

EVALUACIÓN CITOGENÉTICA DE OVOCITOS MADURADOS *IN VITRO*, EN VACAS CRIOLLAS EN ECUADOR - RESULTADOS PRELIMINARES

Cytogenetic evaluation of *in vitro* matured oocytes from Ecuadorian creole cows- Preliminary results

K. Cañón-Beltrán¹, S. Demyda², M. Moreno Millán²

¹Centro de Investigación, Transferencia de Tecnología, Extensión y Servicios Agropecuarios, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, 1101608 Loja, Ecuador.

²Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, 14071, Córdoba, España.

E-mail: kecanon@utpl.edu.ec

INTRODUCCIÓN

Una de las biotecnologías reproductivas de mayor auge en las explotaciones pecuarias es la producción de embriones de alta calidad y de manera eficiente la maduración ovocitaria *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo embrionario *in vitro* (CEIV) (Kane, 2003). Esto ha llevado a desarrollar en el ganado métodos de recolección de los ovocitos inmaduros y estudiar las condiciones adecuadas para la maduración nuclear (Sirard, 1989). La maduración depende de la interacción de varios factores que permiten el desarrollo de los ovocitos hasta la metafase II (Lorenzo *et al.*, 1996). El objetivo de nuestro estudio fue establecer la relación entre la calidad de los ovocitos de vacas criollas ecuatorianas y la influencia de un medio de cultivo sobre la maduración *in vitro*, utilizando una técnica citogenética para evaluar la progresión nuclear o meiótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de vacas sacrificadas en un matadero comercial se obtuvieron 196 ovarios que luego fueron transportados al laboratorio en PBS suplementado con antibióticos a 37 °C en un recipiente isotérmico. Los complejos cumulus-ovocitos (COC's) fueron recuperados mediante aspiración utilizando una jeringa con una aguja de 0,6x25 mm. Se clasificaron según su calidad en categorías A, B, C y D (Ocaña-Quero *et al.*, 1999). Para madurar se dividieron en 2 grupos (tratamiento y control) con características numéricas comparables y fueron madurados durante 24 horas a 39 °C en 5% CO₂ y ambiente húmedo. El medio utilizado para el grupo tratamiento fue en TCM-199 suplementado con piruvato de sodio, antibiótico, hormona luteinizante, 17β estradiol y 10% de suero fetal bovino (FBS) y para el grupo control TCM 199.

Después de la maduración los ovocitos se cultivaron durante 10 minutos en una solución de tripsina 0,25% periodo en el cual se eliminaron las células del cúmulo, luego fueron depositados en una solución de citrato trisódico al 0,88 % y en una solución de cloruro potásico. Para fijarlos, se colocaron en una solución de citrato trisódico y luego en el fijador Carnoy 3:1 durante toda la noche. Se tiñeron con giemsa al 5% y se evaluaron bajo microscopio (400X). Se consideraron 4 grados de maduración, estadio de madurez, intermedio, inmaduro y degenerado descritos por Ocaña-Quero *et al.* (1999). Los datos fueron analizados mediante una prueba de Chi-cuadrado, utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 considerándose las diferencias significativas de los porcentajes medios cuando *P* fue menor a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 588 ovocitos fueron evaluados en este trabajo; los cuales se distribuyeron en 3 grupos dependiendo de la calidad (A, B y C, los ovocitos calidad D fueron excluidos). Se realizaron dos grupos (tratamiento y control). Cuando evaluamos la asociación entre el estadio de maduración y la calidad del ovocito, encontramos una asociación (*P*<0,001) entre el estadio de madurez y la calidad A. Para las demás calidades no se encontraron valores significativos.

En nuestro estudio los ovocitos de calidades superiores tienen mejores tasas de maduración que los ovocitos de calidades inferiores, lo que coincide con Ocaña-Quero *et al.* (1999), quienes en sus estudios evaluaron el estadio de madurez encontrando que los ovocitos de mejor calidad son las categorías "A" y "B", porque muestran unos mayores índices de maduración con respecto a los de menor calidad como las categorías "C" y "D". Para seleccionar un ovocito de buena calidad se debe tener en cuenta los que están rodeados por un cumulus compacto de color gris o marrón uniformemente oscuro, ya que la función de esta característica es regular la maduración (Tanghe *et al.*, 2002). También se debe tomar en

cuenta el número de capas que lo conforman, la compactación y transparencia; en cuanto al citoplasma: el color, la densidad y el tamaño de la granulación si ésta es fina, densa o uniforme (Palma y Sinowatz, 2004).

Los resultados con más relevancia en nuestro estudio son las relaciones encontradas entre el grupo control/experimental con el estadio de maduración (estadio de madurez, intermedio, inmaduro o degenerado); en la Tabla 1 se indica una asociación ($P < 0,001$) entre el grupo con calidad A y el estado de madurez entre los ovocitos con tratamiento.

Tabla 1. Tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en tratamiento hormonal

Estadio de maduración	Grupo	
	Control	Tratamiento
1*	Frecuencia	81
	Porcentaje	30,8 ^a
2**	Frecuencia	166
	Porcentaje	51,1 ^c

* Estadio de madurez

** Estadio de madurez intermedio, inmaduro y degenerado

a,b,c: Valores con diferentes superíndices son estadísticamente distintos ($P < 0,001$)

El efecto que tiene sobre la maduración ovocitaria el aplicar un protocolo hormonal en un grupo experimental frente a no aplicarlo en un grupo control ha sido puesto de manifiesto por la diferencia significativa encontrada. El porcentaje de ovocitos en estadio de madurez (69,2 %) en el grupo experimental es mayor al encontrado en el grupo control (30,8 %) (ver Tabla 1). En referencia a otros autores nuestro porcentaje de maduración fue similar al obtenido por Baez *et al.* (2010) (68,85 %) y Rodríguez *et al.* (2004) (52,75 %) y Bóez *et al.*, (2008) (61,36%) bajo condiciones similares y empleando los ovarios de hembras mestizas sacrificadas en matadero. Existen resultados diferentes en estudios anteriores donde reportan porcentajes mayores de 88% (Hashimoto *et al.*, 2002), 92% (Chohan y Hunter, 2004) y menores 46,93% (González *et al.*, 2000).

En este sentido dos grandes enfoques se han adoptado para mejorar la capacidad de desarrollo de ovocitos después de ser extraídos del folículo. El primero es promover el crecimiento adicionando sustancias al medio de cultivo (gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento, etc.). Las mejoras son modestas en el desarrollo logrando de esta manera una producción de blastocistos en algunas ocasiones por encima del 50% (Thompson, 2000). El segundo enfoque es tratar de imitar las condiciones intrafoliculares del ovocito cuando se mantiene en detención meiótica. Una explicación para el escaso desarrollo de los ovocitos inmaduros recuperados de los ovarios de vaquillas sacrificadas, es porque éstos se obtienen principalmente de pequeños folículos de tamaño medio que, si es seleccionado para convertirse en dominante, están todavía por lo menos varios días fuera de la posible ovulación. En contraste, el folículo que ovula un ovocito maduro en la metafase II crece a un tamaño de 15-20 mm. De este modo los ovocitos típicos presentados en la maduración *in vitro*, aunque son capaces de altas tasas de maduración nuclear, no han tenido tiempo suficiente para someterse a la maduración citoplasmática normal. Es importante destacar que en el ovocito madurado *in vivo* con la presencia de líquido folicular hay un efecto positivo iniciado por el estímulo en el pico de la LH. En cambio en los ovocitos madurados *in vitro*, después de la extracción del folículo hay un efecto negativo en el medio ambiente del líquido folicular sin el estímulo positivo iniciado por el pico de LH (Lonergan y Fair, 2008).

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que los ovocitos provenientes de vacas criollas ecuatorianas responden positivamente a la maduración ovocitaria *in vitro*, y la selección de ovocitos es clave para el procedimiento, además de revelar la relación entre la morfología del ovocito en cuanto a su calidad y la fase de maduración meiótica. Es así que los ovocitos de calidad superior como la A, obtuvieron mejores tasas de maduración meiótica que los demás tipos de ovocitos, por lo tanto una buena identificación y clasificación es indispensable para obtener buenos resultados de maduración. Las condiciones del medio a las cuales se enfrenta el ovocito son importantes para lograr una maduración adecuada, en nuestro caso la adición de hormonas al medio de cultivo aumentó la tasa de maduración de los ovocitos significativamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Baez, F.J., Chavez, A.C., Fonseca, H., Villamediana, P. 2010. Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev. cient.* (Maracaibo) 20: 259-267.
- Bóez, F., Hernández. L., Villamediana, P. 2008. Estudio meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Rev Cientif. FCV-LUZ. XVIII* 3: 253-268.
- Chohan, K.R., Hunter, A. G. 2004. In vitro maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology* 61: 373-380.
- González, N., Echegaray, A., Gil, L., Falceto, M.V. 2000. Efecto de 17 b-estradiol en la maduración y fecundación in vitro de ovocitos bovinos de novillas sacrificadas en el matadero. *Med. Ver.* 17, 173-180.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Imai., H. 2002. Bovine immature oocytes developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol. of Reprod.* 66: 1696- 1701.
- Kane, MT. 2003. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Anim. Reprod Sci.* 79: 171–190.
- Lonergan, P., Fair, T. 2008. In Vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22.
- Lorenzo, P.L., Rebollar, P.G.; Illera, M.J., Illera M., Alvaríño J.M.R. 1996. Stimulatory effect of insulin-like growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro, *Journal of Reproduction and Fertility* 107: 109-117.
- Ocaña-Quero, J.M., Pinedo Merlín, M.; Moreno Millán, M. 1999. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 51: 667-72.
- Palma, G.A., Sinowatz. 2004. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol.* 33, 257-262.
- Rodríguez, B., Molina, J., Villamediana, P. 2004. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Cien* 12(2): 125-136.
- Sirard, M.A. 1989. Practical aspects of in-vitro fertilization of cattle. *J. Reprod. Fert.* 38, 127-134.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 414–424.
- Thompson, J.G. 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61:263–75.