

## EFFECTO DEL ESTATUS REPRODUCTIVO DE VACAS MESTIZAS CEBÚ SOBRE LA PRODUCCIÓN *In Vitro* DE EMBRIONES

### *Effect of the Reproductive Status of Crossbred Zebu Cows on In Vitro Embryo Production*

Adriana Fernández<sup>\*1</sup>, Pedro Cabrera<sup>\*</sup>, Thaís Díaz<sup>\*</sup>, Ana Ruíz<sup>\*\*</sup> y Gonzalo Martínez<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Instituto de Reproducción Animal, <sup>\*\*</sup>Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias,

<sup>\*\*\*</sup>Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.  
Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela

**Correo-E: [adrianafernandez@hotmail.com](mailto:adrianafernandez@hotmail.com)**

Recibido: 16/10/12 - Aprobado: 30/01/13

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del estatus reproductivo (gestantes *versus* vacías) de hembras mestizas Cebú *postmortem* sobre el número de ovocitos recuperados, la tasa de división embrionaria y la tasa de producción de blastocitos. Los complejos cúmulo ovocito (CCO) recolectados a través del tasajeo de los ovarios, fueron seleccionados, contados y separados por grupo en: hembras gestantes (ovarios con o sin cuerpo lúteo [CL]) y hembras vacías (ovarios con o sin CL). El número de CCO recuperados fue analizado utilizando el procedimiento GENMOD, asumiendo una distribución de Poisson, mientras que los datos de división y producción de blastocitos fueron analizados utilizando una regresión logística asumiendo una distribución binomial. Se evaluó un total de 4658 CCO obtenidos de 437 ovarios, siendo significativamente mayor ( $p < 0,03$ ), el número de CCO obtenidos de ovarios procedentes de vacas gestantes ( $12,5 \pm 2,8$ ), comparado con el número de CCO provenientes de ovarios de hembras vacías ( $9,4 \pm 2,5$ ). La tasa de división embrionaria, fue significativamente mayor ( $p < 0,006$ ) para el grupo de hembras vacías ( $42,3 \pm 0,01\%$ ) con respecto a las gestantes ( $34,5 \pm 0,02$ ); asimismo, la interacción estatus reproductivo por CL afectó ( $p < 0,006$ ) la tasa de división embrionaria: vacas

#### ABSTRACT

In order to improve the oocyte selection for in vitro embryo production, the present work evaluated the effect of the reproductive status of postmortem Crossbred Zebu cows (pregnant [P] versus non-pregnant [NP]) on the number of recovered oocytes, the cleavage (number of cleaved embryos/number of recovered oocytes) and the blastocyst production (number of blastocyst/number of cleaved embryos) rates. Cumulus oocytes complexes (CCOs) were selected, counted and separated depending on the donor status: P cows with or without a corpus luteum (CL) and NP cows with (CL) or without (NoCL) a CL. Data for number of recovered oocytes was analyzed using the GENMOD procedure assuming a Poisson distribution, whereas data for cleavage and blastocyst production rates were analyzed using a logistic regression assuming a binomial distribution. The statistical model for all the analyses included the effects of the reproductive status (P *vs.* NP), presence or not of a CL (CL *vs.* NoCL) and the interaction of reproductive status x CL. A total of 4658 CCOs obtained from 437 ovaries was evaluated. The number of CCOs collected per ovary from P cows ( $12.5 \pm 2.8$ ) was significantly higher ( $p < 0.03$ ) than from NP cows ( $9.4 \pm 2.5$ ). On the other hand, the cleavage rate was significantly higher

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

gestantes con CL (Gest-CL) y vacas gestantes sin CL (Gest-NoCL;  $31,1 \pm 0,02\%$  [76/244] *vs.*  $38,0 \pm 0,03\%$  [98/258], respectivamente) y vacas vacías con CL (Va-CL) y vacas vacías sin CL (Va-NoCL;  $46,7 \pm 0,03\%$  [312/738] *vs.*  $38,0 \pm 0,03\%$  [143/376], respectivamente). No hubo diferencia significativa en la tasa de producción de blastocitos a partir de embriones divididos de hembras gestantes ( $10,7 \pm 0,02\%$ ; 17/160) comparado con el grupo de hembras vacías ( $10,0 \pm 0,02\%$ ; 30/312). Estos resultados indican que la selección de los CCO, con base en el estatus reproductivo de la hembra bovina, es un aspecto importante a tomar en cuenta para mejorar la producción de embriones *in vitro*.

**(Palabras clave:** Estatus reproductivo, vaca, cebú, producción de embriones *in vitro*, óvulo)

## INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una valiosa herramienta para la obtención de animales de alto valor genético. La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido, *ovum pick up* (OPU, por sus siglas en Inglés, ), no requiere que la hembra bovina presente un ciclo reproductivo normal y siendo utilizada en conjunto con la PIV, incrementa considerablemente la posibilidad de acortar el intervalo generacional e incrementar la ganancia genética, por la posibilidad de producir mayor número de descendencia por año, que la obtenida por métodos reproductivos convencionales (Ward *et al.*, 2000).

Recientemente, un gran número de embriones bovinos producidos *in vitro* son obtenidos tanto con fines de investigación como comercialmente. Dichos embriones son producidos a partir de ovocitos obtenidos de hembras de matadero o de ovocitos recolectados de hembras vivas, a través de OPU; este procedimiento es eficiente para la producción de blastocitos de hembras genéticamente superiores; sin embargo, el número de ovocitos recuperados es limitado y su habilidad para desarrollarse y madurar en condiciones *in vitro* es errática.

Existen diferencias en la fuente de los ovarios utilizados para la PIV (estatus reproductivo de la donadora, raza, edad, etc.) y también en el procedimiento de recolección de los ovocitos, selección

( $p < 0.006$ ) in NoP cows ( $42.3 \pm 0.01\%$ ) than in P cows ( $34.5 \pm 0.02$ ). Nevertheless, the interaction between reproductive status and CL affected ( $p < 0.006$ ) the cleavage rate: P-CL:  $31.1 \pm 0.02\%$  (76/244); P-NoCL:  $38.0 \pm 0.03\%$  (98/258); NoP-CL:  $46.7 \pm 0.03\%$  (312/738) and NoP-NoCL:  $38.0 \pm 0.03\%$  (143/376). There were not differences in blastocyst production rate from cleaved embryos for P cows ( $10.7 \pm 0.02\%$ ; 17/160) compared with NoP cows ( $10.0 \pm 0.02\%$ ; 30/312). These results show that the reproductive status of a cow should be taken into account for oocyte selection, in order to improve embryo production.

**(Key words:** Reproductive status, cattle, zebu, *in vitro* embryo production, oocytes)

de los mismos y de los embriones, así como el semen del toro utilizado. Solamente entre 30-40% de los ovocitos bovinos se desarrolla a la etapa de blastocito después de la maduración, fertilización y cultivo de embriones *in vitro* (Merton *et al.*, 2003).

Con la finalidad de mejorar la eficiencia en la producción de embriones bovinos *in vitro* es necesario recuperar gran número de ovocitos que tengan la capacidad para continuar su desarrollo y maduración. Por tal motivo, se hace imperiosa la necesidad de entender la relación existente entre la competencia de desarrollo del ovocito y el estatus reproductivo de la hembra donadora.

La calidad intrínseca del ovocito es la clave que determina su habilidad para desarrollarse hasta la etapa de blastocito. Durante este desarrollo, el ovocito experimenta una serie de cambios ultraestructurales y moleculares, lo cual se ha relacionado con su competencia de desarrollo (Vassena *et al.*, 2003).

Los ovarios obtenidos de vacas de matadero, todavía constituyen una fuente económica de ovocitos con fines comerciales y de investigación, pero su variabilidad es muy alta. También es necesario acotar, que existen grandes diferencias en el desarrollo de competencia de los ovocitos que maduran *in vivo* comparados con aquellos madurados en condiciones *in vitro*. Los ovocitos recuperados de hembras de matadero, son extremadamente heterogéneos en términos de calidad y competencia de desarrollo. Por

lo tanto, la selección de los ovocitos según el estatus reproductivo de la hembra bovina, es un parámetro de interés a considerar para mejorar las tasas de desarrollo *in vitro*.

Con base a lo anteriormente expuesto, se justifica el inicio de investigaciones relacionando el estatus reproductivo de la hembra donadora y la producción de embriones *in vitro* en nuestro país, para generar conocimiento que permita seleccionar los ovocitos con mayor habilidad para desarrollarse hasta la etapa de blastocito. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estatus reproductivo (gestantes *versus* vacías) de hembras mestizas Cebú *postmortem* sobre el número de ovocitos recuperados, la tasa de división embrionaria y la tasa de producción de blastocitos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo, se llevaron a cabo siete ensayos, de los cuales los dos primeros, sirvieron para estandarizar las diferentes técnicas a desarrollar en el laboratorio, verificar la calidad de los medios de cultivo y seleccionar las muestras de semen de los toros a utilizar.

### **Recolección y transporte de los ovarios**

Los ovarios de vacas y novillas mestizas cebú fueron recolectados en el Matadero Industrial de Turmero, ubicado aproximadamente a 20 km del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Reproducción Animal (IRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, donde se llevó a cabo el presente trabajo. Los ovarios fueron removidos del tracto reproductivo, inmediatamente después que los órganos internos se extrajeron de la canal, aproximadamente 20 min luego del sacrificio del animal. Los ovarios se separaron del resto del tracto genital con tijera e inmediatamente se clasificaron por grupo de tratamiento: hembras gestantes (ovarios con o sin CL [Gest-CL o Gest-noCL, respectivamente]) y hembras vacías (ovarios con o sin CL [Va-CL o Va-noCL, respectivamente]).

Los ovarios por cada grupo de tratamiento, se depositaron en frascos de boca ancha, estériles, de 500 mL de capacidad, previamente identificados, conteniendo el medio de transporte (solución salina estéril, adicionada de una mezcla de penicilina-

estreptomicina [0,75 mg/L, Sigma, St. Louis, MO, EUA]). Posteriormente, se colocaron en una cava de material termoaislante para su traslado al laboratorio a 37°C.

### **Recuperación de ovocitos**

La recuperación de los ovocitos se hizo por tasajeo de los ovarios con un bisturí, aproximadamente 4 h posterior al sacrificio del animal. El contenido fue recolectado en un vaso de precipitado de 400 mL, contenido del medio de recolección de ovocitos, el cual estuvo compuesto por medio de cultivo de tejidos (TCM-199; Sigma, St. Louis, MO, EUA), suplementado con 0,35 g de bicarbonato de sodio (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 2% de suero fetal bovino (Amersham Biosciences, EUA), 0,1 mg/mL de penicilina-estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), y 1 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Posteriormente, el contenido del vaso de precipitado se trasegó a tubos cónicos de 50 mL (Falcon®, Fisher Scientific, EUA), esperándose aproximadamente 10 min para que el contenido decantara en el fondo de los mismos. Los tubos con el contenido folicular, se mantuvieron en baño de María a 38°C.

Para el aislamiento de los ovocitos con cumulus oophorus compacto (CCO), se transfirió el material decantado en los tubos a las placas de búsqueda cuadradas (Fisherbrand®, Fisher Scientific, EUA), a través de la utilización de un filtro separador de células (Fisherbrand®, Fisher Scientific, EUA) de 100 µm.

Los ovocitos se seleccionaron visualizándose con un estereomicroscopio (Carl Zeiss), con aumento de 100X. Los ovocitos recolectados, fueron clasificados de acuerdo a los criterios de De Loos *et al.* (1989), siendo elegidos para el proceso de maduración, aquellos que presentaban el citoplasma granulado, homogéneo, sin manchas oscuras o espacios claros, y que por lo menos tenían tres capas de células del cumulus (Grado I y II). Los ovocitos fueron transferidos siete veces consecutivas a placas de Petri de 60 mm (Costar Falcon®, Fisher Scientific, EUA), mediante la utilización de la pipeta de transferencia, con el fin de hacer lavado de los mismos.

### **Maduración de los ovocitos**

Tres horas antes de proceder a madurar los ovocitos seleccionados, se prepararon las placas de

maduración, colocando nueve gotas de 50  $\mu$ L del medio de maduración, contenido de TCM-199 sin glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Amersham Biosciences, EUA), 2  $\mu$ g de E<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 20  $\mu$ g de FSH (Folltropin-V®; Bioniche, Canadá), 22  $\mu$ g/mL de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 50  $\mu$ g de sulfato de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y 1 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), en placas de Petri de 60 x 15 mm (Falcon®, Fisher Scientific, EUA.). Se trasegaron 10 ovocitos por gota, colocándoles suficiente aceite mineral e identificándolos según los grupos de tratamiento, llevándose a la incubadora a 39°C con 5% de CO<sub>2</sub>, en una atmósfera con 100% de humedad relativa, durante 20 a 24 h.

### Capacitación del semen

Luego de la maduración de los ovocitos, se procedió a realizar la capacitación del semen. Para ello, se utilizó semen congelado de fertilidad comprobada de dos toros del IRA.

La técnica de separación de espermatozoides móviles que se utilizó en este trabajo, fue la técnica de gradientes de Percoll (Percoll®, Sigma, St. Louis, MO, EUA; Paula-Lopes et al., 1998).

### Fertilización

Luego de culminado el tiempo de maduración de los ovocitos, éstos se colectaron de las placas de maduración y se transfirieron a placas de Petri con medio HEPES-TALP (Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate, por sus siglas en Inglés) para su lavado y nueva selección, agrupándolos en número de 30 para facilitar su traslado a las placas de cuatro pozos (Nunclon®, Fisher Scientific, EUA) con 600  $\mu$ L de medio de fertilización (FIV-TALP), llevándose inmediatamente a la incubadora, haciéndose el procedimiento por separado para cada tratamiento.

Una vez realizado el procedimiento de separación y capacitación espermática, se colocaron 25  $\mu$ L de semen (aproximadamente un millón de espermatozoides por mL) en cada pozo y 25  $\mu$ L de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE; Sigma, St. Louis, MO, EUA) y se llevaron a la incubadora a 39°C, equilibrada con 5% de CO<sub>2</sub>, con 100% de humedad relativa, cultivándose durante un período de 20 h.

Ovocitos no inseminados sirvieron de control de fragmentación por efecto de cultivo (control de partenogénesis).

### Cultivo de los embriones

Al menos 3 h antes de proceder al cultivo de los embriones, se prepararon las placas de Petri de 60 x 15 mm, colocando gotas de 50  $\mu$ L del medio de cultivo KSOM (medio simple de potasio optimizado), de acuerdo a los grupos de tratamiento.

Se colectaron los supuestos cigotos de las placas de fertilización y con la finalidad de separar las células que continúan adheridas a los embriones, se llevaron al vortex durante 3-4 min con 50  $\mu$ L de HEPES-TALP e hialuronidasa (Sigma, St. Louis, MO, EUA) en un tubo cónico de 1 mL de capacidad.

Concluido este procedimiento, se lavaron los embriones con HEPES-TALP, haciéndose el último lavado con el medio de cultivo KSOM, siendo los embriones inmediatamente transferidos a las placas de cultivo, colocándose 30 ovocitos por cada gota de medio. Este procedimiento al igual que los demás, se realizó para cada grupo de tratamiento por separado.

A las 72 h post cultivo, se realizó la primera evaluación y conteo de la tasa de división embrionaria por grupo de tratamiento y a los 7 d, se evaluó la tasa de blastocitos obtenidos.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de ovocitos recuperados fue analizado utilizando el procedimiento GENMOD, asumiendo una distribución de Poisson, mientras que los datos de división y producción de blastocitos fueron analizados utilizando una regresión logística asumiendo una distribución binomial. El modelo estadístico para todos los análisis incluyó el efecto del estatus reproductivo (gestante vs. vacía), presencia o no de un CL (CL vs. NoCL) y la interacción estatus x CL, utilizando para dichos análisis el Sistema de Análisis Estadístico SAS (2005).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó un total de 4658 ovocitos provenientes de 437 ovarios, obteniéndose que el número de ovocitos procedentes de hembras gestantes ( $12,5 \pm 2,8$ ) fue significativamente mayor ( $p < 0,03$ ) al compararlo con el número de ovocitos provenientes de ovarios de hembras vacías ( $9,4 \pm 2,5$ ); no encontrándose diferencia significativa, en el número de ovocitos por ovario con ( $12,5 \pm 2,9$ )

o sin CL ( $12,6 \pm 2,9$ ), en el caso de las hembras gestantes y con ( $8,6 \pm 2,5$ ) o sin CL ( $10,2 \pm 2,7$ ), en el caso de las hembras vacías (Tabla 1).

En este sentido, Moreno *et al.* (1993), reportan que el número de ovocitos obtenido por ovario, fue significativamente mayor en hembras gestantes (10,7) en comparación con los ovocitos recuperados de ovarios de hembras vacías (7,6), siendo estos resultados similares a los encontrados en nuestro trabajo, señalando, que existe un incremento significativo de ovocitos grado I, en los ovarios de las vacas gestantes en comparación con los ovarios de las vacas vacías. Esto puede deberse a la presencia de altas concentraciones de  $P_4$  en la circulación, resultando en la regresión del folículo dominante y emergencia de nuevas ondas foliculares.

Asimismo, en un trabajo realizado en hembras Nelore (*Bos indicus*) en Brasil, el número de ovocitos recuperados por ovario, en vacas gestantes y vacías, fue de 5,8 y 6,1, respectivamente, durante la época de sequía y de 9,9 y 8,4, respectivamente, en la época lluviosa (Dode *et al.*, 2001), no encontrándose diferencia significativa entre ambos grupos; sin embargo, estos resultados son inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, utilizando ovocitos de hembras Mestizas Cebú. Por otra parte, Rocha *et al.* (1998), demostraron que la época de sequía declina marcadamente la calidad del ovocito recuperado en el caso de vacas *Bos taurus*, pero no de los ovocitos provenientes de vacas *Bos indicus* o sus cruces.

En este sentido, Boediono *et al.* (1995) y Pirestrani *et al.* (2010) no obtuvieron diferencia significativa en el número de ovocitos recuperados de ovarios de vacas vacías *postmortem*, en ausencia ( $n=15$  y  $n=20,8$ , respectivamente) y presencia de CL ( $n=15$  y  $n=22$ , respectivamente), lo cual confirma los hallazgos del presente estudio.

Asimismo, al comparar el número de ovocitos recuperados de ovarios de novillas y vacas Holstein vacías *postmortem*, Rizos *et al.* (2005) no consiguieron diferencias significativas entre ambos grupos (7 vs. 7,2).

En el caso de la tasa de división embrionaria (Tabla 2), fue significativamente mayor ( $p < 0,006$ ) en el grupo de hembras vacías ( $42,3 \pm 0,01\%$ ;  $n=312$ ), con respecto a las vacas gestantes ( $34,5 \pm 0,02\%$ ;  $n=174$ ); asimismo, la interacción estatus reproductivo por CL afectó ( $p < 0,006$ ) la tasa de división embrionaria: las vacas gestantes con CL ( $31,1 \pm 0,02\%$  [76/244]) tuvieron menor tasa de división embrionaria que los ovocitos provenientes de ovarios de las vacas gestantes sin CL ( $38,0 \pm 0,03\%$  [98/258]); por el contrario, los ovocitos provenientes de ovarios de las vacas vacías con CL tuvieron mayor tasa de división embrionaria  $46,7 \pm 0,03\%$  [169/362] que las vacas vacías sin CL ( $38,0 \pm 0,03\%$  [143/376]).

Es importante aclarar, que durante el ensayo 1, se presentaron problemas en el laboratorio, motivo por el cual, no se pudo fertilizar los ovocitos de las hembras gestantes, como se refleja en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Número de ovocitos obtenidos de acuerdo al estatus reproductivo de vacas (gestantes vs. vacías) en presencia o ausencia de CL

Ensayo	Hembras Gestantes		Hembras Vacías (Ovocitos/ovario)			
	CL	NoCL	Total	CL	NoCL	Total
	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)
1	177/24 (7,3)	285/28 (10,1)	462/52 (8,9)	131/15 (8,7)	106/13 (8,1)	237/28 (8,5)
2	211/14 (15)	245/15 (16,3)	456/29 (15,7)	186/22 (8,5)	223/21 (10,6)	409/43 (9,5)
3	52/5 (10,4)	59/5 (11,8)	111/10 (11,1)	229/35 (6,5)	279/34 (8,2)	508/69 (7,4)
4	350/32 (10,9)	360/37 (9,7)	710/69 (10,3)	220/24 (9,2)	280/23 (12,2)	500/47 (10,6)
5	444/24 (18,5)	361/24 (15)	805/48 (16,7)	220/22 (8,3)	240/20 (12)	460/42 (10,9)
Total	1234/99 (12,5 ± 2,9)	1310/109 (12,6 ± 2,9)	2544/208 (12,5 ± 2,8) <sup>a</sup>	986/118 (8,6 ± 2,5)	1128/11 (10,2 ± 2,7)	2114/229 (9,4 ± 2,5) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Valores con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,03$ )

**Tabla 2.** Tasa general de división embrionaria de ovocitos provenientes ovarios de vacas gestantes y vacías en presencia o ausencia de CL

Ensayo	Hembras Gestantes			Hembras Vacías		
	CL (%)	noCL (%)	Total (%)	CL (%)	noCL (%)	Total (%)
1	-	-	-	40/72 (55,6)	32/61 (52,5)	72/133 (54,1%)
2	17/66 (25,8)	39/119 (32,8)	56/185 (30,3)	64/118 (54,2)	32/98 (32,7)	96/216 (44,4%)
3	6/28 (21,4)	8/24 (33,3)	14/52 (27)	40/82 (48,8)	68/132 (51,5)	108/214 (50,5%)
4	53/150 (35,3)	51/115 (44,3)	104/265 (39,2)	25/90 (28)	11/85 (13)	36/175 (21%)
Total	76/244 (31,1±0,02%) <sup>a</sup>	98/258 (38±0,03%)	174/502 (34,5±0,02%) <sup>l</sup>	169/362 (46,7±0,03%) <sup>b</sup>	143/376 (38±0,03%)	312/738 (42,3±0,01%) <sup>2</sup>

<sup>l2</sup> Valores con diferentes números como superíndices en la misma columna difieren significativamente ( $p < 0,006$ )

<sup>ab</sup> Valores con diferentes letras como superíndices en columnas diferentes difieren significativamente ( $p < 0,006$ )

En cuanto a la tasa de producción de blastocitos (Tabla 3), no hubo diferencia significativa en la tasa de producción de blastocitos a partir de embriones divididos provenientes de hembras gestantes ( $10,7 \pm 0,02\%$ ; [17/160]) con y sin CL ( $11,4 \pm 0,04\%$ ; [8/70] y  $10,0 \pm 0,03\%$ ; [9/90], respectivamente) comparado con el grupo de hembras vacías ( $10,0 \pm 0,02\%$ ; [30/312]) con y sin CL ( $8,2 \pm 0,02\%$ ; [14/169] y  $11,2 \pm 0,03\%$ ; [16/143], respectivamente).

Asimismo, en el caso del ensayo 3, si hubo división embrionaria; pero por problemas con el medio de cultivo, los embriones no progresaron, tal y como se muestra en la Tabla 3.

Chohan y Hunter (2003), señalan que los ovocitos recuperados durante la fase de metaestro del ciclo estral en hembras vacías, resultaron en una tasa de división embrionaria mayor (60%) que aquellos ovocitos recuperados durante la fase folicular (51,7%); mientras que los ovocitos obtenidos durante el diestro, presentaron una pobre tasa de fecundación así como de división embrionaria (39,8%), posiblemente debido a la recolección de ovocitos de una cohorte de folículos pequeños atrésicos provenientes de la primera o segunda onda de crecimiento folicular. Es importante mencionar que durante el metaestro y diestro (fase luteal), predomina la secreción de  $P_4$  por el CL, mientras que la fase folicular se caracteriza por el desarrollo

de un folículo preovulatorio que secreta  $E_2-17\beta$ . Los resultados de Chohan y Hunter (2003) coinciden con los resultados de mayor división embrionaria para ovocitos provenientes de vacas Va-CL (54,1%), comparada con la obtenida para ovocitos provenientes de hembras Va-NoCL (45,8%). Aunque en este trabajo no se precisó en cuál fase del ciclo estral se encontraba la vaca, se obtuvo una mayor tasa de división embrionaria cuando los ovocitos fueron recuperados de ovarios con CL, lo cual supone que las vacas estaban en fase luteal.

Los mejores resultados obtenidos durante la fase luteal temprana, pueden deberse a ovocitos recuperados durante la primera onda de crecimiento folicular, después de la ovulación, debido a que durante esta etapa se recupera un mayor número de ovocitos con competencia de desarrollo, que los recuperados durante otras etapas de la fase luteal o de la fase folicular del ciclo estral, como lo señalan Chohan y Hunter (2003). Por otra parte, el desarrollo del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular, está asociado con la atresia de los folículos subordinados de esa misma cohorte, siendo los ovocitos de estos folículos los que presentan mejor tasa de división embrionaria (Adams, 1999; Salomone *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2009).

Igualmente, Chohan y Hunter (2003), reportan que el desarrollo de los ovocitos recolectados de hembras gestantes y en anestro, es pobre (46,9%

**Tabla 3.** Tasa general de producción de blastocitos provenientes de ovarios de vacas gestantes y vacías en presencia o ausencia de CL

Ensayo	Hembras Gestantes			Hembras Vacías		
	CL (%)	noCL (%)	Total (%)	CL (%)	noCL (%)	Total (%)
1	-	-	-	4/40 (10)	3/32 (9,3)	7/72 (9,7)
2	2/17 (12)	5/39 (13)	7/56 (13)	5/64 (8)	3/32 (9,3)	8/96 (8,3)
3	-	-	-	2/40 (5)	9/68 (13,2)	11/108 (10,2)
4	6/53 (11,3)	4/51 (8)	10/104 (10)	3/25 (12)	1/11 (9)	4/36 (11,1)
Total	8/70 (11,4±0,04%)	9/90 (10±0,03%)	17/160 (10,7±0,02%)	14/169 (8,2±0,02%)	16/143 (11,2±0,03%)	30/312 (10±0,02%)

y 44,1%, respectivamente); sin embargo, dichos ovocitos deben considerarse para la PIV.

En este sentido, Behboodi *et al.* (1992) reportaron una tasa de división embrionaria de 38% a partir de ovocitos recolectados de ovarios de hembras gestantes, comparada con un 40% de ovocitos provenientes de hembras no gestantes y una tasa de blastocitos de 13% en ambos casos, indicando que las vacas gestantes durante el primer trimestre, son igualmente aceptables como donadoras de ovocitos para la PIV, siendo estos resultados similares a los reseñados en nuestro trabajo (Tablas 2 y 3).

Por otra parte, Vajta *et al.* (1992) reportaron 48% y 51% de tasa de división embrionaria en ovarios de vacas gestantes y vacías, respectivamente, similar a nuestros resultados.

Por el contrario, Sivakumaran *et al.* (1991), señalaron la obtención de una mayor tasa de división embrionaria (72%) para ovocitos provenientes de ovarios de vacas gestantes, comparada con la tasa de división embrionaria para ovocitos provenientes de ovarios de vacas en diestro (69%). Se ha reportado (Moreno *et al.*, 1993) que los ovarios de vacas gestantes son una fuente de ovocitos con gran competencia de desarrollo. Esto puede ser debido a los altos niveles de P<sub>4</sub> en la circulación, resultando en la regresión del folículo dominante y la constante emergencia de ondas foliculares.

En otro estudio (Boediono *et al.*, 1995), compararon la tasa de división embrionaria de ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías en ausencia y presencia de CL, resultando esta tasa,

significativamente mayor en ausencia de CL (88% vs. 75%, respectivamente), difiriendo de los hallazgos del presente trabajo; sin embargo, la tasa de producción de blastocitos fue mayor en el grupo de ovocitos provenientes de ovarios con presencia de CL (24% vs. 13%), difiriendo también de la tendencia lograda en nuestros resultados.

Pirestrani *et al.* (2010), no encontraron diferencias significativas en la tasa de división embrionaria de ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías sin CL (68,4%) y con CL (73,9%), infiriendo una tendencia mayor hacia los ovarios con CL. De igual forma, estos autores no reportaron diferencias significativas entre ambos grupos en lo que se refiere a la tasa de producción de blastocitos alcanzada, señalando una leve tendencia a ser mayor en los ovocitos provenientes de ovarios con presencia de CL. En este sentido, dichos autores indican que a pesar de los efectos menores observados durante la división embrionaria en cultivo, el estatus cíclico del ovario tiene un efecto sobre la capacidad de los ovocitos de continuar su desarrollo hacia la etapa de blastocito.

Con base a lo anteriormente señalado, nuestros resultados pueden ser considerados como un hallazgo que sugiere que el estatus cíclico del ovario en el momento de la recuperación de los ovocitos, no compromete la calidad de los mismos para experimentar las primeras divisiones embrionarias (8-16 células). Es conocido que los embriones producidos *in vitro*, presentan bloqueo del desarrollo en el momento de la activación del genoma (8-16

células), cuando la reserva potencial del mRNA heredado de la madre, crucialmente determina la competencia de dichos embriones para progresar hasta la etapa de blastocito (Pirestrani et al., 2010).

Nuestros resultados indican que los embriones derivados de ovocitos provenientes de ovarios que presentaban CL, tuvieron una mejor competencia para alcanzar el estadio de mórula compacta o blastocito, comparado con los embriones derivados de ovocitos provenientes de ovarios sin presencia de CL.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto de Investigación N.º PG 116940-2007, intitulado: Producción *in vitro* de embriones en ganado *Bos indicus*, Doble Propósito, Criollo Romosinuano y ganado Bupalino (*Bubalus bubalis*) bajo condiciones tropicales, otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV.

## REFERENCIAS

- Adams, G.P. 1999. Comparative pattern of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 54: 17-32.
- Behboodi, E.; Anderson, G.B.; BonDurant, R. 1992. Development of *in vitro* fertilized oocytes from pregnant and non pregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology*, 38:1077-1084.
- Boediono, A.; Saha, S.; Sumantri, C.; Suzuki, T.; Rajamahendran, R. 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production *in vitro*. *Theriogenology*, 43:169 (Abstr.).
- Chohan, K.R.; Hunter, A. 2003. Effect of reproductive status on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *J. Vet. Sci.*, 4: 67-72.
- De Loos, F.; Van Vliet, C.; Van Mauric, P.; Kruip, T.A.M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.*, 24: 189-204.
- Dode, M.A.N.; Rodovalho, N.C.; Ueno, V.G.; Alves, R.G.O. 2001. Oocyte recovering from *Bos indicus* females. *Arch Zootec.*, 50:415-418.
- Li, H.J.; Liu, D.J.; Cang, M.; Wang, L.M.; Jin, M.Z.; Ma, Y.Z.; Shorgan, B. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 114: 89-98.
- Merton, J.S.; de Roos, A.P.W.; Mullaart, E.; de Ruigh, L.; Kaal, L.; Dieleman, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo production technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59:651-674.
- Moreno, J.F.; Flores-Foxworth, G.; Westhusin, M.; Kraemer, D.C. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Theriogenology*, 39: 271 (Abstr.).
- Paula-Lopes, F.F.; de Moraes, A.A.S.; Edwards, J.L.; Justice, J.E.; Hansen, P.J. 1998. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1. *Biol. Reprod.*, 59:1406-1412.
- Pirestrani, A.; Morteza, S.; Hajian, M.; Forouzanfar, M.; Moulavi, F.; Avedi, P.; Gourabi, H.; Shahverdi, A.; Vosough, A.; Hossein, M. 2010. Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle. *Int. J. Fertil. Steril.*, 4:172-175.
- Rizos, D.; Burke, L.; Duffy, P.; Wade, M.; Mee, J.F.; Farrel, K.O.; MacSiurtain, M.; Boland, M.; Lonergan, P. 2005. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, 63:939-949.
- Rocha, A.; Randel, R.D.; Broussard, J.R.; Lim, J.M.; Blair, R.M.; Roussel, J.D.; Hansel, W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, 49:657-665.
- Salomone, D.F.; Adams, G.P.; Mapletoft, R.J. 1999. Change in the cumulus oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology*, 52:549-561.
- Statistical Analysis System (SAS 9.1). 2005. SAS Institute Inc., SAS 9.1, Cary, NC.
- Sivakumaran, K.; Calder, M.; Rajamahendran, R. 1991. The influence of reproductive status of bovine on oocyte number and maturation *in vitro* and the effect of coculture system on fertilization and subsequent development. *J. Vet. Sci.*, 69 (Suppl):438 (Abstr.).
- Vajta, G.; Machati, Z.; Barandi, Z.; Varga, Z. 1992. Embryos derived from the *in vitro* fertilization of oocytes of pregnant cows. *Theriogenology*, 37:811-815.
- Vassena, R.; Mapletoft, R.J.; Allodi, S.; Singh, J.; Adams, G.P. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, 60:923-932.
- Ward, F.A.; Lonergan, B.P.; Enright, B.P.; Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 54:433-446.