

**Producción de blastocistos partenogenéticos a partir de ovocitos aspirados de ovarios ovinos con o sin cuerpo lúteo**

**Camila José Cuéllar Del Cid**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Noviembre, 2020

ZAMORANO  
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

# **Producción de blastocistos partenogenéticos a partir de ovocitos aspirados de ovarios ovinos con o sin cuerpo lúteo**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Camila José Cuéllar Del Cid**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2020

# Producción de blastocistos partenogenéticos a partir de ovocitos aspirados de ovarios ovinos con o sin cuerpo lúteo

Presentado por:

Camila José Cuéllar Del Cid

Aprobado:



John Hincapié (Oct 28, 2020 11:21 MDT)

---

John Jairo Hincapié, D.Sc.  
Asesor Principal



---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Director  
Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria



Pablo Juan Ross (Nov 5, 2020 08:55 CST)

---

Pablo Juan Ross, Ph.D.  
Asesor



---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Vicepresidente y Decano Académico



---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Asesor

## **Producción de blastocistos partenogenéticos a partir de ovocitos aspirados de ovarios ovinos con o sin cuerpo lúteo**

**Camila José Cuéllar Del Cid**

**Resumen.** El experimento se llevó a cabo entre enero y marzo del año 2020 en el Laboratorio de Reproducción Animal en la Universidad de California, Davis USA. El objetivo fue evaluar el efecto de la presencia del cuerpo lúteo en los ovocitos aspirados de ovarios de hembras ovinas en diferentes estados del ciclo reproductivo, sobre el desarrollo partenogenético de embriones *in vitro* para determinar el número promedio de ovocitos recolectados por ovario, porcentaje de viabilidad de los ovocitos, porcentajes de clivaje y de blastocistos *in vitro* y la eficiencia del procedimiento. Se utilizaron 158 ovarios provenientes de ovejas de una planta de sacrificio; se obtuvo valores medios de 3.33, 1.24 y 1.52 ovocitos/ovario y los porcentajes de viabilidad fueron de 100, 45.87 y 56.82% para ovarios con cuerpo lúteo, ovarios sin cuerpo lúteo y ovarios de hembras gestantes respectivamente ( $P \leq 0.05$ ); no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en los porcentajes de clivaje con valores de 72.5, 72.0 y 56.0% y en los blastocistos partenogenéticos con valores de 37.93, 44.44 y 42.86% para ovarios con cuerpo lúteo, ovarios sin cuerpo lúteo y ovarios de hembras gestantes respectivamente. En la producción de blastocistos/ovario de los ovarios con cuerpo lúteo presentaron los datos más altos de producción de blastocistos. Se concluye que el efecto de la presencia del cuerpo lúteo en los ovocitos aspirados de ovarios de hembras ovinas en diferentes estados del ciclo reproductivo mejora el desarrollo partenogenético de embriones *in vitro* al evaluar la producción de blastocistos por ovario.

**Palabras clave:** Activación partenogénica, biotecnología, embriones, fertilización *in vitro*.

**Abstract.** The experiment was carried out between January and March of the year 2020 in the Animal Reproduction Laboratory at the University of California, Davis USA. The objective was to evaluate the effect of the presence of the *corpus luteum* in the oocytes aspirated from ovaries of female ovinas in different stages of the reproductive cycle on the parthenogenetic development of embryos *in vitro* to determine the average number of oocytes collected per ovary, percentage of viability of oocytes, cleavage and blastocyst percentages *in vitro* and the efficiency of the procedure. 158 sheep ovaries from a slaughter plant were used; mean values of 3.33, 1.24 and 1.52 oocytes / ovary were obtained and the viability percentages were 100, 45.87 and 56.82% for ovaries with *corpus luteum*, ovaries without *corpus luteum* and ovaries of pregnant females respectively ( $P \leq 0.05$ ); there were no differences ( $P > 0.05$ ) in cleavage percentages with values of 72.50, 72.0 and 56.0% and in parthenogenetic blastocysts with values of 37.93, 44.44 and 42.86% for ovaries with *corpus luteum*, ovaries without corpus luteum and ovaries of pregnant females respectively. In the blastocyst / ovary production of the *corpus luteum* ovaries presented the highest data of blastocyst production. It is concluded that the effect of the presence of the *corpus luteum* in aspirated oocytes from ovaries of female ovinas in different stages of the reproductive cycle improves the parthenogenetic development of embryos *in vitro* when evaluating the production of blastocysts by ovary.

**Key words:** Biotechnology, embryos, *in vitro* fertilization, parthenogenic activation.

# ÍNDICE GENERAL

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Índice General .....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>14</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>15</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>16</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Preparación de la solución de colección de ovarios en el matadero .....	4
2. Preparación del medio de recuperación.....	4
3. Preparación del medio de maduración <i>in vitro</i> .....	5
4. Valores medios de ovocitos extraídos por ovario de ovejas, de acuerdo con la condición fisiológica con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas .....	8
5. Valores medios de ovocitos viables, clivaje, y tasa de blastocistos partenogénéticos de ovejas de acuerdo con la condición fisiológica de ovarios con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas.....	11
6. Valores medios para la eficiencia general del procedimiento en relación con blastocistos partenogénéticos: ovocitos viables; blastocistos partenogénéticos: ovocitos en clivaje y blastocistos partenogénéticos: ovario en ovocitos de ovarios de ovejas de acuerdo con la condición fisiológica de ovarios con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas .....	13

Figuras	Página
1. Replicación 1. Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (a). Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo (b). Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios de ovejas preñadas (c).....	11
2. Replicación 2. Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (a). Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo (b). Blastocistos partenogénéticos provenientes de ovarios de ovejas preñadas .....	12

# 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han visto avances en la biología reproductiva que abren puertas a la innovación con instrumentos nuevos y eficaces, tal es el caso de la biotecnología, tomando importancia en la conservación de especies en peligro de extinción, abriendo camino en el sector ganadero y creando alternativas para almacenar recursos genéticos y muchos más (González-Figueroa y González Molfino 2005). La biotecnología es un conjunto de técnicas que permite aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Palma 2008). Este conjunto de técnicas está relacionado entre sí, ya que hay sinergia entre las técnicas, como por ejemplo la recolección de ovocitos para programas de maduración y aplicarlo a programas de fertilización *in vitro* (FIV).

FIV es un proceso en el que la fecundación de los ovocitos se realiza fuera del cuerpo de la madre, se busca la unión del óvulo con el espermatozoide *in vitro*, es decir, simular todas las condiciones dentro del laboratorio, que se darían dentro del tracto reproductivo. Para la FIV se necesita una hembra donante de ovocitos, debido a que esta técnica es muy especializada y costosa se debe seleccionar un animal que cumpla con los estándares que se proponen para aprovechar al máximo su potencial genético. Se ha demostrado que el cultivo *in vitro* prolonga la gestación y aumenta el peso al nacimiento del cordero (Córdova *et al.* 2008). La aplicación de la FIV en ovejas es una excelente forma de aumentar la eficiencia reproductiva ya que al ser un animal estacional necesita adaptación filogénica para que las crías nazcan en un periodo del año donde puedan adaptarse y sobrevivir. Lo anterior no solo crea beneficios en el área económica, sino que genera una fuente importante de embriones, debido a que los ovocitos ovulados, fertilizados y cultivados *in vitro* rinden entre 60 y 70% de blastocistos (Córdova *et al.* 2008).

La progesterona es una hormona esteroide sintetizada a partir de andrógenos y estrógenos en el interior de varios tipos de células como el cuerpo lúteo, glándula suprarrenal y la placenta. La maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario están controlados por factores intra ováricos como las hormonas esteroides. La progesterona (P<sub>4</sub>) contribuye a la función ovárica normal de los mamíferos y tiene varias funciones críticas durante el desarrollo e implantación del embrión, incluida la receptividad endometrial, la supervivencia embrionaria durante la gestación y la transformación de las células del estroma endometrial en células deciduales y por ende en el mantenimiento de la gestación. Algunas investigaciones han evaluado los efectos de P<sub>4</sub> sobre el desarrollo de ovocitos y embriones, con resultados contradictorios. Sin embargo, se ha demostrado que diferentes concentraciones de P<sub>4</sub> no podrían mejorar las tasas de maduración *in vitro* de vesículas germinales (GV) en complejos de ovocitos- *cumulus* (COC) y ovocitos desnudos de células del *cumulus* (CDO). Los medios de cultivo complementados con P<sub>4</sub> mejoraron significativamente el desarrollo de embriones de ratón. Además, un diseño experimental *in vivo* ha demostrado una alta supervivencia de los blastocistos y las tasas de implantación en ratones tratados con P<sub>4</sub> (Salehnia y Zavareh 2013).

La foliculogénesis es el desarrollo de los folículos, los cuales contienen dentro los ovocitos. Este mecanismo inicia desde su fase primordial y culmina en su fase de dominancia, la cual termina en la ovulación, liberando el ovocito maduro. Todo comienza con el reclutamiento de los folículos primarios, los cuales crecerán bajo el efecto de la hormona folículo estimulante (FSH). Posteriormente, los folículos están compuestos de células de la granulosa que se dividen formando

varias capas y son rodeadas por las células de la teca, permitiendo que se convierta en folículo secundario. En esta etapa se genera una cavidad en las células de la granulosa que se llena de líquido (antro folicular) y terminará rodeando al ovocito; el líquido es principalmente agua, proteínas, y una alta concentración de la hormona Estradiol, que es producida por las células de la granulosa. Estos folículos continúan su crecimiento y luego algunos de ellos serán seleccionados, y aquel que responda a la hormona luteinizante (LH) logrará una dominancia en la onda folicular. Este folículo será llamado dominante, que liberará a su vez la hormona inhibina que impedirá el desarrollo de los demás folículos seleccionados (Hafez y Hafez 2013).

El estradiol que fue producido del folículo dominante desata unos picos de liberación de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis (picos preovulatorios), induciendo la ovulación y luego, a la formación del cuerpo lúteo. Las células de la granulosa con las células de la teca que rodean el folículo se mezclan dando origen al cuerpo lúteo, el cual genera progesterona que servirá para preparar al endometrio para la fecundación. La progesterona paralelamente inhibe la ovulación de los folículos restantes.

La partenogénesis representa la producción de un embrión a partir de un gameto femenino sin la inclusión de un gameto masculino. La partenogénesis busca reanudar la meiosis ya que el ovocito sin activación está detenido en la metafase de la segunda división meiótica (Vallejo *et al.* 2003). Es decir, se busca activar todos los procesos enzimáticos y reanudar la meiosis y activar el proceso de desarrollo en ausencia de fecundación.

El estudio de la partenogénesis permite dar un enfoque solo en la calidad de ovocitos, caso contrario con la fertilización *in vitro* en la cual el macho tiene efecto en los resultados. Otros autores sugieren que los ovocitos con baja competencia en el desarrollo tienen un metabolismo energético más lento que retrasa el desarrollo posterior. Los ovocitos prepuberales alcanzaron la etapa de Metafase I una hora más tarde que los adultos y este retraso crece a medida que avanza la primera división meiótica (Leoni *et al.* 2015).

Los embriones partenogénéticos solo se usan para investigación, no para hacer transferencia a receptoras, tal es el caso en mamíferos, los embriones partenogénéticos no se pueden desarrollar debido a la falta de la impronta genética del lado paterno, por ello, mueren en ovejas a los 35-40 días de gestación. Es decir, que está basado en el desarrollo de células sexuales femeninas que no han sido fecundadas. Los embriones que se formaron en este estudio no cuentan con los genes de las células masculinas y no tienen capacidad de desarrollo a término, por ello se usan solo para investigaciones científicas.

La progesterona parece afectar el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario. Según la investigación, los niveles de progesterona y su relación con los niveles de estrógenos están fuertemente asociados con la calidad y madurez de los ovocitos (Salehnia y Zavareh 2013). El grado de efecto de parte de la hormona será en base a la concentración y a la especie tratada.

Con base en lo anterior, se desarrolló la presente investigación, la cual tuvo como se determinó el efecto de la presencia del cuerpo lúteo en los ovocitos aspirados de ovarios de hembras ovinas en diferentes estados del ciclo reproductivo sobre el desarrollo partenogénético de embriones *in vitro*. Los objetivos específicos de la presente investigación fueron:

- Determinar el número promedio de ovocitos recolectados por ovario, determinar el porcentaje de viabilidad de los ovocitos.
- Determinar los porcentajes de clivaje y de blastocistos partenogenéticos *in vitro* y evaluar la eficiencia del procedimiento.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación tuvo lugar entre enero y julio 2020 en el Laboratorio de Reproducción Animal “Meyer Hall” del Dr. Pablo Juan Ross en el departamento de “Animal Science”, en la Universidad de California, Davis en Estados Unidos. Se encuentra a 14 msnm, y presenta una precipitación anual y temperatura promedio de 105 mm y 4 °C a 27 °C respectivamente.

### Colección de ovarios

Los ovarios se colectaron de la planta de sacrificio y se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9% con 1% de penicilina/ estreptomicina con concentración de 10,000 UI de penicilina y 10 mg/L estreptomicina a 30-35 °C (Cuadro 1).

Cuadro 1. Preparación de la solución de colección de ovarios en el matadero

Ingrediente	Cantidad
Antibiótico Penicilina/Estreptomicina	1%
Agua ultra pura	1000 mL

Almacenar a 30 – 35 °C.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron rápidamente con agua a 37 °C para retirar el excedente de sangre y luego se colocaron en una nueva solución salina en un “beaker”. Se colocó el “beaker” en baño de maría para estabilizar la temperatura a 37 °C.

### Aspiración folicular

La aspiración se realizó utilizando un medio de recuperación (Cuadro 2) y un sistema de vacío. El líquido folicular se depositó en tubos Falcon™ de 15 mL y se colocaron en el termo bloque hasta la búsqueda en el microscopio.

Cuadro 2. Preparación del medio de recuperación.

Ingrediente	Cantidad
TCM-199	20 mL
Penicilina/Estreptomicina	200 µL
Heparina (Stock)	56.5 µL
Suero Fetal Bovino	200 µL
HEPES	0.0119 g

### Recuperación y clasificación de los ovocitos

Todos los ovocitos recuperados se lavaron tres veces y fueron clasificados en cuatro categorías: A, B, C, D. Solo los ovocitos de grado A y B se colocaron en maduración.

Grado A: muchas y compactas capas de células del *cumulus oophorus*, citoplasma homogéneo.  
 Grado B: parcialmente rodeado de células del *cumulus oophorus*, citoplasma homogéneo.  
 Grado C: ovocitos desnudos.  
 Grado D: ovocitos rodeados de fibrina.

### Maduración *in vitro*

Para la maduración *in vitro*, se prepararon placas de 35 mm con cuatro gotas de 70 µL de medio de maduración (Cuadro 3) cubierto con 3.5 mL de aceite mineral, depositando entre 25 a 35 ovocitos por gota dando una proporción entre 2 a 3 µL/ovocito.

Preparación previa de las soluciones stock:

**Ovino (NHPP):** (0.01 mg/mL - 200X) AFP7558C. Se disolvió 0.1 mg de FSH en 10 mL de PBS pre-filtrado (pH 7) con BSA-FAF al 1% p/v (A6003). Alicuotar a 70 µL y se almacenó a -80 °C.

**LH (Sioux):** (3 mg/mL) Sioux 725. Se agregó 3 mg de LH a 1 mL de PBS pre-filtrado (pH 7) con BSA-FAF al 1% W/V (A6003). Se realizaron alícuotas de 15 µL y se almacenó a -20 °C.

**Cisteamina (10 mM; 100X):** Sigma M6500. Se pesó 5.7 mg de cisteamina en 5 mL de TCM-199. Se preparó todo en hielo. Se enfriaron los tubos previamente y el TCM-199 se extrajo directo del refrigerador. Se prepararon alícuotas de 70 µl en condiciones estériles y se almacenó a -20 °C.

Cuadro 3. Preparación del medio de maduración *in vitro*

Ingrediente	Cantidad
TCM-199	4.5 mL
Penicilina/Estreptomicina	50 µL
Suero de oveja en celo (EOS)	500 µL
Ovino FSH (stock 50 ng/mL)	25 µL
Ovino LH (stock 3 µg/mL)	25 µL
Cisteamina	5 µ

Las placas se equilibraron por dos horas en la incubadora antes de colocar los ovocitos. Condiciones de maduración *in vitro*: 24 horas en la incubadora, 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5 °C y saturación de humedad relativa.

### Activación partenogenética

Se prepararon los platos de activación tres horas antes de usar. Se colocó una alícuota de Di-Metil-Amino-Purina (DMAP) sobre la llama hasta que se disolvió. Se prepararon platos de 100 mm que contengan gotas de 50 µL/ por 25 cigotos usando medio de activación o cultivo. Estas son gotas de cultivo. Se cubrieron las gotas con aceite mineral y se colocó el plato en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 38.5 °C.

Se colocaron tres gotas de medio de transporte de ovocitos (SOF-HEPES) y se lavaron los ovocitos a través de cada gota tres veces. Se transfirieron los cigotos a 0.6 mL de hialuronidasa en un tubo de microcentrífuga y se bajó el volumen de hialuronidasa a 100  $\mu$ L verificando que no se hayan aspirado COC (complejo de *cumulus*-ovocitos).

Posteriormente, se colocó el tubo de microcentrífuga en “vortex” en velocidad 7 por 5 minutos y retirándolo cada minuto con el objetivo de retirar las células del *cumulus oophorus*. Se agregó 1 mL de SOF-HEPES al tubo, se mezcló y se retiró los ovocitos, revisando que en el tubo no quedaran ovocitos. Se buscaron la cantidad de ovocitos para activar y se colocó una gota de SOF-HEPES en la cual se lavaron tres veces.

Luego se utilizó un tubo de 1.5 mL, se agregó 1  $\mu$ L de ionomicina y 1 mL de SOF-HEPES y se mezclaron. Se colocaron los ovocitos en 1 gota de la mezcla de ionomicina / SOF-HEPES y se dejaron reposar durante 4 minutos en oscuridad total. Pasado este tiempo se lavaron los ovocitos tres veces en gotas de SOF-HEPES y una vez en BO-IVC + DMAP, luego, se separaron en grupos en platos de BO-IVC + DMAP.

Se procedió a incubarlos en un plato con medio KSOM + DMAP durante 4 horas. Después del tiempo transcurrido se lavaron los ovocitos nuevamente en tres gotas de SOF-HEPES y una vez en BO-IVC + BSA.

### **Cultivo de embriones *in vitro***

Se preparó el medio de cultivo tres horas antes de usar. Se prepararon platos petri de 60 mm que contenían gotas de 50  $\mu$ L de medio de cultivo/25 cigotos y se cubrieron con aceite mineral y después se colocaron los platos en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5 °C y saturación de humedad relativa.

Se transfirieron los cigotos a una placa de cultivo que contenía 50  $\mu$ L de medio de cultivo cubierto de aceite mineral. Se colocó el plato en una cámara y se reemplazó el gas dentro de la cámara con una mezcla de aire de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> durante 2 minutos y luego se colocaron nuevamente en la incubadora a 38.5 °C.

En el día 3 del cultivo, se suplementó con 2.5  $\mu$ L de Suero Fetal Bovino/gota de cultivo calificado de células madre (Gemini Bio 100-525). En el día 7 se evaluó la formación de blastocitos.

### **Tratamientos**

Se desarrollaron tres tratamientos:

Tratamiento 1: ovocitos provenientes de ovarios de ovejas con cuerpo lúteo presente.

Tratamiento 2: ovocitos provenientes de ovarios de ovejas en estado de anestro (sin cuerpo lúteo).

Tratamiento 3: ovocitos provenientes de ovarios de ovejas gestantes.

Las variables analizadas fueron:

- Promedio de ovocitos recolectados por ovario.

- Porcentaje de viabilidad de los ovocitos según número de capas de células del *cumulus oophorus* y la homogeneidad del citoplasma.
- Porcentaje de clivaje a las 72 horas.
- Porcentaje de blastocistos partenogenéticos.
- Eficiencia general.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos y dos repeticiones por tratamiento. Los valores porcentuales fueron analizados utilizando la prueba de distribución de frecuencias Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ); para los valores numéricos de ovocitos extraídos y número de ovocitos/ovario se utilizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) aplicando el Modelo General Lineal (GLM por sus siglas en inglés) y la prueba de rangos múltiples de Duncan, con un valor de significancia exigido de  $P \leq 0.05$ , utilizando el programa “Statistical Analysis Systems” (SAS<sup>®</sup> 2012).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Ovocitos recolectados por ovario

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 4) siendo el tratamiento de los ovarios aspirados con cuerpo lúteo el que obtuvo el mayor número de ovocitos aspirados superando a los tratamientos de ovarios sin cuerpo lúteo y ovarios de hembras preñadas en 2.09 y 1.81 ovocitos/ovario respectivamente. Estos resultados se atribuyen a que al presentar el ovario el cuerpo lúteo tiene como principal acción la producción de la hormona progesterona, la cual tiene efecto en el desarrollo folicular ya que se encarga de inhibir al folículo dominante, por lo tanto, al generar a la regresión del folículo dominante se crea una nueva onda de desarrollo folicular (Hafez y Hafez 2013). Las ovejas presentan una o dos ovulaciones por ciclo y esta variación depende de la genética, edad, estación y nutrición. En este estudio se tomaron ovarios provenientes de un matadero donde se desconoce la edad de las ovejas, pero se conoce que fueron llevadas al matadero en época de días cortos durante el mes de enero, donde presentan mayor ciclicidad y prolificidad (Hafez y Hafez 2013).

En el presente trabajo se obtuvo una tasa de recuperación de 2.03 ovocitos por cada ovario al efectuar un promedio entre los tres tratamientos, estos resultados son inferiores a los realizados por Hernández *et al.* (2018) quienes obtuvieron una tasa de recuperación de 4.2 ovocitos por cada ovario. Al realizar un análisis de los datos promediados se toman en cuenta que ambos estudios fueron realizados en ovarios de ovejas provenientes de sacrificio y en ambos estudios se utilizó la técnica de aspiración folicular, pero se atribuyen las diferencias a que en el presente trabajo las colectas de ovarios fueron menos ya que únicamente se realizaron tres en comparación con Hernández *et al.* (2018) quienes realizaron 10 colectas. Los ovarios utilizados en la investigación de Hernández *et al.* (2018) fueron de razas desconocidas y de edades diferentes, sin embargo, se tomaron en ambos estudios los ovocitos que presentaron grados A y B.

Un factor fundamental para la selección de ovocitos ovinos es realizar una minuciosa selección de estos en pro (células del *cumulus oophorus* y citoplasma homogéneo) de la maduración *in vitro*, con el fin de obtener resultados óptimos en el desarrollo embrionario *in vitro*.

Cuadro 4. Valores medios de ovocitos extraídos por ovario de ovejas, de acuerdo con la condición fisiológica con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas.

Tratamiento	# de ovarios	# de ovocitos extraídos	# de ovocitos/ovario
Con cuerpo lúteo	12	40	3.33 <sup>a</sup>
Sin cuerpo lúteo	88	109	1.24 <sup>b</sup>
Preñadas	58	88	1.52 <sup>c</sup>
Probabilidad			<0.0001
Coefficiente variación			30.83

<sup>abc</sup> Valores medios en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )

### **Porcentaje de viabilidad**

Hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 5) siendo el tratamiento de los ovarios aspirados con cuerpo lúteo el que obtuvo el mayor número de ovocitos viables superando a los tratamientos de ovarios sin cuerpo lúteo y ovarios de hembras preñadas en 54.13% y 43.2% de viabilidad respectivamente. La viabilidad de los ovocitos está relacionada con la capacidad que tienen los ovocitos de generar un embrión, los ovarios con cuerpo lúteo presentan un alto porcentaje de viabilidad. A mayor progesterona circulante, las concentraciones promueven el recambio folicular y con la nueva ola de desarrollo folicular ovárico, resulta en ovocito viable que se libera (Menchaca *et al.* 2018). Según estudios realizados por Menchaca *et al.* (2018) mencionan que al afectar la competencia de los ovocitos con progesterona estos generaron embriones viables. Lo que se atribuye a que los resultados de la presente investigación al comparar los tratamientos, los ovarios con cuerpo lúteo hayan dado resultados mayores que los otros tratamientos.

En la presente investigación se tomaron ovocitos con muchas y compactas capas de células del *cumulus oophorus* y citoplasma homogéneo que es un indicador de ovocitos de alta calidad, es decir, que serán viables para la producción de embriones *in vitro* y según un estudio realizado por Córdova *et al.* (2008). Los folículos mayores de 3 mm tienen más capas de *cumulus* lo que genera una mejor maduración *in vitro*, siendo un aspecto importante para tener en cuenta para seleccionar ovocitos al final de su fase de crecimiento. Esto se atribuye a que los ovocitos tendrán nutrientes y energía para poder desarrollarse mejor en comparación con otros que sean grado C y B, ya que estos ovocitos se descartan por no poseer suficientes capas de *cumulus oophorus* siendo no aptos para su uso en producción de embriones.

Según Lonergan (1994) la calidad del ovocito está basada en diferentes aspectos como el estado fisiológico y reproductivo de la donante, el tamaño folicular y la amplitud e integridad de las células del *cumulus*. En este estudio se conoce la amplitud e integridad de las células del *cumulus* y estas jugaron un papel importante para la maduración de los ovocitos ya que brindan energía y nutrientes al ovocito, en este estudio se seleccionaron ovocitos con capas de *cumulus* de alta calidad lo que se atribuye a que los resultados hayan brindado un porcentaje mayor al 50%.

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios permite la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis (Chávez 2017). Al analizar los tres tratamientos, se observa que los ovocitos provenientes de los ovarios con cuerpo lúteo sobresalieron ya que al momento de seleccionarlos todos fueron viables y estos resultados se atribuyen al momento de la observación en microscopio presentaron buena morfología, es decir, los ovocitos estaban rodeados de muchas y compactas células de *cumulus oophorus* y citoplasma homogéneo.

### **Porcentaje de clivaje**

Las diferencias encontradas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 5) superando todos los tratamientos el 50% de clivaje. Estos resultados son buenos debido a que en todos los tratamientos se muestra que presentaron clivaje mayor al 50% lo que puede significar mejores resultados para la formación de un blastocisto viable.

El progreso de las divisiones de clivaje se ve influenciado por factores ambientales y genéticos (Hafez y Hafez 2013). En este estudio se colectaron ovarios de ovejas que se desarrollaron en ambientes óptimos y se conoce la fecha en la cual entraron al sacrificio y estuvieron ovulando en una estación que presenta días cortos que favoreció la ovulación.

El clivaje de ovocitos es importante ya que significa que al estarse dividiendo las células se puede llegar a la creación de blastocisto (Hafez y Hafez 2013). En este estudio se buscó analizar la producción de blastocistos activados por partenogénesis que van ligados al clivaje de los ovocitos. Al analizar los resultados (Cuadro 5) se determina que los ovocitos independientes del tratamiento presentaron un clivaje superior al 50% pero no se obtuvo un efecto que diferencie si un tratamiento es significativo en comparación con los otros, lo que genera que independientemente de la selección en diferente estado reproductivo en ovinos, la obtención del clivaje no se verá influenciada por ello. De igual manera, pese a que el tratamiento de ovocitos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo presentó la mayor viabilidad, este efecto no se vio reflejado ni se mantuvo en el clivaje.

### **Porcentaje de blastocistos partenogénéticos**

No hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 5) superando en general todos los tratamientos el 35% de producción de blastocistos partenogénéticos (Figuras 1 y 2). Según estudios realizados por Menchaca *et al.* (2018) se han establecido las tendencias de producción de blastocistos, siendo el 50% de los ovocitos los que llegan a generar blastocistos. Al comparar con el presente estudio, se obtuvieron resultados inferiores (27.85%) a los obtenidos por Menchaca *et al.* (2018) de 50% de blastocistos. Lo que se atribuye a que independiente de la selección de los ovarios según su estado reproductivo no se verá afectada la producción de blastocistos. Al observar los resultados (Cuadro 5) todos los tratamientos presentaron un porcentaje de producción de blastocistos similar.

Al cultivar *in vivo* los ovocitos fertilizados rinden entre 60 y 70% de blastocistos, pero cuando son usados los blastocistos madurados *in vitro* la tasa de desarrollo es de 50% según un estudio realizado por Córdova *et al.* (2008). Si el objetivo es generar la mayor cantidad de blastocistos es necesario seleccionar ovocitos competentes para la maduración *in vitro*, fertilización y desarrollo, cumpliendo con esta condición solo los ovocitos grado A y B, sin embargo, esto varía mucho dependiendo de la genética y del ambiente. En este estudio se obtuvieron porcentajes de blastocistos inferiores a los obtenidos por Menchaca *et al.* (2018) para la especie ovina, de alrededor del 27.85%.

Los embriones producidos por partenogénesis se utilizan con el fin de generar información de alta calidad para mejorar las técnicas de producción de pequeños rumiantes como son las ovejas ya que se debe tomar en cuenta que se evalúa solo la capacidad reproductiva de las hembras ovinas y al momento de realizar la selección los ovocitos se deben tener primordial cuidado ya que eso afectará todo el proceso.

Según estudios de Zhu *et al.* (2018) demostraron que los avances en la producción *in vitro* en ovejas por nuevas técnicas han mejorado todo el proceso para obtener ovocitos de calidad. Al no haber estudios realizados en ovinos se decide comparar con el estudio realizado por Lonergan (2011) quien al evaluar la P<sub>4</sub> en bovinos menciona que la progesterona puede afectar indirectamente a la

calidad del ovocito a través de sus efectos sobre la pulsatilidad de la LH y el desarrollo de un folículo dominante persistente. Al comparar estos resultados con la presente investigación no hay diferencias significativas con el cuerpo lúteo que genera progesterona para afectar la producción de blastocistos.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten descartar la separación de los ovarios según su estado reproductivo, es decir, si posee o no poseen cuerpo lúteo, generando una manera más sencilla de realizar todo el protocolo para la fertilización *in vitro*.

Cuadro 5. Valores medios de ovocitos viables, clivaje, y tasa de blastocistos partenogenéticos de ovejas, de acuerdo con la condición fisiológica de ovarios con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas.

Tratamiento	# ovocitos viables (%)	# ovocitos clivaje (%)	# blastocistos (%)
Con cuerpo lúteo	40 (100%) <sup>a</sup>	29 (72.5%)	11 (37.93%)
Sin cuerpo lúteo	50 (45.87%) <sup>b</sup>	36 (72.0%)	16 (44.44%)
Preñadas	50 (56.82%) <sup>b</sup>	28 (56.0%)	12 (42.86%)
Probabilidad	<0.0001	0.15	0.86
Coefficiente de variación	12.37	14.06	20.35

<sup>ab</sup> Valores medios en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ( $P \leq 0.05$ )

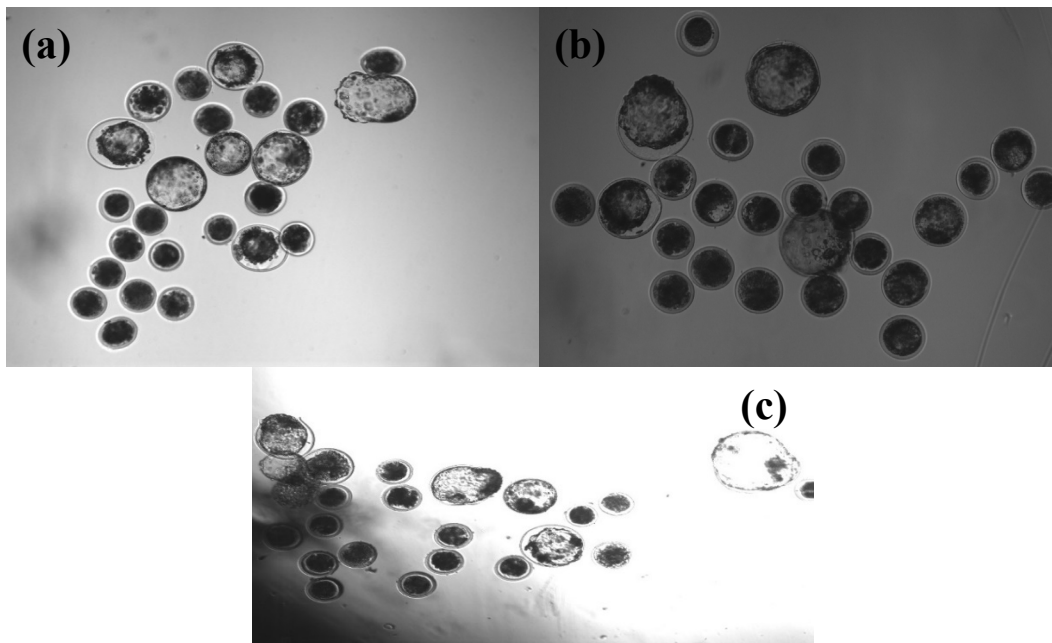


Figura 1. Replicación 1. Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (a). Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo (b). Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios de ovejas preñadas (c).

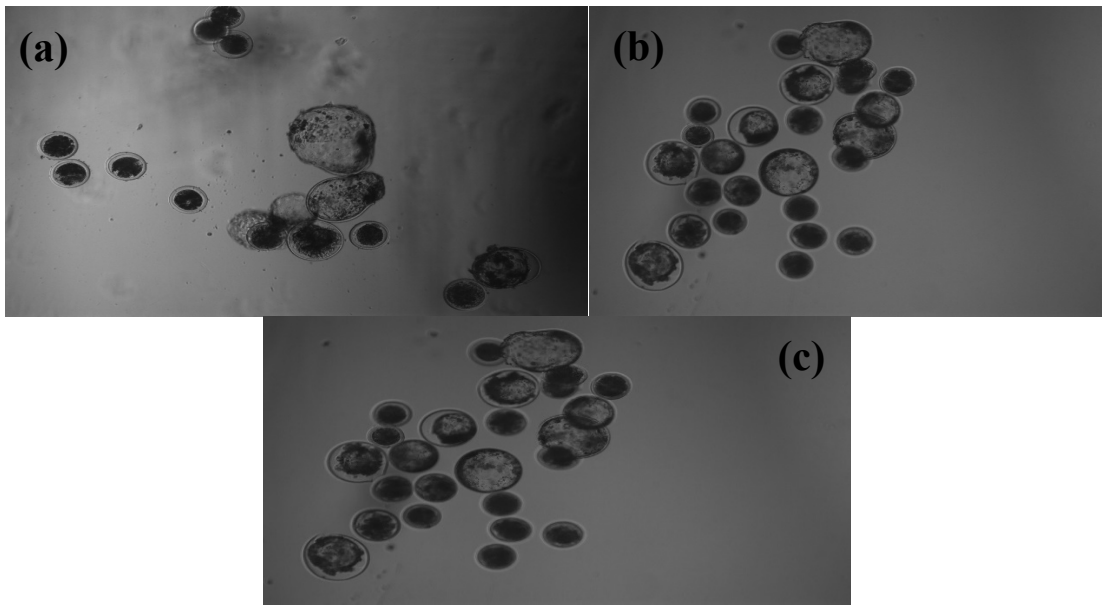


Figura 2. Replicación 2. Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (a). Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo (b). Blastocistos partenogenéticos provenientes de ovarios de ovejas preñadas.

### **Eficiencia general**

Las diferencias encontradas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) para las relaciones entre el número de blastocistos partenogenéticos producidos de acuerdo con los ovocitos viables recolectados, número de blastocistos partenogenéticos producidos con los ovocitos en clivaje, sin embargo, para la relación blastocistos partenogenéticos producidos por ovario sí hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), siendo el tratamiento con cuerpo lúteo el que obtuvo los mayores valores superando a los tratamientos sin cuerpo lúteo y preñadas en 73.48 y 70.98% respectivamente (Cuadro 6), lo que demuestra que la etapa fisiológica en la que se encuentra el ovario al momento de ser aspirado, si influye en la cantidad de ovocitos aspirados, la viabilidad y el número de blastocistos partenogenéticos obtenidos.

Todos los tratamientos usados en el presente trabajo están relacionados de manera directa al ovario, esta es una medida importante al momento de producir embriones ya que un aspecto fundamental es contar con una buena cantidad de ovarios viables y aptos para poder producir embriones, ya que uno de los objetivos de la producción de embriones partenogenéticos es obtener información más precisa acerca de cómo está funcionando el sistema de producción *in vitro* de embriones en cada laboratorio. Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos, lo más recomendable sería aspirar solo ovarios que presenten cuerpo lúteo, sin embargo, la dificultad radicaría en poder adquirir exclusivamente esta condición, ya que en las plantas de faenado las ovejas ingresan indistintamente en cualquier etapa del ciclo estral, sin embargo, otra alternativa sería realizar procesos de sincronización de celos previos al sacrificio o a la aspiración folicular guiada por laparoscopia, logrando así que un grupo de ovejas puedan tener cuerpo lúteo como estructura dominante en sus ovarios al momento de la aspiración.

La calidad del ovocito es uno de los factores que más afectan el rendimiento y la producción de blastocistos (Rizos *et al.* 2002). La calidad del ovocito está influenciada por muchos factores, sin embargo, uno de los principales es la clasificación correcta de los ovocitos, ya que al utilizar únicamente los de clase A y B, y descartando todos los de clase C y D, se puede esperar un mejor desarrollo y competencia de los ovocitos en el proceso de maduración y fertilización *in vitro*, lo que significaría un mayor porcentaje de blastocistos.

Los ovinos son pequeños rumiantes y su eficiencia reproductiva depende de la aplicación de la biotecnología reproductiva. La aspiración de ovocitos es una biotecnología aplicada pero los folículos y ovocitos recuperados varían dependiendo de la raza, edad y prolificidad de las hembras (Hernandez *et al.* 2018). Según este estudio, usar la técnica de aspiración folicular es una manera sencilla y eficaz de recolección de ovocitos; la punción folicular en ovarios de ovejas es una técnica que ha tenido auge y permite manejar los ovocitos de mejor forma, logrando mejoras en la técnica FIV (Zhu *et al.* 2018).

Cuadro 6. Valores medios para la eficiencia general del procedimiento en relación con blastocistos partenogenéticos: ovocitos viables; blastocistos partenogenéticos: ovocitos en clivaje y blastocistos partenogenéticos: ovario en ovocitos de ovarios de ovejas de acuerdo con la condición fisiológica de ovarios con cuerpo lúteo, sin cuerpo lúteo y preñadas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Blastocistos: ovocitos viables (%)</b>	<b>Blastocistos: ovocitos en clivaje (%)</b>	<b>Blastocistos: ovario (%)</b>
Con cuerpo lúteo	11:40 (27.50%)	11:29 (37.93%)	11.12 (91.66%) <sup>a</sup>
Sin cuerpo lúteo	16:50 (32.0%)	16:36 (44.44%)	16.88 (18.18%) <sup>b</sup>
Preñadas	12:50 (24.0%)	12:28 (42.86%)	12.58 (20.68%) <sup>b</sup>
Probabilidad	0.67	0.86	<0.0001
Coefficiente de variación	14.40	8.12	17.60

<sup>ab</sup> Valores medios en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí  $P \leq 0.05$ .

#### 4. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio el mayor número de ovocitos recolectados por ovario se obtuvo de los ovarios con presencia de cuerpo lúteo.
- El mayor porcentaje de viabilidad de los ovocitos recolectados se obtuvo de los ovocitos aspirados de ovarios con presencia del cuerpo lúteo.
- Los porcentajes de clivaje y blastocistos partenogénéticos fueron similares para los tres grupos estudiados.
- La mejor eficiencia en el número de blastocistos partenogénéticos obtenidos / ovario se obtuvo de los ovarios con cuerpo lúteo aspirados de hembras ovinas.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Desarrollar investigaciones evaluando diferentes concentraciones y volúmenes de suero de oveja en celo.
- Desarrollar investigaciones evaluando ovocitos aspirados de ovarios ovinos en diferentes épocas del año.
- Comparar el medio de maduración con suero de oveja en celo con otros medios de maduración.

## 6. LITERATURA CITADA

- Chávez J. 2017. Efecto del suero de oveja súper ovulada sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de ovino [Tesis]. Universidad del Altiplano, Puno-Perú. 91 p.
- Córdova A, Córdova M, Córdova C, Guerra J. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria*. 19(1): 67-79.
- González-Figueroa H, González Molfino HM. 2005. Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*. 5: 5-11. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.886>.
- Hafez B, Hafez E. 2013. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. New Delhi, India. Lalit Printer & Binder. 509 p. ISBN: 978-81-265-4078-5.
- Hernández S, Navarro M, Ambríz D, Vazquez J, Hernández J. 2018. Principales alteraciones morfológicas en ovocitos de ovino madurados *in vitro*. *Revista de Salud Animal*. 40(3): 1-6.
- Leoni G, Palmerini G, Satta V, Succu S, Pasciu V, Zinellu A, Carru C, Macchiarelli G, Nottola S, Naitana S, Berlinguer F. 2015. Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PLoS ONE*. 10(4): e0124911. doi: 10(4):1-25. 10.1371/journal.pone.0124911.
- Lonergan P. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction Development*. 37(1): 48-53. doi: 10.1002/mrd.1080370107.
- Lonergan P. 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*. 76(9): 1594-1601. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.012.
- Menchaca A, Cuadro F, Dos Santos-Neto P, Bosolasco D, Barrera N, de Brun V, Crispo M. 2018. Oocyte developmental competence it is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. *Animal Reproduction Science*. 195(1): 321-328. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.06.010.
- Palma G. 2008. *Biotecnología de la Reproducción*. 2da edición. Ed. Repro-Biotec. Mar del Plata, Argentina. 669 p.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, 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. *Molecular Reproduction Development*. 61(2): 234-248. doi: 10.1002/mrd.1153.

SAS® (Statistical Analysis Institute Inc). 2013. Statistical Analysis System 9.4 for Windows Standard version users Guide.

Salehnia M, Zavareh S. 2013. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 7(2): 74-81.

Vallejo J, Gómez V, Tarín JJ. 2003. Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Revista Iberoamericana de la Fertilidad*. 20(3): 177-187.

Zhu J, Moawad AR, Wang CY, Li HF, Ren JY, Dai YF. 2018. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6:15-26. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.