

Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero

Embryonic development capacity of bovine oocytes aspired by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries

Carlos Quispe E.^{1,4}, Edith Ancco G.¹, Juan Solano A.², Ide Unchupaico P.³, Edwin Mellisho S.¹

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos recuperados de ovarios de matadero y recuperados *in vivo* mediante ultrasonografía guiada (*ovum pick-up*, OPU) en un sistema de producción *in vitro*. Se realizaron nueve sesiones de colecta en 59 vacas Holstein para la obtención de ovocitos mediante OPU y se colectaron 408 ovarios de 204 vacas de matadero. Para la maduración *in vitro* de ovocitos solo se utilizaron aquellos de grado 1 y 2 mediante medios MIV, FIV y CIV® hasta el día 7. Se evaluó la tasa de recuperación de ovocitos, ovocitos grado 1 y 2 y el porcentaje de embriones (blastocitos) producidos *in vitro* al día 7. La tasa de recuperación de ovocitos fue mayor cuando se colectaron de ovarios de matadero comparado con ovocitos colectados por OPU (10.0 vs. 7.2 ovocitos por sesión/vaca; $p < 0.05$). Hubo una mayor cantidad de ovocitos viables de grado 1 y 2 cuando la colecta fue de ovarios de matadero (7.6 vs. 3.4 ovocitos por sesión/vaca; $p < 0.05$). La tasa de blastocitos fue de 30.5 y 20.8% con ovocitos de ovarios de matadero y por OPU, respectivamente ($p < 0.05$). Se obtuvo una mayor capacidad de desarrollo de ovocitos recuperados de ovarios de matadero que de aquellos recuperados por *ovum pick-up*.

Palabras clave: ovocitos; blastocitos; desarrollo embrionario; ovum pick-up

¹ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

² Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Los Andes, Junín, Perú

³ Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional del Centro del Perú, Junín, Perú

⁴ E-mail: cquispe.vet@gmail.com

Recibido: 16 de marzo de 2018

Aceptado para publicación: 5 de septiembre de 2018

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the capacity of embryonic development of oocytes recovered from slaughterhouse ovaries and recovered *in vivo* by guided ultrasound (ovum pick-up – OPU) in an *in vitro* production system. Nine sessions in 59 Holstein cows were done to obtain oocytes through OPU and 408 ovaries were collected from 204 cows in the slaughterhouse. For the *in vitro* maturation of oocytes, only those of grade 1 and 2 were used, matured and fertilized using MIV, FIV and CIV® medium until day 7. The recovery rate of oocytes, grade 1 and 2 oocytes and the percentage of embryos (blastocysts) produced *in vitro* on day 7 were evaluated. The recovery rate of oocytes collected from slaughterhouse ovaries was higher as compared with oocytes collected by OPU (10.0 vs. 7.2 oocytes per session/cow, $p < 0.05$). There was a greater number of viable oocytes of grade 1 and 2 when the collection was from slaughterhouse ovaries (7.6 vs. 3.4 oocytes per session/cow, $p < 0.05$). The blastocyst rate was 30.5 and 20.8% with slaughterhouse ovarian oocytes and OPU, respectively ($p < 0.05$). A greater capacity to develop oocytes retrieved from slaughterhouse ovaries was obtained than those recovered by ovum pick-up.

Key words: oocytes; blastocysts; embryonic development; ovum pick up

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología desarrollada para obtener crías de animales de producción de alto valor genético (Palmer *et al.*, 1991). La técnica en su conjunto implica la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* de ovocitos madurados (FIV) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fertilizados (CIV) hasta el estado de blastocisto en el día 7 en el caso del bovino. La aplicación de la fecundación *in vitro* se puede realizar en vacas vacías, vacas gestantes, vaquillas e incluso en donantes con problemas de fertilidad o que la función reproductiva se encuentra mermada frente a los tratamientos de superovulación y de sincronización de celo (Anchordoquy *et al.*, 2013). Los ovocitos pueden ser obtenidos a partir de ovarios de vacas beneficiadas y donantes vivos, así como de hembras con diversos antecedentes de ciclos reproductivos (Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002). Para la recuperación de ovocitos de animales vivos generalmente se utiliza la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía

(OPU), que permite incrementar el número de crías de donantes genéticamente valiosas (Galli *et al.*, 2001).

La condición fisiológica del animal indica que solamente el 0.1% de los folículos alcanzan la ovulación (Gosden y Telfer, 1987). Silva-Santos *et al.* (2011) mencionan que la población de folículos pre-antrales varía entre 89 000 y 109 000 en la transición de vaquilla a vaca, número que se reduce a 3000 folículos en vacas con más de 10 años (Erickson, 1996). La recuperación de ovarios de matadero como fuente de germoplasma con fines de fecundación *in vitro* permite obtener crías viables, aun cuando la donante ha sido beneficiada. Por otro lado, la punción de los folículos ováricos con la técnica de OPU (*Ovum Pick-up*) fue descrita por Pieterse *et al.* (1988) y es una técnica que permite incrementar los parámetros reproductivos con la producción eficiente de embriones *in vitro*. En ambos procedimientos es necesario conocer el potencial de recuperación de ovocitos y si estos adquieren una capacidad de desarrollo dentro de ciertos estándares bajo un sistema *in vitro*, ini-

ciado con la evaluación del complejo ovocito-cumulus (COCs).

La calidad de los ovocitos se define como la capacidad para producir un blastocisto dentro de un sistema de producción *in vitro* (Merton *et al.*, 2003). Trabajos de investigación sugieren que la calidad propia de los ovocitos es el factor determinante para la capacidad de desarrollo al estadio de blastocisto (Lonergan *et al.*, 2003), y este se relaciona con el estado fisiológico y reproductivo de los donantes, el tamaño del folículo, la extensión y la integridad de las células del cumulus (Lonergan *et al.*, 1994; Liebfried-Rutledge, 1996).

Algunos reportes indican que los ovocitos recuperados de matadero son de mejor calidad y mayor cantidad en comparación a los recuperados por OPU (Critser *et al.*, 1986; Mullaart *et al.*, 1999), lo cual podría afectar la producción *in vitro* de embriones (Merton *et al.*, 2003). El objetivo de esta investigación fue comparar la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos recuperados de ovarios de matadero y por OPU en un sistema de producción de embriones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en la Unidad Experimental de Zootecnia y en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú) entre los meses de mayo y junio. La colección de ovocitos guiada por ultrasonografía fue realizada en 59 vacas Holstein divididas en nueve sesiones de colecta. Así mismo, se colectaron los ovarios de 204 vacas en el matadero. La diferencia entre los grupos fue estimada mediante una prueba de Chi cuadrado a un nivel de significancia de 0.05. El paquete estadístico que se utilizó fue el SAS v. 9.0 y SPSS v. 15.0.

Obtención del Complejo Ovocito-Cumulus (COCs)

Aspiración de ovocitos de ovarios de matadero

Los ovarios se obtuvieron de un matadero local y se transportaron al laboratorio en solución isotónica temperada a 36 °C dentro de las tres horas del beneficio. Se utilizaron vacas de razas lecheras. Se aspiraron folículos de 2 a 8 mm de diámetro utilizando agujas N.º 18 y jeringa de 3 ml. El aspirado folicular fue vertido del tubo de colecta a una placa Petri temperada a 36 °C en platina caliente. El medio utilizado para el conteo y clasificación de los ovocitos fue PBS (tampón fosfato salino) + 1% SFB (suero fetal bovino). Los ovocitos fueron contados en un estereoscopio Boeco® BS-80 y clasificados en cuatro grados de acuerdo a la apariencia de las células del cumulus que rodean el citoplasma (Liebfried y First, 1979; Sato *et al.*, 1990) donde Grado 1: ovocitos completamente rodeados con más de tres capas de células del cumulus y citoplasma uniformemente granulada; Grado 2: ovocitos de una a tres capas de células y con citoplasma uniformemente granulada; Grado 3: ovocitos parcialmente desnudos con citoplasma desigual granulada; Grado 4: ovocitos completamente desnudos, degenerados. Solo los ovocitos de grado 1 y 2 dos fueron sometidos a MIV, mientras que los grados 3 y 4 fueron descartados.

Aspiración de ovocitos por Ovum Pick up (OPU)

Se realizó en vacas sin estimulación hormonal en nueve sesiones. Las 59 donantes estuvieron en estado sanitario óptimo y con edades entre 4 y 6 años. El día 1 se realizó una ecografía de inspección ovárica haciendo la ablación folicular manual en casos de hallarse folículos dominantes. El día 4 se realizó la OPU de acuerdo con el procedimiento descrito por Pieterse *et al.* (1988) y

Getz (2004), aplicando anestesia epidural (4 ml de lidocaína 2%) antes de la aspiración transvaginal de ovocitos. La aspiración folicular duró aproximadamente 10 minutos por cada vaca. La temperatura ambiental promedio fue de 20 °C.

Se utilizó un ecógrafo Mindray y transductor transvaginal de 7.5 MHz. Se utilizó una aguja de punción 21G, que se adjunta a la guía de aspiración folicular (WTA®, Brasil) a través de la vagina. Todos los folículos visibles (>2 mm) se perforaron y los contenidos fueron recogidos en un tubo estéril de 50 ml (Falcon™) temperado a 36 °C con medio de aspiración (PBS suplementado con heparina 0.02 mg/ml + 1% SFB) unidos a una bomba de vacío para asegurar una presión de aspiración constante de 40 mm de Hg (MHZ). El fluido folicular obtenido se llevó al laboratorio en el tiempo más breve posible. Los ovocitos recuperados fueron observados en un microscopio estereoscópico, se contaron y se clasificaron morfológicamente en cuatro categorías como se indicó anteriormente.

Producción de Embriones *in vitro*

Maduración in vitro (MIV)

Los ovocitos seleccionados fueron colocados individualmente en placas Petri, se lavaron 2-3 veces en medio H-199 (Hepes). Luego los ovocitos se lavaron 2-3 veces en gotas de 100 µl en placas Petri con medio MIV (Vitrogen, Brasil) y se transfirieron a placas Petri de 35 x 10 mm, con gotas de maduración de 70 µl cubiertas con aceite mineral, previamente equilibrado en la incubadora. Las placas Petri fueron preparadas con las gotas de maduración de 70 µl y 10 ovocitos por gota, y se colocaron en la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% humedad por 22-24 h.

Fecundación in vitro (FIV)

Previa a la fecundación, los ovocitos fueron lavados en medio de fertilización FIV (Vitrogen, Brasil) 2-3 veces y se dejaron en

gotas con medio de fertilización en la incubadora (38.5 °C y 5% CO₂).

Se utilizó semen nacional de un toro Holstein. Las pajillas de semen fueron descongeladas a 37 °C por 15 s y la motilidad fue evaluada con ayuda del equipo *Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)* – ISASv1® con microscopio de contraste de fase UB203i. Luego se realizó la capacitación y selección espermática en gradientes de densidad (Percoll), colocándose 500 µl de Percoll 45 en el gradiente superior (rosado) y 500 µl de Percoll 90 en el gradiente inferior (transparente) y 200 µl de semen. Se llevó a una primera centrifugación a 500 g por 15 min, se eliminó el sobrenadante, y luego se diluyó con 500 µl de medio de fertilización (FIV). Se volvió a centrifugar a 500 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se determinó la concentración espermática y se colocaron 10 000 espermatozoides motiles por ovocito, consistiendo en 4-5 µl de semen por cada gota de 70 µl de medio FIV. Por último, se llevó a incubar por 18 h a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% humedad.

Cultivo in vitro (CIV)

Culminada la etapa de fecundación, se removió el cumulus de los ovocitos hasta casi desnudarlos por completo. Se lavaron en medio de cultivo CIV (Vitrogen, Brasil), se colocaron en gotas de 70 µl con 10 ovocitos por gota en placas Petri cubiertas con aceite mineral y se llevaron a la incubadora 38.5 °C con 5% CO₂ y 90% de humedad. A las 48 h se realizó la primera renovación del 50% de medio CIV y se procedió a la evaluación de división celular. Luego se retiró el restante de las células del cumulus. En el día 5 se realizó la segunda renovación del 50% del medio CIV. El día 7 se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto. La evaluación de los embriones se realizó bajo un microscopio estereoscópico utilizando los criterios morfológicos de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (Wright, 1998).

Cuadro 1. Efecto del origen de la colecta de ovocitos sobre la capacidad de desarrollo embrionario

Fuente de ovocitos	Animales (n)	Ovocitos recuperados (n)	COC viables (n) ¹	Blastocistos (día 7) (n)	
				n	%
Vacas donadoras	59	7.0 ± 2.1 ^b	3.4 ± 1.5 ^b	66	20.8 ± 20.7 ^b
Ovarios de matadero	204	10.0 ± 2.1 ^a	7.6 ± 2.7 ^a	374	30.5 ± 10.0 ^a

Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

¹ Ovocitos grado 1 y 2

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 2049 ovocitos en 18 repeticiones de colecta provenientes de 408 ovarios de 204 vacas beneficiadas (10.0 ovocitos por hembra). En el caso de la aspiración de ovocitos por *ovum pick-up*, se colectaron 414 ovocitos de 59 vacas en 9 sesiones (7.1 ovocitos por vaca), siendo estadísticamente superior el número de ovocitos colectados por vaca en el matadero ($p < 0.05$). Así mismo, hubo una mayor cantidad de ovocitos viables de grado 1 y 2 cuando la colecta fue de ovarios de matadero que por OPU (7.6 vs. 3.4 ovocitos por vaca, respectivamente). La tasa de blastocistos al día 7 fue 30.5 y 20.8% provenientes de ovarios de matadero y por OPU, respectivamente ($p < 0.05$). Los datos se presentan en el Cuadro 1.

DISCUSIÓN

La cantidad de ovocitos recolectados por aspiración transvaginal de 7.1 por vaca/sesión fue ligeramente superior a lo encontrado por Karadjole *et al.* (2010) y Getz (2004). Diversos factores pueden influenciar el número de ovocitos recolectados, tales como los tratamientos hormonales, el número

de aguja de punción, la frecuencia de la aspiración, la presión de vacío, la resolución del equipo utilizado, el tamaño de los folículos y la raza (Merton *et al.*, 2003; Quispe *et al.*, 2015). Bajo este contexto es que solo se recolectaron ovocitos por OPU cuyos folículos eran iguales o mayores de 2 mm. Folículos menores a 2 mm son difíciles de ver en el ecógrafo (Quispe *et al.*, 2014). Por el contrario, folículos de 1 mm pueden ser visibles en los ovarios de matadero, lo que contribuye a la mayor cantidad de folículos perforados (Getz *et al.*, 2004; Karadjole *et al.*, 2007; Merton *et al.*, 2003). Además, el número promedio de ovocitos colectados por OPU en ganado *Bos taurus* es menor a ocho por donante (Senatore *et al.*, 2010).

Se reconoce un mayor porcentaje de embriones producidos de ovocitos colectados de ovarios de matadero debido a que estos están exentos de factores que limitan su calidad como la presión de vacío y el diámetro de la aguja utilizados durante la aspiración (Hashimoto *et al.*, 1999). Los COCs están menos adheridos a los folículos en ovarios de matadero debido al efecto *post mortem*, de allí que tienen cúmulos más completos (Mullaart *et al.*, 1999; Karadjole *et al.*, 2010). Los laboratorios de FIV procuran madurar la mayor cantidad de ovocitos procedentes de una aspiración *in vivo* a fin de aprovechar al

máximo la producción de embriones, y en muchos casos ovocitos de grado 3 logran alcanzar el estado de blastocistos con cierta calidad (Watanabe, 2001). Esto puede contribuir a mejores rendimientos de blastocistos obtenidos de ovocitos derivados de mataderos.

Los resultados del presente estudio muestran 3.4 ovocitos viables de grado 1 y 2 cuando la colecta es realizada por OPU, inferior a lo reportado por Anchordoquy *et al.* (2013) con un promedio de 4.3 ovocitos viables en *Bos taurus*. Así mismo, la tasa de blastocistos de ovocitos derivados de OPU fue menor que la de los ovocitos aspirados de ovarios de matadero. No obstante, Karadjole *et al.* (2010) reportan una mayor tasa de embriones producidos con ovocitos derivados de OPU que con ovocitos de matadero. Por otro lado, el tamaño de los folículos puede explicar las diferencias en la tasa de blastocistos debido a que la mayoría de los ovocitos recogidos de ovarios de matadero en el presente estudio se obtuvo de folículos entre 1 y 4 mm (Blondin y Sirard, 1995; Karadjole, 2009).

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que los ovocitos recuperados de ovarios de bovinos de matadero tienen mayor capacidad de desarrollo que los colectados *in vivo* mediante la técnica aspiración guiada por ultrasonografía (*ovum pick-up*) para alcanzar el estado de blastocisto.

LITERATURA CITADA

1. **Anchordoquy JP, Huter S, Farnetano N, Iroulegu Y, Martin E, Arzeno M, Mijica I, et al. 2013.** Producción de embriones por fecundación *in vitro* de donantes problema de razas taurinas. *Spermova* 3: 126-129.
2. **Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002.** Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 71: 143-155. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00188-9
3. **Blondin P, Sirard MA. 1995.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 41: 54-62. doi: 10.1002/mrd.1080410109
4. **Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL, First NL. 1986.** Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25: 150. doi: 10.1016/0093-691X(86)90204-9
5. **Erickson BH. 1996.** Development and senescence of the bovine ovary. *J Anim Sci* 25: 800-805.
6. **Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00486-1
7. **Getz I. 2004.** The efficacy of ovarian stimulation in donor cows on the results of ovum pick up and *in vitro* embryo production. PhD Thesis. Croatia: University of Zagreb.
8. **Gosden RG, Telfer E. 1987.** Numbers of follicles in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J Zool* 211: 169-175. doi: 10.1111/j.1469-7998.1987.tb07460.x
9. **Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. 1999.** Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51: 757-765. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00024-2
10. **Karadjole M. 2009.** The effect of follicle size on oocyte quality and embryo development after *in vitro* fertilization PhD Thesis. Croatia: University of Zagreb.

11. **Karadjole M, Getz I, Samardžija M, Matkoviæ M, Makek Z, Karadjole T, Baèiæ G, et al. 2007.** The effect of origin of the immature oocytes on *in vitro* developmental competence of bovine embryos. Proc 23th Annual Meeting of European Embryo Transfer Association. Alghero, Italy.
12. **Karadjole M, Getz I, Samardžija M, Maæešiæ N, Matkoviæ M, Makek Z, Karadjole T, et al. 2010.** The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. Vet Arhiv 80: 445-454.
13. **Liebfried L, First NL. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J Anim Sci 48: 76-86. doi: 10.2527/jas1979.48176x
14. **Liebfried-Rutledge ML. 1996.** Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology 51: 473-485. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00241-6
15. **Lonergan P, Rizos D, Fair T, Boland MP. 2003.** *In vitro* production of bovine embryos: factors affecting blastocyst yield and quality. Proc IV Middle-European Buiatric Congress. Lovran, Croatia.
16. **Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994.** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. Mol Reprod Dev 37: 48-53. doi: 10.1002/mrd.1080370107
17. **Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 59: 651-674. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01246-3
18. **Mullaart E, Verbrugge A, Aerts B, Merton JS. 1999.** Optimization of OPU procedure. Proc XV Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Lyon, France.
19. **Palmer EL, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. 1991.** *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. J Rep Fertil 44: 375-384.
20. **Pieterse MC, Kappen KA, Kruip M, Taverne M. 1988.** Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. Theriogenology 30: 751-762. doi: 10.1016/0093-691X(88)-90310-X
21. **Quispe C, Mercado J, Fernández E, Mixan E, Gamarra S, Mellisho E. 2014.** Efecto de tratamientos con benzoato de estradiol o GNRH sobre la dinámica folicular para aspiración de folículos (ovum pick up) guiada por ultrasonido en vacas lecheras. Spermova 4: 86-88.
22. **Quispe C, Fernández E, Ancco E, Oriundo K, Mellisho E. 2015.** Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. Spermova 5: 59-62. doi: 10.18548/aspect/0002.13
23. **Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. 1990.** Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. J Anim Sci 68: 1182-1187. doi: 10.2527/1990.6841182x
24. **Senatore EM, Xu J, Suárez MV, Gong G, Lin T, Bella A, Moreno JF, et al. 2010.** Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. Theriogenology 74: 1643-1651. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.037
25. **Silva-Santos K, Seneda M. 2011.** Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. Anim Reprod 8: 58-67.

26. **Watanabe R. 2001.** Aspiração *in vivo* de oócitos em fêmeas Nelore de diferentes idades reprodutivas mediante punção transvaginal guiada por ultrassom. Tese de Mestrado. Sao Paulo: Universidade Estadual Paulista. 52 p.
27. **Wright JM. 1998.** Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd Illinois, USA: IETS. p 167-170.