al.*, 2011)

Preparación de las columnas de Percoll y manejo del semen para la FIV: Se prepararon los tres gradientes de Percoll (90, 60 y 30%), en un tubo de microcentrifuga realizando tres columnas, cada una con 300 $\mu$ l con los debidos gradientes, depositando el Percoll 90% en el fondo seguido por el de 60% y finalizando con el de 30% (Figura 12).



**Figura 12. Columnas de Percoll (Gradientes 90, 60 y 30%).**

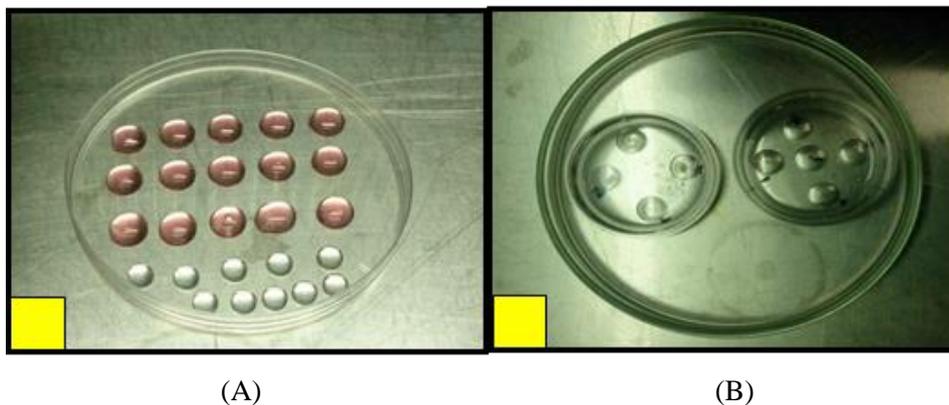
Se descongelaron las pajuelas en baño María a temperatura de 35°C durante 40 segundos, el semen descongelado se depositó en un tubo de microcentrifuga, y de ahí se depositó 100  $\mu$ l de semen en la parte superior de las tres columnas de Percoll, para ser centrifugado durante 3 minutos a 810g (centrifuga minispin, Eppendorf®, Hamburg).

Se tomó del fondo del tubo 100 $\mu$ L de pellet, y se transfirió a un tubo para microcentrifuga con 1mL de medio para lavado de espermatozoides (Talp lavado) y fue sometido a una segunda centrifugación durante 45 segundos a 400g. Posteriormente se realizó el conteo de espermatozoides (Spz) en cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, mediante una dilución en

agua en una proporción de 1/20. Establecida la concentración, se procedió a fertilizar los ovocitos con una concentración de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml

Se utilizó el medio de fertilización SOF-BSA suplementado con 20 $\mu$ L de PHE (D-penicilamina 20 $\mu$ M, hipotaurina 100 $\mu$ M, epinefrina 1 $\mu$ M) y 20 $\mu$ L de heparina (20 mg/mL) por cada 1000 $\mu$ L de solución. El medio de fertilización suplementado fue equilibrado a 38.5°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Se prepararon microgotas de 90 $\mu$ L cubiertas de aceite mineral (Sigma, USA), correspondientes para cada grupo experimental.

Seguidamente se lavaron los ovocitos en gotas de 100 $\mu$ L de medio de lavado y por dos gotas correspondientes al medio de fertilización pre-incubado. Se colocaron 20 ovocitos en cada gota de fertilización (Figura 13), el cultivo de los ovocitos madurados con las células espermáticas se realizó durante 18 a 20 horas a 38.5°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>), (Rizos et al., 2002).



**Figura 13. A, gotas de lavado para FIV; B, gotas de medio de FIV.**

### **Cultivo *In Vitro* (CIV).**

La etapa de cultivo comprendió el periodo de desarrollo de los ovocitos ya fecundados hasta llegar al estado de blastocitos. Pasadas las horas de la fertilización (18-20hs), se retiraron los ovocitos del medio de fertilización y fueron lavados en 3 gotas de medio de lavado (TCM199-HEPES) y pasados por 2 gotas de medio de cultivo pre-incubado, que fue preparado con medio TCM 199, suplementado con

4,4mg/mL de bicarbonato de sodio, 10% de suero fetal bovino (SFB), 100UI/mL de penicilina, 100µl/mL de estreptomina, 100mM de piruvato de sodio, 100µM de cisteamina. Posteriormente fueron transferidos a la placa de cultivo previamente gasificado. Para esta etapa, los embriones fueron colocados en co-cultivo con células del *cúmulus*, en las mismas condiciones atmosféricas relatadas para las fases de maduración y fertilización *in vitro*.

Los presuntos embriones estuvieron en cultivo durante 7 días, haciendo un recambio del 50% del medio de cultivo el día 3 donde se evaluó la tasa de clivaje y el día 5 del cultivo, para así hacer la evaluación de la tasa de blastocisto que se determinó el día 6, 7 y 8 del cultivo.

***Evaluación de la tasa de clivaje y producción de blastocistos.*** Para determinar la tasa de clivaje, a las 48 h de cultivo en cada grupo experimental se contabilizó el porcentaje de estructuras que presentaron divisiones de clivajes con respecto al número de ovocitos colocados en maduración.

A los 8 días de cultivo se determinó la tasa de blastocistos teniendo en cuenta el porcentaje de embriones que alcanzaron el estado de blastocisto con respecto al número de ovocitos que iniciaron el proceso de FIV y de cultivo.

## **Diseño experimental**

**Experimento 1.** Evaluación de la tasa de Recuperación, calidad morfológica y competencia nuclear y citoplasmática de ovocitos recuperados de ovarios provenientes de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC).

En este experimento se evaluó la tasa de recuperación y competencia ovocitaria de los CCOs obtenidos de ovocitos de ovarios de vacas ciclando y vacas no ciclando.

Durante este experimento se realizaron 10 colectas (baterías), en las que se evaluó la cantidad de ovocitos o tasa de recuperación, la competencia ovocitaria

medida por la calidad morfológica de los CCOs obtenidos y la tasa de maduración nuclear, esta última evaluada indirectamente a través de la tasa de clivaje y producción de blastocistos.

**Experimento 2.** Evaluación del efecto de la presencia del cuerpo lúteo, sobre la tasa de recuperación ovocitaria, la calidad morfológica de los ovocitos, la cinética de la maduración nuclear y la tasa de clivaje y producción de blastocistos.

Con el objetivo de evaluar el efecto del cuerpo lúteo (CL), los ovarios de VC fueron individualizados como se describió anteriormente.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el test t para comparar el promedio de ovocitos por ovario entre los grupos experimentales (ovarios de VC y VNC), o se aplicó un modelo Gaussiano de efectos mixtos, donde los efectos fijos corresponden a los grupos experimentales (ovarios CL+, CL- y NCL) y el efecto aleatorio corresponde al efecto de colecta. Las comparaciones múltiples se realizaron con ajuste de Benjamini-Hochberg, al nivel de significancia del 5%.

La evaluación de la maduración nuclear a las 7, 14 y 22 horas, de una muestra de los ovocitos de calidad 1-2, se llevó a cabo utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde la respuesta corresponde al porcentaje de ovocitos que alcanzan cada uno de los estadios de maduración celular (VG, QV, MI, ANAI TELI y MI) por colecta, y los grupos experimentales corresponden a los ovarios (VC o VNC) o a los ovarios (CL+, CL- y NCL). Se realizaron comparaciones múltiples utilizando la prueba de Wilcoxon Mann Whitney. La hipótesis estadística correspondió a que la diferencia en la mediana del porcentaje de estadio de maduración celular era igual a cero, y el nivel de significancia del 5%. La asociación del porcentaje de clivaje y el porcentaje de blastocisto de los ovocitos de calidad 1-2 recuperados en los grupos experimentales ovarios (VC y VNC) u ovarios (CL+, CL- o NCL). Para este experimento las variables respuesta fueron de

tipo discreto con dos opciones (clivaje positivo o negativo, y blastocisto positivo o negativo). Se empleó el modelo generalizado binomial mixto con efectos fijos dados por los grupos experimentales, y con efecto aleatorio dado por la colecta, donde los grupos experimentales fueron (ovarios VC y VNC) o (ovarios CL+, CL- y NCL), y el efecto aleatorio corresponde al efecto de la colecta. Las comparaciones múltiples se llevaron a cabo en la escala exponencial, lo que permitió realizar comparaciones múltiples entre los chances de pares de grupos experimentales. Se probó la hipótesis estadística que la razón de chance entre grupos experimentales era igual a 1, con nivel de significancia del 5%, y ajuste por comparaciones múltiples utilizando el método de Benjamini-Hochberg.

El análisis del porcentaje de blastocisto se llevó a cabo tanto a partir de los ovocitos que iniciaron el proceso de clivaje, como a partir de los ovocitos que alcanzaron a desarrollar clivaje. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software R versión 3.3.1, con los paquetes multcomp, ggplot2, lme4.

## Resultados

### Experimento 1.

#### Análisis de la recuperación, calidad morfológica de los ovocitos y maduración nuclear en ovocitos de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC).

Al evaluar el promedio de ovocitos recuperados por ovario, los resultados mostraron que en los ovarios de VC se recuperaron menos ovocitos por ovario que en los ovarios de VNC ( $16,21 \pm 1.70$  y  $29,62 \pm 5.36$  respectivamente), a lo largo de todas las colectas. Además, se encontró mayor variabilidad en el promedio de ovocitos recuperados en todas las colectas, en los ovarios provenientes de VNC, comparado con los ovarios de VC. El máximo y mínimo número de ovocitos en los ovarios VC fue de 22,1 y 5,5, en las colectas 10 y 2 respectivamente, mientras que en los ovarios VNC, el máximo y mínimo número de ovocitos fue de 55 y 4 ovocitos, en las colectas 3 y 1 respectivamente (Figura 14 y Tabla 1).

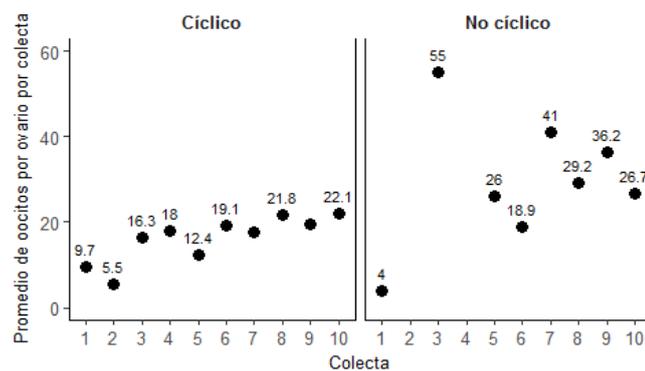


Figura 14. Ovocitos promedio por ovario, por colecta, de ovarios provenientes de VC versus VNC.

**Tabla 1. Promedio de complejos *cúmulus*-ovocitos recuperados de ovarios provenientes de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC).**

Origen	Colectas	Número de ovarios	Total número de ovocitos	Ovocitos por ovario Media ± EE
VC	10	246	3815	16.21 ± 1.70
VNC	8	38	1067	29.62 ± 5.36

EE: Error estándar. 10 colectas, dos grupos experimentales, ovarios provenientes de VC versus VNC.

Para comparar el promedio de ovocitos recuperados por ovario a través de todas las colectas, estratificando por calidad del ovocito, solamente se encontraron diferencias significativas en los promedios de ovocitos recuperados por ovario en los ovocitos de calidad tipo 1 ( $P < 0.05$ ), pero no en los ovocitos de calidad 2, 3 y 4, teniendo mejor recuperación de ovocitos tipo 1, los ovocitos obtenidos de ovarios VNC (Tabla 2).

**Tabla 2. Calidad morfológica de los ovocitos recuperados a partir de ovarios provenientes de vacas cíclicas (VC) y no cíclicas (VNC).**

Calidad ovocitaria	VC	VNC
1	3.54 ± 0.36 <sup>a</sup>	7.79 ± 1.44 <sup>b</sup>
2	4.02 ± 0.47 <sup>a</sup>	8.82 ± 2.13 <sup>a</sup>
3	4.19 ± 0.58 <sup>a</sup>	6.38 ± 1.63 <sup>a</sup>
4	4.46 ± 0.81 <sup>a</sup>	6.62 ± 1.30 <sup>a</sup>

Promedio ± EE de proporción de CCOs distribuidos entre las cuatro categorías de calidad establecidas. Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Ovocitos recuperados de 10 colectas.

## Maduración nuclear en vacas cíclicas (VC) y No cíclicas (VNC).

La evaluación de la maduración nuclear a las 7 h de cultivo no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el porcentaje de maduración entre los grupos experimentales cuando fueron comparados los estados de VG ( $26,5 \pm 5,7$  vs  $36,2 \pm 13,3$ ) y QVG ( $52,7 \pm 2,7$  vs  $58,6 \pm 11,8$ ) (Tabla 3), sin embargo, en esta hora de evaluación fue observada una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de ovocitos en el estado de MI en el grupo VC en comparación al grupo VNC. Al evaluar la maduración nuclear de los ovocitos a las 14 h y a las 22 h de cultivo, no fueron observadas diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos experimentales en ninguno de los estados de la meiosis (VG, QVG, MI, ANA I, TEL I, M II).

**Tabla 3. Promedio del porcentaje de la maduración nuclear de ovocitos (media  $\pm$  error estándar) a las 7, 14 y 22 horas de los grupos experimentales VC y VNC.**

Estado de la meiosis	7 horas		14 horas		22 horas	
	VC	VNC	VC	VNC	VC	VNC
VG	$26,5 \pm 5,7^a$	$36,2 \pm 13,3^a$	$1,3 \pm 0,8^a$	$7,2 \pm 5,8^a$		
QVG	$52,7 \pm 2,7^a$	$58,6 \pm 11,8^a$	$3,9 \pm 1,9^a$	$3,4 \pm 2,1^a$		
MI	$20,6 \pm 4,7^a$	$5,2 \pm 3,4^b$	$68,8 \pm 2,5^a$	$56,2 \pm 9,2^a$	$12,4 \pm 3,2^a$	$14,5 \pm 8,9^a$
ANA I			$13,9 \pm 4,6^a$	$15,7 \pm 4,1^a$	$4,4 \pm 1,8^a$	$3,6 \pm 2,3^a$
TEL I			$11,8 \pm 3,2^a$	$17,4 \pm 3,3^a$	$25,2 \pm 5,9^a$	$20,5 \pm 10,1^a$
MII					$57,9 \pm 3,2^a$	$61,3 \pm 12^a$

Promedios  $\pm$  error estándar, (7 colectas). Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Dos tratamientos VC y VNC, en total se procesaron 498 y 245 ovocitos respectivamente por grupo experimental, para un promedio de 17,69 ovocitos evaluados por colecta, tiempo de maduración y grupo experimental.

## **Análisis del porcentaje del clivaje y desarrollo de blastocisto a partir de ovocitos recuperados de ovarios VC y VNC.**

La hipótesis de razón de chance igual a 1 para el porcentaje de clivaje entre los grupos experimentales de ovarios VC y VNC se rechaza (IC95%: 1,188, 3,11) se concluye que los ovocitos de ovarios VC tuvieron mayor porcentaje de clivaje que los ovocitos de ovarios VNC al nivel de significancia del 5% (Tabla 4).

La hipótesis de razón de chance igual a 1 para el porcentaje de blastocisto a partir de ovocitos fecundados entre los grupos experimentales de ovarios VC y VNC se rechaza (IC 95%: 0.127, 0.367) y se concluye que los ovocitos de ovarios VC tuvieron un menor porcentaje de blastocisto que los ovocitos de ovarios VNC al nivel de significancia del 5% (Tabla 4).

La hipótesis de razón de chances igual a 1 para el porcentaje de blastocisto a partir de los embriones clivados entre los grupos de ovarios VC y VNC se rechaza (IC 95%: 0,179; 0,678), he indica que los embriones de ovarios VC tuvieron menor porcentaje de blastocisto que los embriones de ovarios VNC al nivel de significancia del 5% (Tabla 4).

**Tabla 4. Porcentaje de clivaje y porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos a fecundar y de los embriones clivados, en dos grupos experimentales (VC y VNC).**

	<b>Clivaje (%)</b>	<b>Blastocisto a partir de ovocitos puestos a fecundar (%)</b>	<b>Blastocisto a partir de embriones clivados (%)</b>
VC	$57.9 \pm 3.6^a$	$18.4 \pm 2.5^a$	$33 \pm 5.1^a$
VNC	$48.9 \pm 3.9^b$	$20.1 \pm 3.1^b$	$45 \pm 8.7^b$
Promedio de ovocitos recuperados, porcentaje de clivaje y de blastocisto a partir del número total de ovocitos y a partir de los clivados. (7 colectas). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).			

## Experimento 2.

### Análisis de la recuperación, calidad morfológica y maduración nuclear en los ovocitos provenientes de ovarios CL+, CL- y NCL.

En esta sección se expande el análisis de la recuperación y calidad morfológica de los ovocitos, cuando se emplean tres grupos experimentales, ovocitos de ovarios VC con (CL+) y sin (CL-) cuerpo lúteo, y ovocitos de ovarios VNC (NCL).

La Figura 15 y la Tabla 5 presentan la estadística de los ovarios, ovocitos y el promedio de ovocitos por ovario obtenidos de ovarios CL+, CL- y NCL, y evidencia la uniformidad en la recuperación de ovocitos de colecta a colecta de los ovocitos de ovarios CL+ y CL- comparados con los ovocitos recuperados de ovarios NCL.

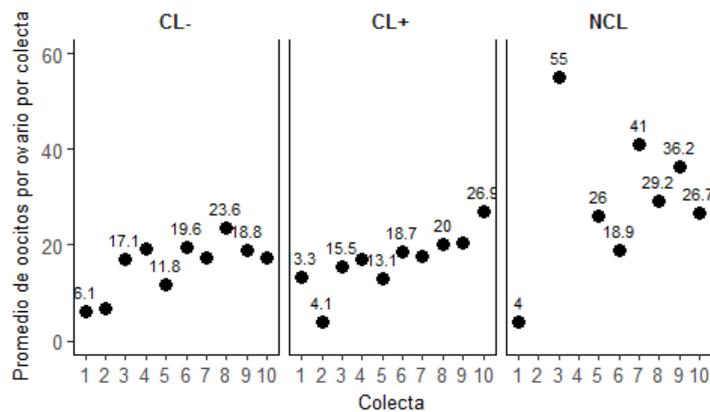


Figura 15. Número de ovarios procesados, ovocitos recuperados, y promedio de ovocitos por ovario, por colecta, grupos experimentales CL-, CL+ y NCL.

**Tabla 5. Promedio de complejos cúmulus-ovocitos recuperados de ovarios provenientes de los grupos experimentales CL-, CL+ y NCL.**

<b>Grupo</b>	<b>Colecta</b>	<b>Número ovarios</b>	<b>Total número de ovocitos</b>	<b>Ovocitos por ovario (Media ± EE)</b>
CL-	10	123	1844	15.76 ± 1,79
CL+	10	123	1971	16.67 ± 1,88
NCL	8	38	1067	29.62 ± 5,36

EE: Error estándar. Estadística descriptiva de los ovarios procesados, los complejos cúmulus-ovocitos recuperados y promedio de ovocitos por ovario (10 colectas), tres grupos experimentales CL-, CL+ y NCL.

Los contrastes de hipótesis revelan que para los ovocitos de calidad 1 y 2, los ovario CL+ presentaron un menor promedio de ovocitos recuperados por ovario que los ovocitos CL- y NCL ( $P < 0.05$ ), mientras que los ovocitos de calidad 3 y 4 no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales CL-, CL+ y NCL (Tabla 6).

**Tabla 6. Calidad morfológica de los ovocitos recuperados a partir de los grupos experimentales ovarios CL-, CL+ y NCL.**

<b>Calidad ovocitaria</b>	<b>CL-</b>	<b>CL+</b>	<b>NCL</b>
1	3.69 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.39 <sup>b</sup>	7.01 ± 1.58 <sup>a</sup>
2	4.33 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.42 <sup>b</sup>	8.82 ± 2.13 <sup>a</sup>
3	3.84 ± 0.85 <sup>a</sup>	4.54 ± 0.85 <sup>a</sup>	6.38 ± 1.63 <sup>a</sup>
4	3.88 ± 0.91 <sup>a</sup>	5.04 ± 0.91 <sup>a</sup>	5.97 ± 1.40 <sup>a</sup>

Promedio ± EE de proporción de CCOs distribuidos entre las cuatro categorías de calidad establecidas. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Ovocitos recuperados de 10 colectas.

## Maduración nuclear, tres grupos experimentales CL-, CL+ y NCL.

Al evaluar la maduración nuclear de los ovocitos a las 7h de cultivo (Tabla 7), no fueron observadas diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos experimentales en ninguno de los estados de la meiosis (VG, QVG, MI). Al evaluar la maduración nuclear de los ovocitos a las 14 h de cultivo (Tabla 7), no fueron observadas diferencias ( $P > 0,05$ ) entre los grupos experimentales en los estados de la meiosis VG, QVG, ANAI. Por otra parte, en el estado de MI se observó un mayor ( $P < 0,05$ ) porcentaje de ovocitos en el grupo CL+ en comparación a NCL ( $73 \pm 5.4$  vs  $56.2 \pm 9.6$  respectivamente). Por su parte en el estado de TELI hubo un mayor ( $P < 0,05$ ) porcentaje de ovocitos pertenecientes al grupo NCL comparándolo con CL+ ( $6.7 \pm 2.7$  vs  $27.8 \pm 7.1$  respectivamente). Con respecto a la evaluación de la maduración nuclear de los ovocitos a las 22 h de cultivo (Tabla 7), no fueron observadas diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes grupos experimentales, en los estados de MI, ANAI, TELI. No obstante, se observó que en el estado de MII el porcentaje de ovocitos pertenecientes al grupo CL- fue mayor ( $P < 0,05$ ) que la presentada en el grupo CL+.

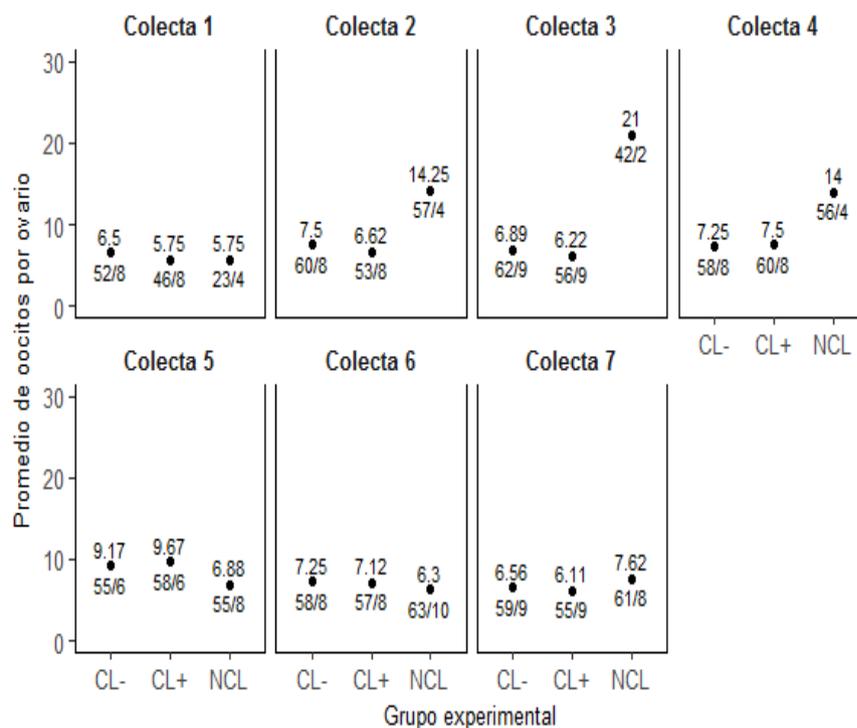
**Tabla 7. Promedio del porcentaje de la maduración nuclear de ovocitos (media  $\pm$  error estándar) a las 7, 14 y 22 horas de los grupos experimentales CL+, CL- y NCL.**

Estado de meiosis	7 horas			14 horas			22 horas		
	CL+	CL-	NCL	CL+	CL-	NCL	CL+	CL-	NCL
VG	40,1 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>	12,9 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>			
QVG	48,9 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	56,5 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	59,1 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>			
MI	10,8 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	30,5 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	9,8 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	73,3 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	64,4 $\pm$ 5,3 <sup>ab</sup>	56,2 $\pm$ 9,6 <sup>b</sup>	18,5 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	14,5 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>
ANA I				13,7 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	14,3 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	16,3 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>
TELI				6,7 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	16,9 $\pm$ 5,6 <sup>ab</sup>	27,8 $\pm$ 7,1 <sup>a</sup>	33,4 $\pm$ 8,5 <sup>a</sup>	17,1 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	20,5 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>
MII							45,6 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	73,2 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	61,3 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>

Promedios  $\pm$  error estándar, (7 colectas). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Tres tratamientos CL-, CL+ y NCL, en total se procesaron 239, 259 y 245 ovocitos respectivamente por grupo experimental, para un promedio de ovocitos 12,3 ovocitos evaluados por colecta, tiempo de maduración y grupo experimental.

## Análisis del porcentaje del clivaje y desarrollo de blastocisto a partir de ovocitos recuperados de ovarios CL+, CL- y NCL.

En esta sección se desarrolla el análisis del porcentaje de clivaje y de blastocisto en ovocitos recuperados de tres tipos de ovarios: ovarios de VC con cuerpo lúteo (CL+) y sin cuerpo lúteo (CL-), y ovarios de VNC (NCL). Recordamos al lector que estos ovocitos corresponden a los mismos ovocitos analizados en la anterior sección, pero en esta sección el interés consiste en determinar el efecto no solo del origen del ovocito (ovario de vaca cíclica y no cíclica) sino del estado del ovario (con o sin cuerpo lúteo) sobre el clivaje y el desarrollo de blastocisto. La Figura 16 muestra la recuperación promedio de ovocitos por ovario cuando se consideran los ovarios CL+ y CL-. En general, se aprecia que el número de ovocitos recuperados por ovario entre CL+ y CL- fue muy similar en todas las colectas, con un promedio máximo de 9.17 y 9.67 para CL- y CL+ en la colecta 6, y un promedio mínimo de 6,5 y 5,75 para CL- y CL+, en la colecta 1.



**Figura 16. Promedio de ovocitos por ovario, por colecta y grupo experimental (CL+, CL-, y NCL).**

Para la hipótesis de razón de chance igual a 1 en el porcentaje de clivaje entre grupos experimentales CL-, CL+ y NCL, se observa que los chances de un porcentaje alto de clivaje son mayores en CL- comparado con CL+ (IC 95%: 1.248; 4.436) y con NCL (IC 95%: 1.445; 5.185), sin embargo, la hipótesis de razón de chance (IC 95%: 0,804; 1,685) indica que el porcentaje de clivaje es igual entre CL+ y NCL (Tabla 8).

Para la hipótesis de razón de chance igual a 1 en el porcentaje de clivaje entre grupos experimentales CL-, CL+ y NCL, se observa que los chances de un porcentaje alto de blastocisto fueron mayores en CL- comparado con CL+ y NCL (Tabla 8).

Para la hipótesis de razón de chance igual a 1 en el porcentaje de blastocisto de los ovocitos fecundados entre grupos experimentales CL-, CL+ y NCL, se observa que los chances de un porcentaje alto de blastocisto fueron menores en CL+ comparado con CL- (IC 95%: 0.180; 0.744) y NCL (IC 95%: 0.145; 0.592) (Tabla 8).

Para la hipótesis de razón de chances igual a 1 en el porcentaje de blastocisto de los embriones clivados entre grupos experimentales CL-, CL+ y NCL, se observa que los chances de un porcentaje alto de blastocisto fueron más bajos en CL- comparado con NCL (IC 95%: 0.177; 0.980) (Tabla 8).

**Tabla 8. Porcentaje de clivaje y porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos a fecundar y de los embriones clivados, en tres grupos experimentales CL+, CL- y NCL.**

	<b>Clivaje (%)</b>	<b>Blastocisto a partir de ovocitos puestos a fecundar (%)</b>	<b>Blastocisto a partir de embriones clivados (%)</b>
<b>CL-</b>	62.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	21 ± 3.28 <sup>a</sup>	35 ± 6.96 <sup>a</sup>
<b>CL+</b>	53.5 ± 3.94 <sup>b</sup>	16 ± 2.79 <sup>b</sup>	30 ± 4.67 <sup>ab</sup>
<b>NCL</b>	48.9 ± 3.88 <sup>b</sup>	20 ± 3.09 <sup>b</sup>	45 ± 8.78 <sup>b</sup>

Promedio de ovocitos recuperados, porcentaje de clivaje y de blastocisto a partir del número total de ovocitos y a partir de los clivados. (7 colectas). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

### Discusión

En este estudio se desarrollaron dos experimentos que tenían como objetivo evaluar la recuperación y competencia ovocitaria, la maduración nuclear, la tasa de clivaje y la tasa de blastocisto en vacas cíclicas y no cíclicas, y cuando se considera la presencia (CL+) o ausencia de cuerpo lúteo (CL-) en vacas cíclicas (VC) comparado con vacas no cíclicas (VNC), en ovarios bovinos de ganado comercial de tipo carne Brahman y sus cruces en un frigorífico de Colombia.

Inicialmente se evaluó si el estatus de funcionalidad reproductiva de las vacas donadoras de ovocitos tendría algún efecto sobre el número de CCOs recuperados. En esta primera evaluación se observó que la tasa de recuperación de CCOs de ovarios provenientes de vacas categorizadas como no cíclicas (grupos experimentales: VNC), fue mayor en comparación a la obtenida de ovarios provenientes de vacas cíclicas (grupos experimentales: VC). La ausencia de CL en las vacas que no están ciclando podría explicar este resultado (Shabankareha *et al.*, 2010). En ovarios que presentan CL la irrigación sanguínea no es uniforme, una vez que la funcionalidad de esta estructura exige un mayor aporte sanguíneo.

Por consiguiente, se ha determinado que en ovarios que no presentan CL el flujo sanguíneo se distribuye más homogéneamente, y por lo tanto el suplemento de gonadotropinas de origen hipofisiario y factores de crecimiento producidos localmente y que son necesarios para el crecimiento folicular aumenta, favoreciendo en consecuencia el incremento en la población folicular (Kaczmarek *et al.*, 2005). También se evaluó la recuperación de ovocitos por ovario por calidad ovocitaria. Se observó que para los ovarios de VC, la recuperación de ovocitos fue más homogénea a través de todas las calidades ovocitarias, mientras que en los ovarios de VNC, hubo mayor variabilidad en todas las calidades ovocitarias, y particularmente en los ovocitos de calidad 2. En general, el promedio de recuperación estuvo entre 3.54 y 4.46 ovocitos por ovario en todas las colectas en la VC, mientras que, en las VNC, el promedio de ovocitos por ovario estuvo entre 6.62 y 7.79 a través de todas las calidades ovocitarias. Existieron diferencias

significativas en el promedio de ovocitos recuperados por ovario solamente en los ovocitos de calidad 1, recuperándose más ovocitos de ovarios VNC que de VC, pero no en los ovocitos de calidad 2, 3 y 4. Esto significa que, a pesar de las diferencias en la muestra, no se esperan diferencias en la recuperación de ovocitos por ovario entre VC y VNC para los ovocitos de calidad 2, 3 y 4 en la población. Resultado que difiere a los descritos por Pirestani *et al.* (2011) quienes no encontraron diferencias en la recuperación de ovocitos según el estatus cíclico en bovinos sin tener en cuenta la calidad y además referenciaron que la presencia del CL no tuvo ningún efecto sobre el número y el tamaño folicular ni sobre la morfología y la capacidad de los ovocitos recuperados para la reanudación de la meiosis después de la maduración *in vitro*. A este respecto, Ries *et al.* (2006), reportaron, que existe una estrecha relación entre la edad y la fase del ciclo estral de las vacas con respecto a la cantidad y calidad de los ovocitos, sugiriendo con los resultados de este trabajo que la actividad ovárica se suma como otro factor que influencia esas variables. Es posible que otros factores, además de la presencia del CL, en las vacas ciclando puedan influenciar el tamaño de la población de folículos. Variaciones en la concentración de esteroides tendrían un efecto directo sobre el desarrollo folicular. La presencia recurrente de un folículo dominante en vacas que presentan una dinámica folicular activa (vacas ciclando) aumenta la concentración de estrógenos circulantes, lo que a su vez produce un feed-back negativo sobre la secreción de FSH por parte del hipotálamo (Senger, 2003). De esta manera, la disminución de las concentraciones de gonadotrofinas necesarias para el reclutamiento y el desarrollo folicular tendría un efecto negativo sobre el tamaño de la población folicular. Esto además explicaría el hecho que la tasa de recuperación de CCOs de ovarios provenientes de vacas no cíclicas (ausencia de dinámica folicular) continuó siendo mayor en el experimento. Esto está en controversia con algunos autores, que expresan, que hay una mejor recuperación y calidad de CCOs en ovarios con presencia y diámetro del CL, influyendo positivamente sobre los ovarios sin CL (Penitente-Filho *et al.*, 2015; Pfeifer *et al.*, 2011), sin embargo, la heterogeneidad de los ovocitos recuperados de folículos en crecimiento sigue siendo un desafío en la maduración *in vitro* y la tasa de embriones, debido a la etapa desconocida del ciclo estral y la calidad de ovocitos

recuperados de ovarios de matadero. En un estudio, estos factores asociados a la heterogeneidad en la capacidad de desarrollo de ovocitos se observó un efecto significativo de la etapa del ciclo estral del estado folicular en la competencia de desarrollo de ovocitos *in vitro* de búfalos, encontrándose más folículos y CCOs en los ovarios sin CL que en los ovarios con CL presente (Manjunatha *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2007, citado por Hajarian *et al.*, 2016).

Una segunda evaluación de la calidad ovocitaria fue realizada con base a la cinética de la maduración nuclear de los ovocitos (competencia nuclear). En esta evaluación se observó que ovocitos originarios de vacas ciclando presentaron una maduración nuclear más avanzada en las primeras etapas de la meiosis, evidenciándose una mayor proporción de ovocitos en estado de metafase I a las 7 horas de evaluación. Vacas que están ciclando, que para el presente estudio fueron seleccionadas con base a la presencia de CL, están bajo influencia de altos niveles de progesterona (P4), por su parte, altas concentraciones de este esteroide han sido asociadas a un mayor número de ondas de crecimiento folicular (Díaz *et al.*, 1998). El recambio folicular constante podría aumentar la oferta de folículos jóvenes conteniendo ovocitos con alta capacidad de desarrollo. De esta manera, ovocitos provenientes de vacas ciclando recuperados de una alta proporción de folículos saludables y en crecimiento, presentan mayor competencia nuclear lo que a su vez se relaciona con un mayor potencial de desarrollo embrionario. Por su parte, cuando la evaluación de la maduración nuclear fue realizada en un periodo intermedio y final del cultivo (14 h y 22 h), no se observaron diferencias entre los estados de la meiosis de ovocitos de ovarios de vacas cíclicas y no cíclicas. Finalmente, los ovocitos fueron sometidos a MIV, FIV y CIV donde se evaluó el porcentaje de clivaje y blastocisto de acuerdo con las VC y VNC. Con respecto al porcentaje de clivaje, se encontró que los ovocitos de ovarios VC tuvieron mayor porcentaje de clivaje entre los grupos experimentales VC y VNC, se evidenció que los embriones producidos a partir ovocitos provenientes de ovarios VC tuvieron mayor porcentaje de clivaje en comparación al grupo de VNC. La prueba de hipótesis reveló que existió mayor posibilidad de clivaje en los ovarios VC que en los de VNC. Cuando se determinó el porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos en fecundación, se

encontró un mayor porcentaje de blastocisto en los ovocitos provenientes de ovarios VNC, que, en los VC, con porcentajes de blastocisto de 10% a 32%.

La prueba de hipótesis demostró que los ovocitos de ovarios VNC tienen más posibilidad de llegar a blastocisto que los ovocitos de ovarios VC, cuando se tiene en cuenta como origen los ovocitos puestos a fecundar. Cuando se evalúa el porcentaje de blastocisto a partir de los embriones que clivaron, las conclusiones son las mismas que para el porcentaje determinado a partir de los ovocitos puestos a fecundar. Como conclusión, cuando se determina el porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos puestos a fecundar o de los embriones clivados, las conclusiones son las mismas, esto es, los ovarios VNC producen significativamente mayor porcentaje de blastocisto que los ovarios VC al nivel de significancia de 5%, no obstante, pudo haber tenido mayor porcentaje de blastocisto, pero no se evaluó la calidad de los embriones, que podría ser un factor importante, ya que revisiones bibliográficas también han indicado que la tasa de clivaje de los embriones que se desarrollan en diferentes condiciones de cultivo probablemente no sea significativamente diferentes, por lo tanto, se puede interpretar que la calidad intrínseca del ovocito es el factor clave para determinar la primera división zigótica (Rizos *et al.*, 2002) (Lonergan *et al.*, 2003). Estos resultados se considerarían un paso a seguir, para tener en cuenta observaciones del estado cíclico del ovario que en el momento de la recolección no comprometa la calidad de los ovocitos en desarrollo y de esta manera se realicen las primeras divisiones embrionarias.

Los ovocitos recuperados por ovario son similares entre los ovarios CL- y CL+, y como ya se había visto, se recuperaron más ovocitos tipo 1-2 de ovarios NCL que de CL- y CL+. La hipótesis de comparación de promedios de recuperación de ovocitos por ovario nos informa que los ovocitos de ovarios CL- y NCL recuperan más ovocitos de calidad 1 y 2, que los ovarios CL+. Entonces, desde el punto de vista práctico, se espera recuperar mayor número de ovocitos de alta calidad de ovarios sin cuerpo lúteo en vacas cíclicas y en ovarios de vacas no cíclicas. Resultados que contrastan con Penitente-Filho *et al.*, 2015 que demostraron que ovarios con CL tenían un mayor número de ovocitos de buena calidad que los ovarios sin CL. Según estos autores, reportan que la influencia del

CL en la tasa de recuperación de ovocitos bovinos y la calidad tiene resultados variables. La presencia de CL puede mejorar la calidad de los ovocitos recuperados debido a la producción de progesterona (Baruselli *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2006). La progesterona permite que el folículo se exponga durante un período más largo a pulsos de LH de baja amplitud, para conseguir una mejor calidad de los ovocitos (Pfeifer *et al.*, 2009, 2011). Por otra parte, el análisis de CL con respecto a su presencia y su diámetro, puede ser una buena herramienta para mejorar la eficiencia en los programas de producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio confirman las observaciones realizadas por Hajarian *et al.*, 2016 que mostraron que los ovocitos de ovarios CL- tienen una mayor competencia de desarrollo en comparación con aquellos colectados a partir ovarios con CL+.

Estos resultados estuvieron en concordancia cuando la comparación fue hecha entre ovocitos de diferente origen ovárico, una vez que no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de maduración nuclear en cada estadio meiótico de los ovocitos de los grupos experimentales CL+, CL- y NCL a las 7 horas de evaluación. Sin embargo, a las 14 horas de evaluación, los ovocitos de ovarios NCL desarrollaron significativamente menor porcentaje de ovocitos en metafase I que los ovocitos de ovarios CL+, mientras que desarrollaron significativamente más porcentaje de ovocitos en telofase I que los ovocitos de ovarios CL+. Fisiológicamente a las 14 horas de maduración nuclear, los ovocitos tienen que estar en metafase I (Gottardi and Mingoti, 2009). Lo observado en el experimento implicó que los ovocitos de ovarios CL+ (ovocitos bajo la influencia de un cuerpo lúteo) alcanzaban su desarrollo fisiológico de maduración normal, sin embargo, los ovocitos de ovarios NCL (ovocitos sin influencia de cuerpo lúteo) tuvieron una maduración más avanzada (telofase I).

Yamamoto *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de la edad materna en la capacidad de desarrollo, progresión de la división meiótica y la actividad cinética asociada al factor promotor de la maduración (MPF) en ovocitos bovinos, encontrando que la progresión de la maduración nuclear parece ser más rápida en ovocitos de las vacas viejas debido a la rápida activación de la actividad de MFP, pero así mismo tiene una rápida disminución de la actividad de MFP después de la

fertilización y conducir a un incremento anormal de la fertilización, por tanto la capacidad de fecundación de los ovocitos de las vacas viejas es baja y la progresión prematura de la división meiótica en estos ovocitos se debe en parte a la comunicación deteriorada de las uniones gap del ovocito y de las células del *cúmulus*.

Entonces, el patrón bimodal de maduración (metafase I y telofase I) observado en los ovocitos NCL podría deberse a la presencia de poblaciones mixtas de ovocitos provenientes de ovarios de hembras anéstricas jóvenes y viejas, donde los ovocitos de ovarios de hembras viejas maduran más rápido, y los ovocitos de hembras jóvenes la tasa de fertilidad fue mejor. En este trabajo no fue considerada la variable edad de las vacas, pero podía explicar este resultado.

A las 22 h de cultivo los resultados mostraron que dentro del mismo grupo de vacas que presentaban actividad ovárica (VC) existieron diferencias en cuanto a la competencia nuclear de ovocitos recuperados de ovarios con (CL+) y sin CL (CL-). Se observó una mayor proporción de ovocitos que alcanzaron la Metafase II en el grupo CL-, en comparación a su contraparte CL+. Una conjugación de factores podría explicar este hecho. Como fue descrito anteriormente, la irrigación en ovarios que presentan CL no es homogénea y de esta forma el aporte de nutrientes y factores que favorecen el crecimiento celular hacia los folículos que lo acompañan podría verse disminuido, afectando de esta manera, además de la población folicular, la calidad de los ovocitos presentes dentro de estos (Kaczmarek *et al.*, 2005). A su vez, existe evidencia que el CL libera algunos factores inhibitorios, como la inhibina, que también pueden afectar el desarrollo folicular y por ende la calidad de los ovocitos (Sangha *et al.*, 2002).

Por otra parte, ovarios sin presencia de CL, pero provenientes de vacas ciclando (con CL) se encuentran bajo influencia de altas concentraciones de P4. Como ya fue mencionado, elevada concentración de este esteroide se asocia a un recambio folicular constante que por su parte podría aumentar la oferta de nuevos folículos antrales conteniendo ovocitos con alta competencia nuclear (Díaz *et al.*, 1998).

Con respecto al porcentaje de clivaje en los tres grupos experimentales, los ovocitos de ovarios CL- tuvieron mayor porcentaje de clivaje que los ovocitos de

ovarios CL+ y NCL. Se demostró que los ovocitos de ovarios CL- tienen mayor posibilidad de un porcentaje de clivaje alto que los ovocitos de ovarios CL+ y NCL, resultados que coinciden con Hajarjian *et al.*, (2016), quienes evaluaron el impacto del cuerpo lúteo en la calidad del ovocito bovino, demostrando que los ovocitos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (CL+), tenían una competencia de desarrollo inferior, en comparación con los ovocitos provenientes de CL-, por consiguiente la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario podría tener efectos negativos sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos ipsilaterales, siendo la calidad de los ovarios un factor importante para aumentar los resultados de la producción in vitro de embriones bovinos.

El porcentaje de blastocisto a partir de los ovocitos fecundados, cuando se consideraron tres grupos experimentales, fue mayor en los ovocitos de los ovarios CL- , sin embargo, se encontró que los ovocitos de ovarios CL+ tuvieron menor posibilidad de llegar a blastocisto que los ovocitos de ovarios CL- y NCL, cuando se evaluaron con respecto a lo ovocitos puestos a fecundar.

El porcentaje de blastocisto a partir de los embriones clivados, cuando se consideran tres grupos experimentales, fue mayor en NCL en cuatro de siete colectas, seguido por CL- en tres de siete colectas.

El proceso de inferencia mostro que los ovocitos de ovarios CL- tuvieron menor posibilidad de llegar a blastocisto que los ovocitos de ovarios NCL al nivel de significancia del 5%. Los resultados obtenidos para clivaje y blastocisto teniendo en cuenta la presencia y ausencia de CL, contrastan con los hallazgos de Nandi *et al.*,(2013), quienes deducen que aunque la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario reduce la tasa de recuperación de los ovocitos de buena calidad, no tienen efecto sobre la tasa de clivaje, ni sobre los rendimientos de mórula y blastocistos en búfalos. De modo similar González *et al.*, (2005), investigaron los efectos de la presencia de CL en embriones producidos in vitro de ovejas a partir de ovarios con CL y sin CL, sin encontrar efectos del CL sobre el número y tamaño folicular o en el número, la morfología y la capacidad de reanudar la meiosis de sus ovocitos, no obstante, los ovocitos de ovejas con CL mostraron mayores tasas de fertilización y un mayor desarrollo a blastocisto. Además, los resultados mostraron que el clivaje fue superior en los ovocitos de ovarios CL- comparados con los ovocitos CL+, lo

cual está en contravía con los resultados reportados por Pirestane *et al.*, (2011), que indicaron que los embriones provenientes de ovarios con un folículo dominante tenían una competencia significativamente menor para alcanzar el estadio de mórula en comparación con los embriones provenientes de ovarios que contenían CL.

Los resultados de esta investigación sugieren que la fuente de ovocitos influye en la tasa de clivaje obtenida después del proceso de fertilización *in vitro*. Por tanto, este efecto podría haber sido mitigado por las condiciones de cultivo utilizados y la tasa de producción final de blastocistos no se vería afectada. Con respecto a esta condición, Pirestani *et al.*, (2011) indica que, independientemente de la condición de cultivo, mientras que la tasa de clivaje es una buena medida de la competencia de desarrollo, la calidad intrínseca del ovocito finalmente determina la competencia de desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Por consiguiente, para dilucidar los posibles efectos del estado del ovario, en la producción *in vitro* de embriones, serían necesarios estudios donde se incluyan como factores la edad, el estado cíclico, estado corporal y fisiológico de los animales.

En consecuencia, a que varios autores no permiten conclusiones definitivas de resultados reportados, sobre el efecto de la presencia de CL en el número y la calidad de los ovocitos recuperados, sobre el desarrollo folicular, recuperación de los ovocitos, así como en la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones, todavía merece atención y requiere más investigación (Penitente-Filho *et al.*, 2014).

## Conclusiones

En este estudio se encontró que la ciclicidad de las vacas está asociada con la tasa de recuperación ovocitaria, por tanto, las VNC se asocian con una mayor tasa de recuperación de CCOs, recuperando mayor número de ovocitos calidad tipo 1, exponiendo diferencias morfológicas entre los CCOs recuperados de VC y VNC.

Con respecto a la maduración nuclear, las VC tuvieron una mayor y más avanzada maduración nuclear, no obstante, los ovocitos recuperados de ovarios con presencia de CL presentaron una baja competencia meiótica.

La tasa de clivaje y la producción de blastocisto, fue más alta en VNC que en VC, demostrando que la ciclicidad puede afectar la competencia de desarrollo ovocitario, afectando el porcentaje de clivaje y el posterior desarrollo embrionario.

Con relación al efecto del cuerpo lúteo sobre la recuperación, la calidad y competencia ovocitaria, este estudio mostro que los ovocitos provenientes de ovarios con CL tuvieron una competencia de desarrollo ovocitaria inferior en comparación con los ovocitos provenientes de ovarios sin CL, permitiendo inferir que al tener en cuenta la presencia del CL en los ovarios podría ser un factor importante para aumentar los resultados de la PIV.

Se recomiendan estudios posteriores realizados en condiciones controladas, en donde se puedan tener en cuenta otras variables como la edad, el peso, estado reproductivo de la hembra, entre otros y de esa manera puedan ser obtenidos resultados que puedan validar los hallazgos de este experimento.

Como posibles líneas futuras de investigación que complementen el análisis del estado de competencia de los ovocitos, se sugieren estudios con el objetivo de analizar los efectos de la ciclicidad sobre la maduración molecular sobre la producción de embriones *in vitro*, así como estudios complementarios, con respecto a la vitrificación o congelamiento de embriones, para de esta manera establecer el efecto de las VC y VNC con respecto a la calidad ovocitaria. También en los procesamientos de ovocitos a partir de la aspiración folicular, se recomienda priorizar la recuperación de ovocitos de ovarios sin cuerpo lúteo de hembras ciclando, ya que tienen mayor posibilidad de un desarrollo embrionario exitoso.

## Bibliografía

Acosta T. J., Miyamoto A. 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82–83, 127–140.

Baruselli P. S., Vieira L. M., Batista E. O. S., Ferreira R. M., Sales J. N. S., Gimenes L. U., Torres-Junior J. L., Martins C. M., Sá Philo M. F., Bó G. A. 2015. Updates on embryo production strategies. *Animal Reproduction*. 12. (3): 375-382.

Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto WP, Grandinetti RR, Bo GA. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology* 55, 157. (abstract).

Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaita, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo H., Mapletoft, R.J., 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53–72.

Bousquet D., Twagiramungu H., Morin N., Brisson C., Carboneau G., Durocher J. 1999. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51, 59-70.

Caccia, M., Bó, G.A., 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol, benzoate and progesterone. In: Shille, V.M. (Ed.), Proceedings Annual Conference of International Embryo Transfer Society. *Theriogenology* 49, 341.

Carrasco R. 2012. Uso de azul brillante de cresilo en la selección de ovocitos bovinos: implicancias en la maduración nuclear y citoplasmática in vitro. Tesis pregrado. Universidad Austral de Chile, Facultad de ciencias veterinarias, Instituto de ciencia animal, Chile, 6-8.

De wit A. A., Wurth Y. A. y Kruip T. A. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journals Animals Science*, 78:1277-1283.

Díaz T., Schmitt E. J. P., De la Sota R. L., Thatcher M. J., Thatcher W.W. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *Journals Animals Science*. 76:1929-1936.

Ferreira RM, Rodrigues CA, Ayres H, Mancilha RF, Franceschini PH, Esper CR, Baruselli PS. 2006. Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Animal Reproduction* 3, 370–375.

Godke R. A., Sansinena M., Youngs C. R. 2014. Assisted Reproductive Technologies and Embryo Culture Methods for Farm Animals. En: *Transgenic Animal Technology (Third Edition), A Laboratory Handbook*. 581-638.

Gonzalez A., Berlinguer F., Cocero, Garcia R., Leoni G., Naitana S., Rosati I., Succu S., Veiga A., 2005. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. *Theriogenology* 64: 1392–1403.

Gottardi F., Mingoti F. 2009. Maturação de oócitos bovinos e influêncian a aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*. 33 (2): 82-94.

Hajarian H., Shahsavari M., Karami-shabankareh H., Dashtizad M. 2016. The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*. 16: 47-52.

Hendriksen P. J., Steenweg W. N., Harkema J. C., Merton J. S., Bevers M. M., Vos P. L. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 61: 909-920.

Islam M, Khandoker M, Afroz S, Rahman M, Khan R. 2007. Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos. *J Zhejiang Univ Sci B*; 8 (7): 465–469.

Kaczmarek M, Schams D, Ziecik A. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview. *Reprod Biol*; 5 (2): 111-136.

Kruip, Dieleman S.J. 1982. Clasificación macroscópica de los folículos de las especies bovina y su validación por procedimientos bioquímicos micromorfológicos y esteroides. *Reprod Nutr Dev*; 22:465-473.

Landínez J., Villamediana P., Hernández H., Soto Belloso E. 2010. Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitosbovinos sobre la progresión meiótica. Venezuela. U. de Zulia. *Redalyc, Revista Científica*, vol. XX, núm. 6: 659-664.

Leifried L, First N. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*; 48:76-83.

Lonergan P., Fair T. 2008. In vitro-produced bovine embryos, Dealing with the warts, *Theriogenology*; 69: 17–22.

Lonergan P. 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76, 1594–1601.

Manjunatha B, Gupta P, Devaraj M, Ravindra J, Nandi S. 2007. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*; 68 (9):1299–304.

Matás C., Vieira L., García-Vázquez F. A., Avilés-López K., López-Úbeda R., Carvajal J.A., Gadea J. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim Reprod Sci.* 127: 62–72.

Mayes M. A. and Sirard M. A. 2001. The Influence Of Cumulus-Oocyte Complex Morphology And Meiotic Inhibitors On The Kinetics Of Nuclear Maturation In Cattle. *Theriogenology*, 55 (4): 911-922

Nandi, M., Chauhan S., Palta P., 2013. Effect of a corpus luteum on the recovery and developmental potential of buffalo oocytes. *Vet Rec.* 147: 580-581

Penitente-Filho J., Jimenez C., Zolini A., Carrascal E., Azevedo J., Silveira C., Oliveira F., Torres C. 2015. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Anim Sci J*, 86: 148-156.

Penitente-Filho J. M., Carrascal E., Oliveira F. A., Zolini A. M., Oliveira C. T., Costa Soares Í. A., Alves T. C.A. 2014. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for In vitro Embryo Production in Cattle. *Br Biotechnol J.* 4 (12): 1305-1312.

Pfeifer L.F.M., Campos H., Miguel Jr J.C., Silveira L.L., Schneider A., Correa M.N., Rumpf R. 2011. Aumento da qualidade de ovócitos recuperados por punção folicular de vacas submetidas previamente à superovulação Increasing of oocytes quality retrieved by ovum pick-up from cows previously superovulated. *Rev. Bras Reprod Anim.* 35 (3): 363-367.

Pirestani A., Hosseini S., Hajian M., Forouzanfar M., Moulavi F., Abedi P., Gourabi H., Shahverdi A., Taqi Dizaj, Nasr Esfahani M., 2011. Effect of Ovarian Cyclic Status on In Vitro Embryo Production in Cattle. *Int J Fertil Steril.* 4 (4): 172-175.

Prentice-Biensch J.R., Singh J., Alfoteisy B., Anzar, M. 2012. A simple and high-throughput method to assess maturation status of bovine oocytes: Comparison of anti-lamin A/C-DAPI with an aceto-orcein staining technique. *Theriogenology* 78: 1633–1638.

Ramos A. F, Rumpf R., Câmara J. U., Mollo M. R., Pivato I., Marques A. P. 2010. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. *Anim Reprod Sci.* 117:201-207.

Reis A., Metelo R., Santos P., Moreira Da Silva F. 2006. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. *Anim Sci.* 43 (5): 629-636.

Rizos D., Ward, F., Duffy P., Boland M.P. y Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2): 234-248.

Sangha GK, Sharma RK, Guraya SS. 2002. Biology of corpus luteum in small ruminant. *Small Rumin. Res;* 43: 53–64.

Senger PL. 2003. *Pathways to pregnancy and parturition.* Washington State University. 147-150.

Sirard MA, Florman ML, Lebfried PL, Barnes ML, Sims y Pirst NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod;* 40: 1257-1263.

Shabankareha H, Habibizadb J, Sarsaifia K, Cheghamirzac K, Kazemine V. 2010. The effect of the absence or presence of a corpus luteum on the ovarian follicular population and serum o estradiol concentrations during the estrous cycle in Sanjabi ewes. *Small Ruminant Research;* 93: 180–185.

Shabankareh H. K., Kor N. M., Hajarian H. 2013. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 140, 109– 114.

Tan S. J., Lu K. H. 1990. Efecto de las diferentes etapas de estro de los ovarios y el tamaño de los folículos en la generación de embriones bovinos in vitro. *Theriogenology*; 33:335.

Wurth Y. A, Boni R., Hulshof S. C. J., Kruip T. A. M. 1994. Bovine embryo production in vitro after selection of ovaries, follicles and oocytes. In: Bovine Embryo Production In Vitro: Influencing factors. Utrecht University Press. 1994; pp 67-85.

Xu KP, Oreve T. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet.Scand.*, 27: 505-519.

Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y y Kuwayama T. 2010. Effect of Maternal Age on the Developmental Competence and Progression of Nuclear Maturation in Bovine Oocytes. *Molecular Reproduction & Development*; 77: 595–604.