

## Influencia del cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos

*Influence of the active corpus luteum on the competence and morphological characteristics of bovine oocytes*

Argudo, D.E.<sup>1\*</sup>, Balvoa T., J.A.<sup>1</sup>, Tenemaza C., M.A.<sup>1</sup>, Méndez, S.M.<sup>1</sup>, Soria, M.E.<sup>1</sup>, A.R., Ayala, L.<sup>1</sup>, Galarza A., L.R.<sup>1</sup>, Hernández F., H.J.<sup>2</sup>, Perea G., F.P.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Medicina Veterinaria Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Agrarias, Universidad de Los Andes, Venezuela.

Autor de correspondencia: daniel.argudo@ucuenca.edu.ec

### 1. INTRODUCCIÓN

La producción *In vitro* de embriones (PIVE) es una de las biotécnicas de reproducción asistida ampliamente usada en las últimas décadas sobre todo en la especie bovina. El término PIVE se utiliza para englobar los procedimientos realizados en un laboratorio que incluye las etapas de maduración, fertilización y cultivo, que son necesarias para la producción de embriones a partir de ovocitos inmaduros (Viana, Siqueira, Palhão, & Camargo, 2010) o también llamados complejos cúmulus-ovocito (Coc's). Se pueden obtener Coc's ya sea de vacas vivas o de ovarios de matadero, en el último caso con la finalidad de producir embriones a gran escala o con fines de investigación (Mermillod, 2011).

La PIVE con ovarios de matadero ha permitido, entre otras cosas, obtener información con respecto a las interacciones que ocurren de forma natural entre las gametas femeninas (Coc's) y el ovario, oviducto y el útero. Es así, que se ha logrado evidenciar particularmente la influencia que tiene un cuerpo lúteo (CL) activo o funcional sobre los Coc's, en cuanto a la calidad y cantidad de los recuperados; sin embargo, estos estudios presentan discrepancias en cuanto a si el CL tiene o no algún efecto en la competencia de los ovocitos para madurar, y luego de fecundados, para progresar durante el desarrollo embrionario (Reis, Staines, Watt, Dolman, & McEvoy, 2002; Shabankareh, Habibizad, Sarsaifi, Cheghamirza, & Jasemi, 2010; Penitente-Filho, Jimenez, Zolini, Carrascal, Azevedo *et al.*, 2015).

El objetivo de la presente investigación fue determinar la influencia de un cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero.

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Colecta, procesamiento y evaluación de ovarios de matadero

Se colectaron ovarios bovinos del camal municipal de Cuenca EMURPLAG EP, los mismo fueron trasladados en solución salina 0.9% a una temperatura entre 25°C y 30°C al laboratorio para su procesamiento en un tiempo menor a 3 horas. En el laboratorio, los tejidos adyacentes a los ovarios fueron removidos cuidadosamente con una tijera y lavados, por dos ocasiones, en una solución salina al 0.9%. Los ovarios fueron separados en 2 grupos: 1) con cuerpo lúteo (CCL; n = 30), ovarios que contenían un CL que por sus características externas correspondía con una estructura luteal funcional,

tal como lo describe Ireland, Murphee, & Coulson (1980); y, 2) sin cuerpo lúteo (SCL; n=60), ovarios que carecían de estructura luteal alguna.

## 2.2. *Colecta y selección de Coc's*

Los folículos antrales con un diámetro entre 2 a 8 mm fueron puncionados con una jeringa desechable de dos piezas y una aguja calibre 20G. El líquido folicular recuperado de cada ovario fue colocado en un tubo eppendorf de 2cc identificado de acuerdo al grupo experimental, y posteriormente, con un estereoscopio de luz diascópica los Coc's fueron aislados y calificados en cuatro categorías, A, B, C y D, de acuerdo a los criterios propuestos por Khandoker, Atiqah, & Ariani (2011). En el estudio se utilizaron únicamente los Coc's de categoría A y B, mientras que los C y D fueron eliminados del experimento.

## 2.3. *Determinación de la competencia*

Una vez clasificados y seleccionados los Coc's de los grupos CCL (n = 171) y SCL (n = 318), su estado funcional fue evaluado mediante la determinación de la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD). Para ello, estos fueron desnudados por pipeteo en una solución de HEPES-SOF suplementada con hialuronidasa ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) y luego expuestos por 90 minutos a la tinción vital de  $26\ \mu\text{M}$  de Azul Brillante de Cresilo (BCB). Aquellos cuyo citoplasma se tiñó de azul fueron clasificados como BCB+. La tinción de BCB indica si la enzima G6PD está presente o no en el citoplasma, ya que, si lo está, degrada el colorante, caso contrario el colorante permanece y los ovocitos son teñidos.

## 2.4. *Morfometría*

Los ovocitos fueron fotografiados con una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) montada sobre un microscopio con 100x, y, con la ayuda de un software (AmScope V.3.7) calibrado, se realizaron las mediciones del espesor de la zona pelúcida y radio del ovocito. Posteriormente, se calculó el diámetro y volumen de cada ovocito (las medidas fueron expresadas en micras).

## 2.5. *Análisis estadístico*

Se aplicó un modelo lineal completamente aleatorizado, considerándose como variables independientes la repetición, ovario y el grupo experimental (CCL y SCL), y como variables dependientes peso del ovario, resultado a BCB, espesor de la zona pelúcida y diámetro y volumen del ovocito. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, 2012) y las diferencias entre medias se compararon con el procedimiento LSMeans del SAS.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Un total de 489 Coc's de categoría A y B fueron evaluados. Al realizar el análisis de los Coc's a la tinción de BCB, se encontró que el  $78.3\pm 1.5\%$  de los ovocitos que provenían de ovarios CCL fueron BCB+, siendo superior estadísticamente ( $P<0.01$ ) a los recuperados de ovarios SCL que fueron BCB+ en un  $65.1\pm 1.2\%$ . La prueba BCB determina la actividad de la enzima G6PD, presente durante la fase de crecimiento ovocitario, si el crecimiento culminó la enzima desaparece y los ovocitos son teñidos, pues la enzima degrada el colorante. Por otro lado, se ha demostrado que el tamaño de los ovocitos es un factor que determina su competencia (Pujol *et al.*, 2002); sin embargo, no ha sido reportado que el CL tenga efecto alguno sobre el tamaño de los mismos.

Los resultados de ésta investigación (Tabla 1) demostraron que los ovocitos obtenidos de ovarios CCL fueron de mayor diámetro que los SCL ( $126.4 \pm 0.63$  versus  $124.1 \pm 0.63$  respectivamente;  $P<0.01$ ), lo que corresponde con los resultados de la prueba indirecta de crecimiento de BCB. Asimismo, el espesor de la zona pelúcida tuvo el mismo comportamiento, es decir, fue mayor en el

grupo CCL ( $15.7 \pm 0.16 \mu\text{m}$ ) que en el SCL ( $15.2 \pm 0.22 \mu\text{m}$ ); y esto mismo ocurrió cuando se analizó el volumen del ovocito en  $\mu\text{m}^3$  ( $1072322.5 \pm 15701.4$  vs  $1011583.0 \pm 11199.2$  para CCL y SCL respectivamente).

**Tabla 1.** Competencia y características morfométricas de los ovocitos bovinos colectados de ovarios de matadero de acuerdo a la presencia o no de un cuerpo lúteo.

Características estudiadas	Tipo de ovario	
	Con cuerpo lúteo	Sin cuerpo lúteo
Número de ovocitos	171	318
Espesor de la zona pelúcida ( $\mu\text{m}$ )	$15.7 \pm 0.16^a$	$15.2 \pm 0.22^b$
Diámetro del Ovocito ( $\mu\text{m}$ )	$126.4 \pm 0.63^b$	$124.1 \pm 0.63^c$
Volumen del Ovocito ( $\mu\text{m}^3$ )	$1072322.5 \pm 15701.4^b$	$1011583.0 \pm 11199.2^c$
BCB+ (%)	$78.3 \pm 1.5^b$	$65.1 \pm 1.2^c$

Letras diferentes en la misma línea muestran diferencias significativas: <sup>a,b</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b,c</sup>  $P < 0.01$

Estos resultados muestran que la presencia de un CL afecta los Coc's obtenidos del mismo ovario. Pierson & Ginther (1987), reportaron un efecto positivo intraovarico del CL sobre los folículos antrales. En un trabajo realizado en ovejas Shabankareh *et al.* (2010) se demostraron que el CL, además del efecto sistémico, tiene un efecto intraovarico sobre la población folicular, que, aunque no está claro a través de qué mecanismos ocurre, permite especular que podrían ser los mismos que estimularon el crecimiento y alteraron las características morfométricas de los ovocitos obtenidos de ovarios CCL.

Fair, Hyttel, & Greve (1995) mencionaron que el desarrollo folicular está positivamente correlacionado con el diámetro de los ovocitos. Por otra parte, el CL tienen como principal función producir P4, y es conocido que ésta hormona tiene un efecto favorable sobre la calidad ovocitaria. Aunque en esta investigación no se realizaron determinaciones de P4, la misma podría estar involucrada en los mecanismos que afectaron la competencia de los ovocitos. Rothchild (1996) expresó que la P4 producida por el CL tiene un efecto luteotrófico para mantener su propia función, lo que hace pensar que el efecto de esta hormona podría extenderse localmente en el ovario, afectando de forma positiva la calidad, y por lo tanto, la competencia de los ovocitos, pero esto tendría que ser comprobado.

Asimismo, es posible que factores que intervienen en la angiogénesis, durante la formación y crecimiento del CL, estén implicados en este fenómeno; por ejemplo, es conocido que la IGF1 (insulina-like growth factor-1) se expresa localmente en el CL, y este factor tiene una importante función en el desarrollo folicular y la producción de P4 (Woad, Baxter, Hogg, Bramley, Webb *et al.*, 2000; Schams, Kosmann, Berisha, Amselgruber, & Miyamoto, 2001). Finalmente, estos resultados confirman la hipótesis de que el CL tiene un efecto localizado sobre la competencia y las características morfológicas de los ovocitos, no obstante, deben realizarse estudios que determinen los factores y mecanismos específicos implicados en este proceso.

#### 4. CONCLUSIONES

Los ovocitos obtenidos de ovarios que tenían un CL tuvieron mayores dimensiones, y según la determinación de la enzima G6PD, fueron más competentes. Nuevos estudios deben ser realizados para determinar los mecanismos del CL que influyen la competencia ovocitaria y la posterior producción de embriones.

**REFERENCIAS**

- Alvares, P., Sarapião, F., Zamparone, L., Rafagnin, L. S., Marcondes, M. (2016). *In vivo embryo production in cattle*. In: Marcondes, M., Silva-Santos, K., Marinho, L. (Eds.). *Biotechnology of Animal Reproduction*. New York: Nova Science Publisher's, Inc., pp 135-156.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, 42(4), 437-442.
- Ireland, J. J., Murphee, R. L., Coulson, P. B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the Corpus Luteum. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 155-160.
- Khandoker, M. A. M. Y., Atiqah, N. F., Ariani, N. (2017). Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 45(3), 10-16.
- Mermillod, P. (2011). *Gamete and embryo technology. In vitro fertilization*. In: Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier Science & Technology, pp. 1176-1181.
- Penitente-Filho, J. M., Jimenez, C. R., Zolini, A. M., Carrascal, E., Azevedo, J. L., Silveira, C. O., Oliveira, F. A., Torres, C. A. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 86, 148-152.
- Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1987). Follicular populations during the estrous cycle in heifers. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science*, 14, 177-86.
- Reis, A., Staines, M. E., Watt, R. G., Dolman, D. F., McEvoy, T. G. (2002). Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Animal Reproduction Science*, 72(3-4), 137-51.
- Rothchild, I. (1996). The corpus luteum revisited: are the paradoxical effects of RU486 a clue to how progesterone stimulates its own secretion? *Biology of Reproduction*, 55(1), 1-4.
- Schams, D., Kosmann, M., Berisha, B., Amselgruber, W. M., Miyamoto, A. (2001). Stimulatory and synergistic effects of luteinizing hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109, 155-62.
- Shabankareh, H. K., Habibizad, J., Sarsaifi, K., Cheghamirza, K., Jasemi, V. K. (2010). The effect of the absence or presence of a corpus luteum on the ovarian follicular population and serum oestradiol concentrations during the estrous cycle in Sanjabi ewes. *Small Ruminant Research*, 93(2), 180-185.
- Viana, J. H. M., Siqueira, L. G. B., Palhão, M. P., Camargo, L. D. A. (2010). Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(2), 661-674.
- Woad, K. J., Baxter, G., Hogg, C. O., Bramley, T. A., Webb, R., Armstrong, D. G. (2000). Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Journal Reproduction and Fertility*, 120, 293-302.