



PRÁCTICA 02

RECUPERACION, EVALUACION Y MANIPULACION DE LOS OVOCITOS

Las hembras bovinas adultas pueden tener patrones de 2 ó 3 ondas foliculares por ciclo estral. En ambos patrones, la emergencia de la primera onda folicular ocurre el día de la ovulación (día 0). La emergencia de la segunda onda ocurre el día 9 ó 10 para ciclos con dos ondas y el día 8 ó 9 para ciclos de 3 ondas. La emergencia de la tercera onda ocurre en el día 15 ó 16.

El periodo gestacional, prepuberal y de anestro estacional están caracterizados por pulsos de FSH regulares y periódicos y por la emergencia de ondas foliculares no ovulatorias.

La maduración del ovocito es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito avanza del diploteno (profase I) a metafase II (maduración nuclear). La transición del estado de diploteno a la metafase es denominado "diacinesis". El ovocito reanuda la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH o al retirar el ovocito del folículo.

La maduración del ovocito también involucra transformaciones a nivel del citoplasma que prepara a la célula para soportar la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática). La maduración nuclear por sí sola, no garantiza el subsiguiente desarrollo embrionario.

La replicación exitosa en laboratorio de los procesos involucrados en la maduración ovocitaria, nuclear y citoplasmática, es clave para desarrollar programas de producción *in vitro* de embriones. Comprender los mecanismos que repercuten sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos es un paso imprescindible para poder aprovechar el potencial de uso de donadoras prepúberes en dichos programas, lo cual tendría un gran impacto en la aceleración de la ganancia genética.

Objetivos.

- Capacitar al alumno en la obtención de ovocitos de ovarios de matadero
- Determinar la calidad de ovocitos en el proceso de fecundación *in vitro*.



Materiales.

En coordinación profesor-alumnos los materiales necesarios serán aportados por los alumnos para la ejecución de esta práctica:

- Ovarios de camal de Vaca, oveja o Marrana (2 unidades por alumno)
- Vaso de precipitado x 200 cc (01 unidad)
- Solución Fisiológica (NaCl 0.9%) 1 litro
- Jeringa de 5 ml y agujas de 18 x 1^½ (1 unidad por alumno)
- Placas petri de 100 mm y placa petri de 35 mm (5 o 6 unidades)
- Guantes quirúrgicos (1 par / alumno)
- Pipeta pasteur (2 unid/alumno)
- Una Pinza (1 unid/grupo)
- Papel Toalla (01 rollo/grupo)
- Estereoscopio y microscopio

Metodología

Los ovarios obtenidos en el matadero serán trasladados en un recipiente isotérmico (termo) al laboratorio. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio debe ser menos de 6 a 8 horas.

Una vez en el laboratorio los ovarios serán lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución (Figura 1b).

Cada alumno deberá colocarse los guantes quirúrgicos en la mano izquierda con la cual sujetara el ovario secándola previamente con papel toalla y con la otra mano libre sujetara la jeringa y procederá a aspirar el contenido de los folículos. Los COCs (complejo ovocito-cúmulos) serán aspirados por punción de los folículos de tamaño entre 3 a 8 mm con una jeringa de 5cc y aguja de 18 x 1^½. El contenido folicular colectado en la jeringa será vertida en la placa petri de 100mm y diluida con solución fisiológica de 0,9% de NaCl, con el fin de visualizados.

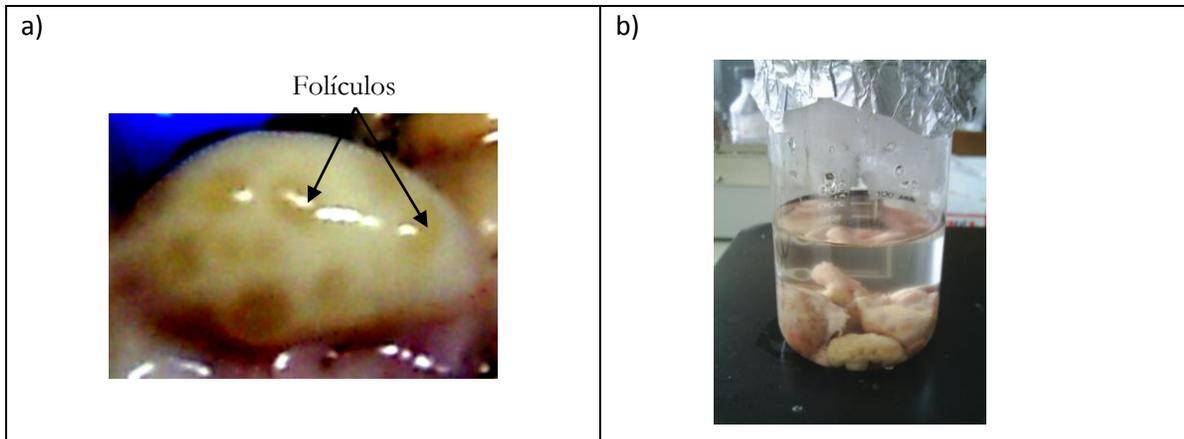


Figura 1: a) Ovario con varios folículos visibles y b) Ovarios de matadero mantenidos en solución fisiológica (0,9% NaCl), durante la aspiración folicular.

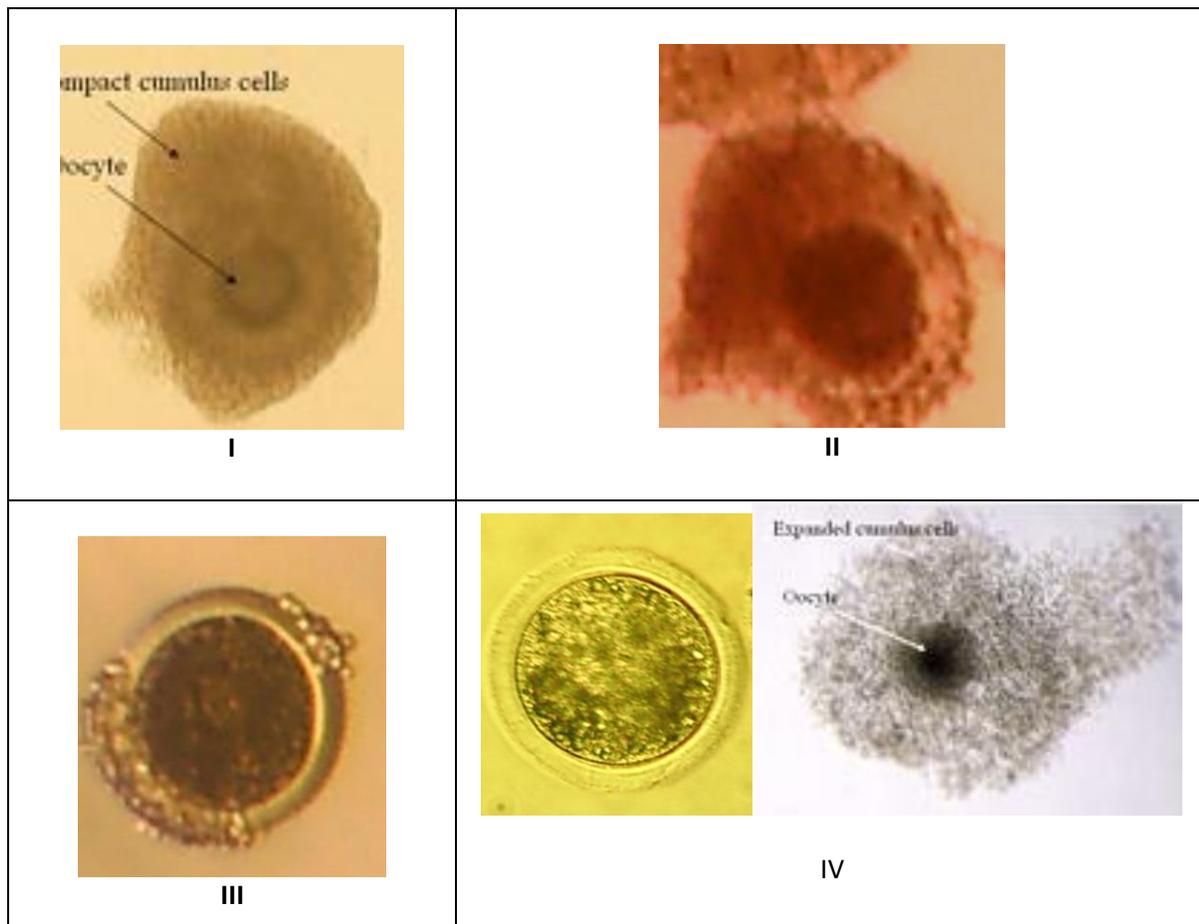
Los COC's serán visualizados bajo un microscopio estereoscopio entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm, para ser clasificados según la calidad.

Los COCs serán evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (De Loos y col., 1989):

DE LOOS, F., C. VAN VLIET, P. VAN MAURIK, A.M.T. KRUIP. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24(2): 197–204

- (1) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cumulus con citoplasma homogéneo, eventualmente granulado
- (2) ovocitos rodeados con < 3 capas de células del cumulus y citoplasma generalmente homogéneo,
- (3) ovocitos desnudos y citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras y
- (4) ovocitos con cumulus expandido y/o citoplasma irregular.

Los COC's se clasificarán como viables (calidad I y II) y no viables (calidad III y IV), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.



Información a Revisar

Foliculogénesis y Ovogénesis

Foliculogénesis es el proceso de crecimiento que experimenta el folículo desde el momento que deja la población de reserva, constituida por folículos primordiales, hasta su ovulación o atresia.

Los folículos son reclutados continuamente hasta que la reserva se termina.

Los folículos se clasifican en:

- Folículos primordiales
- Folículos preantrales (folículos primarios y secundarios)
- Folículos antrales y preovulatorios.

Folículos primarios

En el bovino son activados aproximadamente al día 140 de la gestación

Los ovocitos tienen un tamaño de 30 μm y está rodeado de células de la granulosa cuboidales

Los ovocitos de folículos primordiales y primarios no se observan diferencias de tamaño.

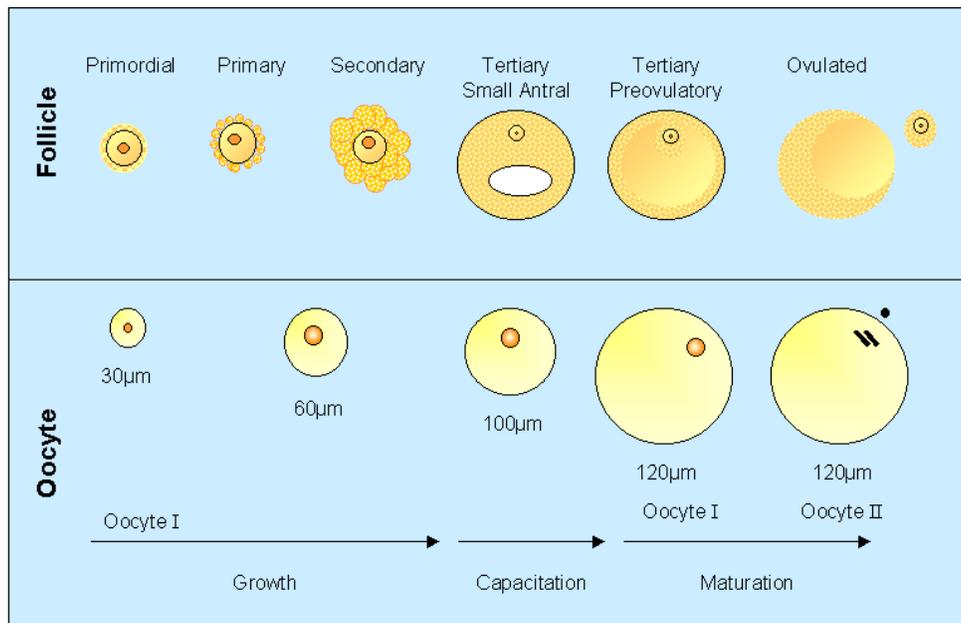


Figura 2: Representación esquemática del crecimiento, capacitación y maduración del ovocito bovino a través de la foliculogénesis.

Folículos secundarios

Aparecen al día 210 de gestación en la bovino, cuando las células foliculares están en plena división mitótica. Los folículos secundarios contienen aproximadamente 2 capas de células y el ovocito mide entre 50 a 60 μm de diámetro

Folículos terciarios

Los folículos terciarios o antrales son caracterizados por la presencia de cavidad conocida como antro. El antro es una cavidad llena de fluido folicular. El antro es detectado cuando el folículo tiene entre 0,12 y 0,28 mm de diámetro.

Los primeros folículos antrales aparecen alrededor de día 230 de gestación en el bovino, estos presentan un extenso número de células que se unen por uniones gap para transferir nutrientes y señales de regulación en el ovocito y la célula de la granulosa.



El crecimiento folicular se produce en ondas, ver figura 3

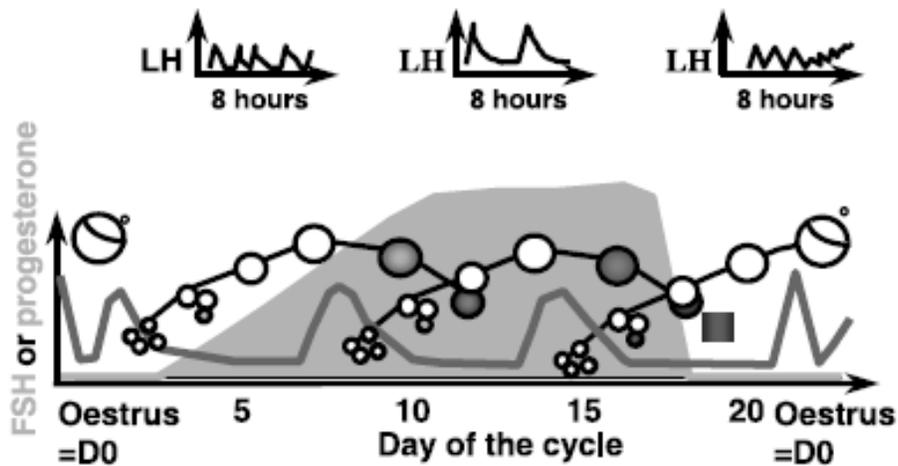


Figura 3: Diagrama de dinámica folicular en vacas

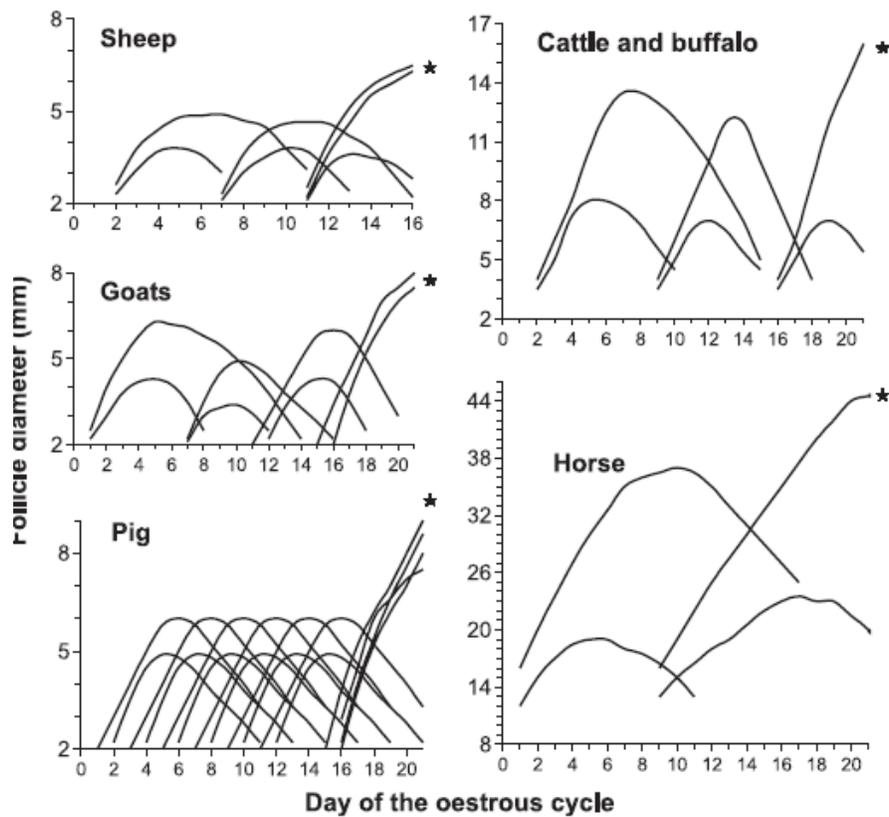
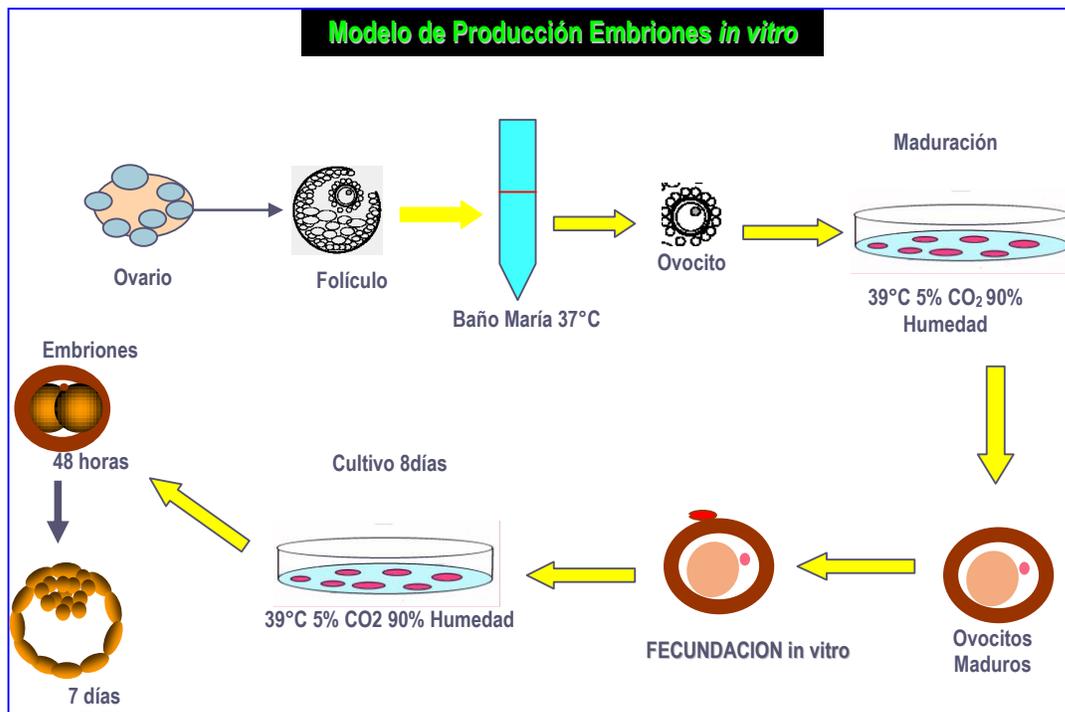


Figura 4: Patrones de onda Folicular en mamíferos



Desde el punto de vista biológico, el establecimiento de la fecundación *in vitro* es una alternativa valiosa para la investigación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las interacciones gaméticas, fecundación y desarrollo embrionario temprano.

Es bien conocido que los cigotos pueden ser co-cultivados *in vitro* con células oviductales o en el medio previamente condicionado por estas células desarrollando hasta un 30% a blastocistos, no obstante, la capacidad de implantación de los mismos es variable luego de la transferencia en vacas receptoras.

Tabla 1: Efecto de la duración de *in vitro* maduración (IVM) en el desarrollo embrionario de ovocitos (Park y col., 2005)

IVM duración (hrs)	n	Desarrollo de ovocitos (%)		
		≥ 2 cel	8 cell	Blastocistos
16	210	64.3	26.2	19.0
18	240	65.0	36.7	30.0
20	270	66.7	28.1	20.0
22	225	60.9	24.4	14.7
24	240	66.7	22.1	13.8



Tabla 2: Numero de células en blastocistos producidos en in vivo o IVM (18h y 24h) (Park y col., 2005)

Fuente del embrión	IVM duración (hrs)	n	Nro de células (%)		
			Total	Masa interna de células	Trofoblasto
In vivo	--	12	127.5±1.6 (100)	40.0±3.8 (31.4)	87.5±3.5 (68.6)
In vitro	18	20	129.8±7.3 (100)	33.4±2.7 (25.7)	96.5±6.4 (74.3)
	24	19	112.2±4.0 (100)	32.1±2.8 (28.6)	80.1±3.6 (71.4)

PARK Y-S., S-S. KIM, J-M. KIM, H-D. PARK, M-D. BYU. 2005. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 64 (2005) 123–134

Cuestionario:

1. ¿Como reconoció los COCs con el microscopio estereoscópico?, dibuje algunos de ellos.
3. Desarrollar los siguientes ítems.
 - a) Métodos de recuperación de ovocitos
 - b) Sistemas de clasificación de ovocitos
 - c) Reanudación de la meiosis
 - d) Crecimiento folicular en hembras prepuberes y gestantes
 - e) Fases del ciclo celular
 - f) Diferencias entre folículo primario, secundario y terciario