

Diámetro de folículos determinado con ultrasonido en ovarios de bovino obtenidos en matadero

Filiberto Fernández Reyes^{1*}, Esmeralda Mónica Peña González ¹
y Lucio Santos Ventura ¹

Resumen. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el diámetro de los folículos presentes en ovarios de vacas Holstein, colectados en matadero, mediante una regla métrica y ultrasonido para verificar si la observación externa de los folículos en los ovarios corresponde con su diámetro interno. En la producción de embriones de bovino *in vitro* en general se puncionan folículos de 3 a 6 mm de diámetro para obtener los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs), en estudios realizados por diversos autores se ha observado una gran diferencia en la competencia de desarrollo de los ovocitos colectados. Los resultados obtenidos en 148 ovarios, fueron clasificados en: ovarios izquierdos 74, con un tamaño promedio de 3.37+0.74 cm de largo y 1.75+0.48 cm de ancho, el diámetro de los folículos evaluados con regla métrica en promedio fue 0.41+0.10 cm, la medida correspondiente a ultrasonido fue en promedio 0.51+0.21 cm. En 22 ovarios izquierdos se observó la presencia de un cuerpo lúteo y en uno se presentaron dos cuerpos lúteos. En los ovarios derechos 74, con un tamaño promedio de 3.56+0.77 cm de largo y 1.77+0.47 cm de ancho, el diámetro de los folículos evaluados con regla métrica en promedio fue 0.40+0.09 cm, la medida correspondiente a ultrasonido fue en promedio 0.50+0.18 cm. En 24 ovarios derechos se observó la presencia de un cuerpo lúteo y en dos se presentaron dos cuerpos lúteos. En 17 ovarios izquierdos y 17 derechos no se observó ninguna estructura. Se concluye que el procedimiento de medición del diámetro folicular mediante regla métrica y ultrasonografía presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) en ovarios de bovino obtenidos en matadero y permitió confirmar que el diámetro de los folículos es similar para los folículos de ovarios izquierdos y derechos ($P < 0.05$). La evaluación de la maduración *in vitro* de 36 ovocitos obtenidos de ovarios izquierdos fue de 88.8% y en 35 ovocitos provenientes de ovarios derechos fue de 88.5% ($P > 0.05$), por lo que es factible la obtención de ovocitos de buena calidad para su maduración *in vitro* por ambos métodos y ambos ovarios.

¹ Laboratorio Manejo de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X)

* e-mail: freyes@correo.xoc.uam.mx.

Palabras Clave: Folículo, Diámetro, Bovino, Maduración *in vitro*.

Abstract. The objective of this study was to determine the diameter of the follicles present in ovaries of Holstein cows collected on slaughterhouse, using a metric rule and ultrasound, to verify whether the external observation of the follicles in the ovaries corresponds to the internal diameter of follicles. In general follicles of 3 to 6 mm in diameter are punctured to obtain the complex oocyte cells cumulus (COCs), a great difference has been observed in the competence of development of the oocytes collected in the production of *in vitro* bovine embryos in studies carried out by different authors. The results obtained in 148 ovaries, were classified in: 74 left ovaries, with an average size 3.37 ± 0.74 cm in length and 1.75 ± 0.48 cm in width, the follicles diameter average with metric rule was 0.41 ± 0.10 cm, the measurement corresponding to ultrasound was 0.51 ± 0.21 cm. A corpus luteum was observed in 22 left ovaries and in one there were two corpora lutea. The 74 right ovaries had an average size of 3.56 ± 0.77 cm length and 1.77 ± 0.47 cm width, the diameter of the follicles evaluated with metric rule had an average of 0.40 ± 0.09 cm, the measurement corresponding to ultrasound was an average of 0.50 ± 0.18 cm. A corpus luteum was observed in 24 ovaries and in two there were two corpora lutea. It is concluded that the procedure of measurement of the follicular diameter by metric rule and ultrasonography in bovine showed significant differences ($P < 0.05$) in bovine ovaries obtained in slaughterhouse and confirmed that the diameter of the follicles is similar for left and right ovarian follicles ($P > 0.05$). The evaluation of the *in vitro* maturation of 36 oocytes obtained from the left ovaries was 88.8% and in 35 oocytes from the right ovaries it was 88.5% ($P > 0.05$), so it is feasible to obtained good quality oocytes for *in vitro* maturation by both methods and both ovaries.

Keywords: Follicle, Diameter, Bovine, Maturation *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El ganado bovino Holstein presenta actividad reproductiva en forma constante, sin embargo, en la eficiencia reproductiva no siempre se tienen los resultados deseados, debido a muchas variables que intervienen en la reproducción; aunque la inseminación artificial es de uso común para esta especie, hay otras técnicas que pueden favorecer la eficiencia reproductiva como es el caso de la transferencia de embriones, la cual tiene un costo mayor a la inseminación artificial, pero también tiene ventajas, como el avance genético que se puede obtener al utilizar animales sobresalientes en determinadas características.

Una alternativa que puede aplicarse es la transferencia de embriones producidos *in vitro*, aunque la maduración y el crecimiento de los ovocitos *in vitro* depende de varios factores, como la condición fisiológica de las vacas donadoras, el estado del folículo y tamaño o fase de crecimiento. Los reportes muestran que las condiciones que son comúnmente usadas para la maduración de ovocitos de bovino no son totalmente eficaces, sin embargo, la competencia del desarrollo de los ovocitos es afectado por el ciclo estral de la donadora, fase de desarrollo folicular y tamaño del folículo (Iwata *et al.*, 2006). Este desarrollo también se ve favorecido por las células foliculares que proveen de nutrientes al ovocito y de energía a las células de la granulosa (Wani, 2002). *In vitro*, la adición de 10% de suero fetal bovino favorece la maduración debido a sus componentes, entre los que se encuentran: aminoácidos, carbohidratos, hormonas, factores de crecimiento, algunos componentes indefinidos y proteínas como la albúmina que ayuda a establecer un balance osmótico en el medio (Picton *et al.*, 2003).

El sistema endocrino regulador de la foliculogénesis involucra las gonadotropinas, pero localmente se producen varias hormonas y factores de crecimiento. Se han observado receptores en las células de la teca y la granulosa en el ovario, particularmente en el bovino están presentes receptores a estradiol y progesterona de acuerdo al crecimiento y desarrollo, según el tamaño de los folículos de 1-5 mm, 6-9 mm ó >9 mm (Beg y Ginther, 2006).

Antes de la disponibilidad del ultrasonido, la evaluación del desarrollo folicular solamente era posible al observar los ovarios después de la cirugía o en el momento de la muerte del animal, por lo que la existencia de la onda folicular y el crecimiento folicular no podía ser valorada. Mediante el ultrasonido se ha caracterizado el folículo dominante y el desarrollo del cuerpo lúteo durante el ciclo estral. La ultrasonografía recientemente ofrece tecnología de excelente resolución con un transductor de alta frecuencia (25-70 MHz) para valorar la dinámica de desarrollo de los folículos antrales y del complejo ovocito-células del cúmulo (COCs) (Pfeifer *et al.*, 2013). El ultrasonido se ha utilizado *in vivo* para predecir la producción de embriones y la colección de embriones después de la superovulación (Silva-Santos *et al.*, 2014). En el bovino es bien conocido que ocurren 2 a 3 ondas foliculares durante cada ciclo estral, identificadas por el desarrollo de los folículos mayores a 5 mm (Scully *et al.*, 2014).

Aun cuando el crecimiento de folículos en la mayoría de las vacas lecheras es constante, a veces se tiene una baja fertilidad (Evans *et al.*, 2012); con el objeto de incrementarla se han intentado diversos procedimientos de reproducción asistida, entre los cuales se encuentra la transferencia de embriones obtenidos *in vivo* o *in vitro*, en este último procedimiento se tiene la Ovopunción (OPU), la cual brinda la oportunidad de

obtener ovocitos de calidad en los días 4 y 7 del ciclo estral, con morfología similar, sin embargo, en el periodo de 7 días disminuye la calidad de los ovocitos, posiblemente por degeneración de los folículos (Nagai *et al.*, 2015). Una condición diferente es que usando FSH en animales jóvenes de 5 a 10 meses de edad, se tienen pocos embriones en estadio de mórula y blastocisto cuando se producen de ovocitos obtenidos de folículos de 7-10 mm, (Landry *et al.*, 2016); por consiguiente, el diámetro de los folículos en la maduración es de vital importancia para la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* (Jorssen *et al.*, 2015). La evaluación de la calidad de los ovocitos para el desarrollo *in vitro* se basa en la composición de las células cúmulo y las características del citoplasma del ovocito. La calidad morfológica de los COCs es determinada por grados 1, 2, 3 o 4, el grado 1 tiene cuatro o más capas de células del cúmulo y el citoplasma del ovocito es homogéneo, conforme disminuyen estas características disminuye la calidad del ovocito, considerando el grado 1 el más apto para la maduración *in vitro* (Do *et al.*, 2018).

El objetivo del presente estudio fue medir el diámetro de los folículos de 3 a 6 mm observados a simple vista con una regla métrica y con el equipo de ultrasonido en ovarios de bovino obtenidos en matadero, para confirmar si el diámetro de los folículos es el mismo mediante estos dos procedimientos y observar si hay alguna diferencia en su maduración *in vitro* que aumente la eficiencia en el proceso de esta biotecnología reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y procedimiento

Se colectaron 148 ovarios de vacas Holstein recién sacrificadas en el matadero, con una edad estimada de 3 a 4 años, en buen estado de salud y sin ninguna patología en el aparato reproductor. Los ovarios fueron clasificados en Izquierdos y Derechos. Posteriormente se transportaron al Laboratorio Manejo de la Reproducción de la UAM-Xochimilco, a una temperatura de 26°C, en un tiempo menor a 2 horas; después los ovarios fueron colocados en un recipiente con solución salina 0.9% adicionada con antibiótico-antimicótico 1 mL/L (Penicilina G 10000 UI/mL, Estreptomina 10000 UI/mL y Anfotericina 24 UI/mL) para mantener una temperatura constante de 38°C en el momento de realizar la ultrasonografía, procedimiento adaptado de Civale *et al.* (2013), quienes mencionan que la imagen que se obtiene con el ultrasonido a una temperatura normal del organismo bovino permite tener una mejor posición focal del equipo, que cuando la temperatura

está por debajo de 10°C de la normal. Se midieron los folículos de 3 a 6 mm que se observaron en la superficie del ovario a simple vista, con una regla métrica y con el equipo de ultrasonido (Sonovet 2000; con sonda de 3.5 MHz). Las medidas fueron anotadas en cada procedimiento. Posteriormente, por separado, folículos de ovarios izquierdos y derechos fueron puncionados utilizando una jeringa hipodérmica desechable de 10 mL y una aguja hipodérmica de 18x38 mm para la obtención del líquido folicular, el cual se dejó sedimentar. El proceso de maduración *in vitro* fue adaptado de Do *et al.* (2014); a partir del sedimento se obtuvo el paquete celular que se lavó dos veces con medio modificado de Tyrode, suplementado con lactato de sodio, Hepes y PVA (TL-Hepes-PVA), con un pH de 7.3 a 7.4, al cual se adicionó 5 UI de Heparina/ml. Bajo el microscopio estereoscópico, se seleccionaron los Complejos Ovocito-Células del Cúmulo (COCs), eligiéndose aquellos que presentaron citoplasma uniforme y que estaban rodeados por una masa completa de las células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados fueron cultivados para su maduración en medio para cultivo de tejidos TCM-199, con sales de Earle y bicarbonato, suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (Wang y Niwa, 1995). Los ovocitos se depositaron en una caja de 4 pozos conteniendo 500 mL de medio de maduración en cada uno. Posteriormente, cada pozo fue cubierto con una capa de aceite mineral y finalmente se le agregaron 1.5 U.I. de Merional (IBSA, Suiza) y 10% de Suero Fetal Bovino. Las cajas se incubaron a 39°C en una atmósfera de CO² al 5% y humedad a saturación, durante 24 horas. Posteriormente se realizó la evaluación de la maduración en unas muestras que fueron cultivadas para este fin, de acuerdo al procedimiento establecido por Casas *et al.* (2010).

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente determinando el promedio, desviación estándar y análisis de varianza, se utilizó la prueba de Tukey para determinar la diferencia mínima significativa a un intervalo de confianza de 0.05 (Kuehl, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron evaluados 148 ovarios (Tabla 1, Imágenes 1 a 3), los cuales se clasificaron en: Ovario Izquierdo (I) y Ovario Derecho (D). En I, el tamaño de los ovarios en promedio fue de

3.37±0.74 cm de largo y 1.75±0.48 cm de ancho, en estos ovarios el diámetro de los folículos evaluados con regla métrica en promedio fue 0.41±0.10 cm, la medida correspondiente a ultrasonido fue en promedio 0.51±0.21 cm. En 22 / 74 ovarios se observó la presencia de un cuerpo lúteo y en uno se presentaron dos cuerpos lúteos. Ovarios con presencia de folículos únicamente 35 / 74. De los 22 con cuerpo lúteo, 5 no presentaron folículos y 17 ovarios no presentaron ninguna estructura (Tabla 2).

Tabla 1. Medida de ovarios y diámetro de folículos en ovarios de vacas, obtenidos con una regla métrica y ultrasonido, clasificados en izquierdos y derechos

Número de muestra	Ovario	Largo cm	Ancho cm	Diámetro de Folículos con Regla en cm	Diámetro de Folículos con Ultrasonido en cm
1	I	2.4	1.4	0.3, 0.4	0.3, 0.6
2	D*	3.8	1.7	0.4	0.9
3	I	3.8	1.8	0.4	0.5
4	D*	4.3	2.5	0.3 0.4	0.7, 0.7
5	I	3.6	1.6	0.6	0.6
6	D	3.8	2.1	0.3, 0.3, 0.6	0.5, 0.8, 1.1
7	I*	2.5	1.4	0.6, 0.6	0.6, 0.6
8	D	2.9	1.6	0.3, 0.4, 0.5	0.4, 0.4, 0.5,
9	I	3.8	0.9	0.3, 0.3, 0.6, 0.6	0.3, 0.6, 0.6, 0.6
10	D	4.2	1.7	0.3, 0.6	0.4, 0.4
11	I	2.9	1.8	0.3, 0.5, 0.5	0.3, 0.3, 0.4,
12	D	3.6	1.8	0.4, 0.4, 0.4	0.4, 0.4 0.6
13	I	3.2	1.1	0.4	0.3
14	D*	3.0	1.5	-	-
15	I*	3.9	2.2	0.4, 0.5, 0.6	0.4, 0.4, 0.5
16	D	3.3	1.6	0.4, 0.5	0.3, 0.5
17	I	3.9	2.0	0.3, 0.4, 0.4, 0.5	0,3, 0.3, 0.4, 0.4
18	D*	4.1	2.1	0.3, 0.4, 0.5	0.3, 0.3, 0.3
19	I	3.9	1.7	0.4, 0.6, 0.5	0.3, 0.4, 0.5
20	D	3.4	1.5	0.3, 0.3, 0.4, 0.4	0.4, 0.4, 0.4, 0.5
21	I*	4.4	2.6	0.5	0.3

DIAMETRO DE FOLÍCULOS DETERMINADO CON ULTRASONIDO EN OVARIOS DE BOVINO...

22	D	4.6	2.1	0.3, 0.4, 0.4, 0.6	0.4, 0.4, 0.9, 0.6
23	I	2.5	1.5	0.4, 0.4, 0.5	0.4, 0.4, 0.4
24	D	3.3	1.7	0.4, 0.4, 0.5	0.3, 0.4, 0.8
25	I*	2.4	1.7	0.5	1.3
26	D	3.3	0.9	0.3, 0.5, 0.4	0.4, 0.4, 0.5
27	I	3.9	2.0	0.6	0.5
28	D**	3.2	2.4	0.5, 0.5	0.3, 0.6
29	I	2.9	1.7	0.4, 0.4, 0.5, 0.5	0.3, 0.3, 0.3, 0.5
30	D**	2.4	1.6	0.3, 0.4, 0.4	0.3, 0.4, 0.4
31	I**	3.6	2.3	0.4	0.4
32	D	3.4	2.0	0.3, 0.3, 0.3, 0.3	0.3, 0.4, 0.5, 0.8
33	I*	4.2	2.9	0.3	0.3
34	D	4.5	2.3	0.3, 0.3, 0.3, 0.3	0.4, 0.4, 0.4, 0.4
35	I*	3.6	2.7	0.3, 0.3, 0.3, 0.3	0.3, 0.3, 0.3, 0.3
36	D	3.3	2.4	0.3, 0.5	0.3, 0.5
37	I*	4.0	2.2	-	-
38	D	3.4	2.1	0.3	0.4
39	I	2.6	2.1	0.3, 0.3, 0.3	0.4, 0.4, 0.6
40	D*	3.7	2.8	0.6	0.6
41	I	3.2	2.1	0.3, 0.5	0.4, 0.6
42	D*	3.6	3.1	0.3, 0.3, 0.5	0.4, 0.5, 0.6
43	I	3.9	1.6	-	-
44	D*	5.1	2.3	0.3, 0.3, 0.4	0.4, 0.4, 0.4
45	I*	5.0	1.7	0.3, 0.4	0.4, 0.4
46	D*	5.1	2.3	0.3, 0.3, 0.4	0.4, 0.4, 0.4
47	I*	3.1	2.2	0.4	0.6
48	D	3.0	2.0	0.3, 0.4	0.4, 0.5
49	I*	3.8	2.4	0.3, 0.6	0.3, 1.0
50	D	3.3	2.3	0.3, 0.3, 0.5, 0.5, 0.5	0.3, 0.3, 0.3, 0.3, 0.4
51	I*	3.5	2.0	0.3, 0.4	0.3, 0.3
52	D	3.4	1.7	0.3, 0.4	0.5, 0.6
53	I*	3.5	2.0	0.3, 0.4	0.3, 0.3
54	D	3.4	1.7	0.3, 0.4	0.3, 0.4
55	I	2.1	1.9	0.3, 0.3, 0.4	0.3, 0.3, 0.3
56	D*	2.5	1.5	0.3, 0.4, 0.4, 0.5,	0.3, 0.3, 0.3, 0.3

57	I	3.0	2.2	0.3, 0.5	0.3, 0.4
58	D*	3.3	1.4	0.3, 0.4	0.3, 0.3
59	I	2.8	2.1	0.3, 0.3, 0.4, 0.4	0.3, 0.3, 0.3, 0.4
60	D*	2.0	1.7	0.4, 0.5, 0.6	0.4, 0.4, 0.4
61	I	2.9	1.1	-	-
62	D	2.0	1.0	0.6	0.4
63	I	2.8	1.2	-	-
64	D	2.5	2.5	0.5, 0.5	0.6, 0.7
65	I*	3.0	2.0	-	-
66	D*	5.0	3.0	-	-
67	I*	4.5	2.0	0.3, 0.4, 0.4	0.4, 0.6, 0.7
68	D	3.0	1.5	-	-
69	I	3.0	2.0	-	-
70	D	5.0	2.0	0.6, 0.4	0.8, 1.0
71	I	2.0	1.5	-	-
72	D	3.0	2.0	-	-
73	I	2.0	1.5	-	-
74	D*	4.2	2.5	0.3, 0.3	0.6, 0.7
75	I	4.0	2.5	-	-
76	D	5.0	2.0	-	-
77	I	4.5	2.5	-	-
78	D*	4.0	2.0	0.5, 0.5	0.4, 0.9
79	I	3.0	1.5	0.6	0.9
80	D	3.0	2.0	-	-
81	I*	4.5	2.5	0.3	0.9
82	D	2.5	1.5	0.4, 0.6, 0.6	0.3, 0.7, 0.8
83	I	3.0	2.0	0.6	0.8
84	D	4.0	2.0	-	-
85	I	4.0	2.0	-	-
86	D	2.5	1.5	-	-
87	I	3.0	1.0	-	-
88	D	4.0	1.0	-	-
89	I	3.8	2.0	0.6	0.6
90	D	3.0	1.5	0.4, 0.5	0.4, 0.5
91	I*	4.1	1.3	-	-
92	D	4.8	1.9	0.4	0.9

DIAMETRO DE FOLÍCULOS DETERMINADO CON ULTRASONIDO EN OVARIOS DE BOVINO...

93	I	3.8	1.6	-	-
94	D	4.5	2.5	0.4, 0.5, 0.5	0.5, 0.7, 0.7
95	I	3.8	2.0	0.3, 0.5	0.5, 0.7
96	D*	4.0	2.0	0.3	1.0
97	I	4.0	1.5	-	-
98	D*	5.0	2.0	0.3, 0.4	0.4,0.7
99	I	4.0	1.9	0.3, 0.4	1.0, 1.2
100	D*	3.4	1.8	0.4	0.7
101	I	2.8	1.6	0.5	1.0
102	D	3.5	1.5	-	-
103	I	2.5	0.5	-	-
104	D	3.5	0.8	-	-
105	I	3.5	1.2	0.3, 0.3, 0.4	0.3, 0.5, 0.5
106	D	3.0	1.0	0.4, 0.6	0.4, 0.6
107	I	3.5	2.5	0.6	0.8
108	D	4.5	2.0	-	-
109	I	2.0	1.0	0.6	0.5
110	D	2.5	1.5	0.5	0.5
111	I	3.5	1.0	-	-
112	D*	3.5	1.8	0.3, 0.3	0.4, 0.4
113	I	2.0	1.5	0.5	0.6
114	D	3.0	1.5	0.6, 0.6	0.9, 0.9
115	I	4.5	0.8	-	-
116	D*	3.0	1.5	-	-
117	I	4.0	1.2	0.4	0.8
118	D	5.0	1.2	0.4, 0.4, 0.4, 0.4	0.6, 0.7, 0.7, 0.7
119	I	3.5	2.0	0.4, 0.4	0.5, 0.7
120	D	4.5	1.3	0.3, 0.4,0.4,0.5	0.3, 0.4, 0.5, 0.6
121	I	5.5	2.0	0.4, 0.5	0.5, 0.7
122	D	4.4	1.6	0.3, 0.6	0.3, 0.6
123	I*	4.0	1.8	0.4	1.1
124	D	4.5	2.0	0.3, 0.5, 0.5, 0.5	0.4, 0.5, 0.5, 0.8
125	I	3.0	1.5	0.4, 0.5	0.5, 0.8
126	D*	3.2	1.8	0.3, 0.3	0.5, 0.5

127	I	3.5	1.8	0.4	0.5
128	D	4.0	1.5	0.3, 0.3, 0.4, 0.5,	0.3, 0.3, 0.4, 0.5
129	I	3.5	1.5	-	-
130	D*	4.0	1.5	-	-
131	I*	2.5	1.2	-	-
132	D	3.0	1.2	-	-
133	I	3.0	1.5	-	-
134	D	3.0	1.8	0.5	0.6
135	I*	3.5	1.5	0.6, 0.6	0.6,0.6
136	D	2.5	1.0	-	-
137	I*	2.5	1.5	-	-
138	D	3.0	1.5	-	-
139	I	3.0	1.6	0.3, 0.3	0.6, 0.7
140	D	4.0	2.0	-	-
141	I*	3.2	1.6	0.3, 0.3	0.5,0.7
142	D	3.0	1.6	0.3	0.6
143	I	2.5	1.3	0.3, 0.3, 0.4, 0.5	0.4, 0.6, 0.6, 0.7
144	D*	3.0	2.0	0.4	0.7
145	I	2.8	1.4	0.3, 0.5	0.6, 0.7
146	D	3.5	1.4	-	-
147	I	4.0	2.2	0.4, 0.5	0.4, 0.7
148	D	3.0	1.4	0.3, 0.4, 0.4, 0.5	0.3, 0.4, 0.5, 0.6
Promedio	I	3.37 ± 0.74^a	1.75 ± 0.48^a	0.41 ± 0.10^a	0.51 ± 0.21^a
Promedio	D	3.56 ± 0.77^a	1.77 ± 0.47^a	0.40 ± 0.09^a	0.50 ± 0.18^a

I= Ovario Izquierdo.

D= Ovario derecho.

*Indica presencia de cuerpo lúteo.

Literales iguales en las columnas de las medidas de ovarios indican no diferencia estadística significativa (P>0.05).

Literales iguales en renglones de medida de folículos indican no diferencia estadística significativa (P>0.05).

Tabla 2. Número de ovarios con presencia o ausencia de estructuras como cuerpo lúteo y folículos

Ovario	Número	Con cuerpo lúteo y folículos	Con cuerpo lúteo sin folículos	Con folículos únicamente	Sin estructuras
I	74	17 ^a	5 ^a	35 ^a	17 ^a
D	74	20 ^a	4 ^a	35 ^a	15 ^a
Total	148	37	9	70	32

Literales iguales en las columnas de las medidas de ovarios indican no diferencia estadística significativa ($P>0.05$).

En D, el tamaño de los ovarios en promedio fue de 3.74 ± 0.77 cm de largo y 1.77 ± 0.47 cm de ancho, en estos ovarios el diámetro de los folículos evaluados con regla métrica en promedio fue 0.40 ± 0.09 cm, la medida correspondiente a ultrasonido fue en promedio 0.50 ± 0.18 cm. En 24/74 ovarios se observó la presencia de un cuerpo lúteo y en dos se presentaron dos cuerpos lúteos. Ovarios con presencia de folículos únicamente 35/74. De los 24 con cuerpo lúteo, 4 no presentaron folículos y 15 ovarios no presentaron ninguna estructura (Tabla 2). El mayor tamaño de ovario fue observado en uno obtenido del lado izquierdo con 5.5 cm, y en el derecho con 5.1 cm de longitud; en cuanto al menor tamaño de ovario fue similar a 2.0 cm de longitud en ambos lados, izquierdo y derecho. El largo y ancho de los ovarios en el presente estudio son muy similares en todos los ovarios muestreados, posiblemente porque su procedencia fue de animales adultos y no se observó ninguna diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre las medidas de ambos grupos de ovarios.

El diámetro de los folículos evaluados con regla fue 0.3 a 0.6 cm en ambos ovarios izquierdos y derechos, el resultado de la medición con el ultrasonido en algunos de estos mismos folículos fue diferente, se obtuvieron folículos con un diámetro mayor que el obtenido con la regla métrica; 21 folículos izquierdos y 28 folículos derechos tuvieron un diámetro entre 0.7 a 1.3 cm, representando 20.1% y 26.9%, respectivamente (Tabla 3). Las medidas del diámetro con regla y ultrasonido mostraron una diferencia estadística significativa ($P<0.05$), probablemente porque en la medición con regla métrica sólo se observó la parte del folículo que sobresalía del ovario y algunos folículos evaluados con ultrasonido estaban colocados de manera más profunda, generando un mayor diámetro

que el observado en la superficie del ovario (Imágenes 1 a 3). El diámetro de los folículos evaluados es similar a los reportados por otros autores, Hiaro *et al.* (2014) citan un diámetro de folículos antrales de 0.5-0.8 mm en ganado F1 de Japanese Black x Holstein. Por otra parte, Ferreira *et al.* (2013) observaron que el tamaño de los folículos es de 10.7 a 14.9 mm entre los días 8 a 10 del ciclo estral en vacas Holstein. El uso del equipo de ultrasonido puede ayudar a determinar con mayor precisión el diámetro de los folículos, aunque la diferencia en la medición del diámetro con ultrasonido es significativa ($P < 0.05$), los resultados de la maduración *in vitro* de los 71 ovocitos evaluados no presentó diferencias en la maduración, en 36 ovocitos obtenidos de ovarios izquierdos el porcentaje de maduración fue 88.8% y la maduración obtenida en los 35 ovocitos provenientes de ovarios derechos fue 88.5% ($P > 0.05$) (Tabla 4, Imágenes 4 y 5), estos porcentajes son mayores a 79%, reportado por Lopes *et al.* (2018), por lo que es factible la obtención de ovocitos de buena calidad para su maduración *in vitro* por ambos métodos.

Tabla 3. Número de folículos en ovario izquierdo y derecho, clasificados por su diámetro y tipo de medición

Diámetro	0.3 cm	0.4 cm	0.5 cm	0.6 cm	0.7 a 1.3 cm	Total
Izquierdos						
Regla	36	42	20	16	-	104^a
Ultrasonido	30	20	14	19	21	104^b
Derechos						
Regla	49	44	29	13	-	135^a
Ultrasonido	26	46	20	15	28	135^b

Literales diferentes indican una diferencia estadística significativa en el diámetro de los folículos, obtenido con la regla y ultrasonido ($P < 0.05$).

Imágenes 1 a 3, muestran la medición del diámetro de los folículos evaluados con regla métrica y ultrasonido

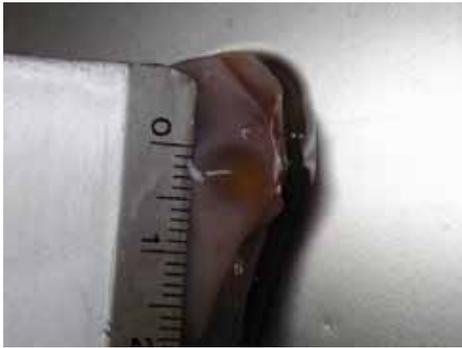


Imagen 1. Folículo de 5 mm.

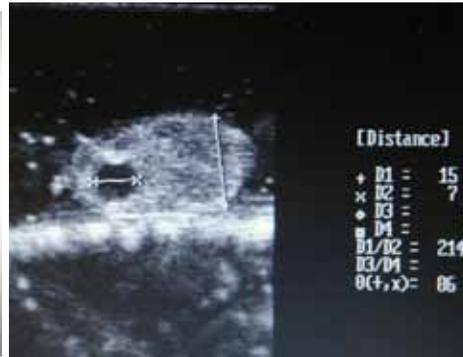


Imagen 1. Folículo de 7 mm (xD2).

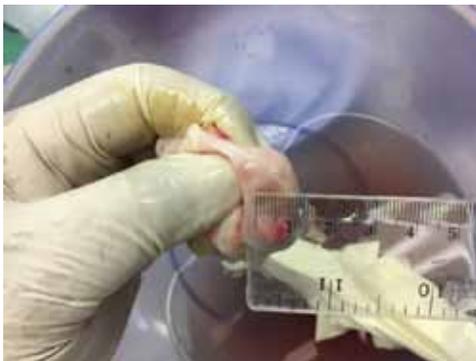


Imagen 2. Folículo de 6 mm.

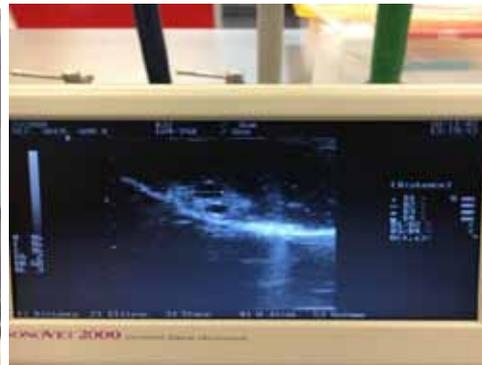


Imagen 2. Folículo de 8 mm (+D1).



Imagen 3. Folículo de 6 mm.



Imagen 3. Folículo de 7 mm (+D1).

Tabla 4. Estado de maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de ovarios izquierdos y derechos

Estadio	Ovocitos	VG	MI	Porcentaje en MI	MII	Porcentaje en MII
I	36	0	4	11.1	32	88.8^a
D	35	0	4	11.4	31	88.5^a
Total	71	0	8	11.2	63	88.7

No se observó ninguna diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) en la maduración entre los ovocitos obtenidos de ovarios izquierdos y derechos.

Imágenes 4 y 5, muestran la fase de maduración en ovocitos izquierdos y derechos

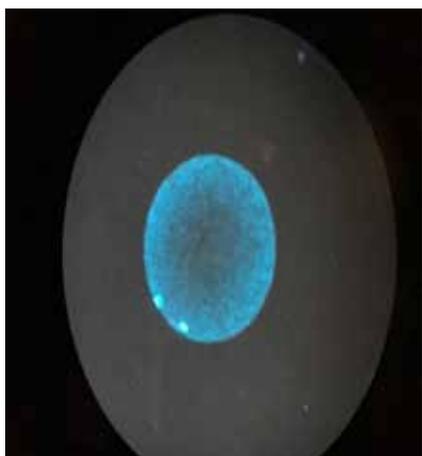


Imagen 4. Ovocito de ovario izquierdo en Metafase II (20X).

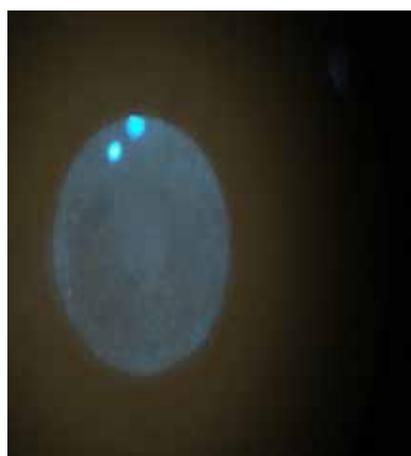


Imagen 5. Ovocito de ovario derecho en Metafase II (20X).

En el presente estudio hubo presencia de folículos tanto en ovarios que tenían presente un cuerpo lúteo, como en aquellos en los cuales no presentaban un cuerpo lúteo, siendo muy similar la actividad ovárica en cuanto al desarrollo de los folículos sin mostrar una dependencia del tamaño del ovario, observando folículos de diferente diámetro en un mismo ovario, en ausencia o presencia de cuerpo lúteo. Los resultados obtenidos difieren con lo reportado por Karamishabankareh *et al.* (2015), quienes obtuvieron un 60.9% de presencia de cuerpo lúteo a los 60 días postparto en el ovario derecho y 39.1% en el izquierdo. Asimismo mencionan que el porcentaje de división y el porcentaje de blastocistos es mayor en los ovocitos obtenidos de ovario derecho que del izquierdo, posiblemente debido a que hay más actividad del ovario derecho en la ovulación, lo que se refleja con una organización en el potencial de desarrollo de los ovocitos *in vitro* (Karamishabankareh *et al.*, 2015).

La aplicación de esta biotecnología requiere de ovocitos maduros y cigotos de buena calidad. Un punto crítico del cultivo para la maduración *in vitro* es la selección de los ovocitos, los cuales pueden ser inmaduros y generalmente recuperados de ovarios obtenidos de animales en matadero inmediatamente después de su muerte, los cuales resultan en una mezcla de ovocitos en diferentes fases de desarrollo. En términos de eficiencia, el tamaño de los folículos es difícil de controlar, aunque se tiene conocimiento de que el tamaño del folículo puede influir en el desarrollo de los ovocitos (Labrecque *et al.*, 2016). La competencia de desarrollo de los ovocitos es adquirida progresivamente durante el desarrollo folicular, pero se encuentra asociado al tamaño del folículo y a las diferencias de factores en el citoplasma como el RNAm, esto puede explicar la diferencia en el desarrollo en los ovocitos obtenidos de folículos grandes (Nemcova *et al.*, 2016). Después de la aspiración de los folículos, los ovocitos son seleccionados usando el siguiente criterio: su morfología, incluyendo el número de capas de células del cúmulo y la evaluación de la granulación del citoplasma, aunque esta evaluación morfológica es subjetiva (Gil *et al.*, 2010), de tal forma que la técnica no está totalmente estandarizada.

El tamaño del folículo es importante en la maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario *in vitro*, en este sentido, se han observado diferencias importantes en el nivel de RNAm entre ovocitos pequeños y grandes, teniendo una mejor modulación en estos últimos para funciones cruciales de su desarrollo (Labrecque *et al.*, 2016). Se ha observado que la expresión de genes en folículos mayores o igual a 8 mm de diámetro pueden tener un marcado potencial en la competencia de los ovocitos en las rutinas de fertilización *in vitro*, junto con la adquisición de la competencia de las células cúmulo en la maduración, ovulación y fertilización de los ovocitos (Melo *et al.*, 2017). También los genes de las células cúmulo que acompañan a los ovocitos participan en la

calidad y respuesta en el cultivo durante la producción de embriones *in vitro*; las interacciones entre las células germinales y somáticas modulan la morfología de la cromatina y su función para que el ovocito adquiera la capacidad para su desarrollo (Dieci *et al.*, 2016). Se tiene conocimiento de que la metilación del ADN está asociado a la adquisición de la competencia del desarrollo en ovocitos de folículos iguales o mayores a 6 mm (Mattern *et al.*, 2017). Es importante saber que si los ovocitos son obtenidos de ovarios con presencia de cuerpo lúteo, éstos tienen mayor desarrollo en los que provienen de folículos grandes de 10 a 20 mm, que en medianos de 6 a 9 mm y pequeños de 3 a 6 mm, demostrando que el desarrollo de los ovocitos *in vitro* depende del tamaño de los folículos y no de la presencia del cuerpo lúteo (Shabankareh *et al.*, 2015), no obstante, la maduración *in vitro*, en el presente trabajo, fue alta en los folículos puncionados de 3 a 6 mm. *In vivo*, el tamaño del folículo es importante ya que se ha relacionado con la elevación de estradiol y presencia de estro (Perry *et al.*, 2014), siendo mayor el porcentaje de gestación en vacas altas productoras con un tamaño de folículo ovulatorio determinado con ultrasonido de 14.1 a 19.0 mm, comparado con folículos de 10 a 14 mm (Mokhtari *et al.*, 2016).

CONCLUSIÓN

El procedimiento de medición del diámetro folicular mediante regla métrica y ultrasonografía presentó diferencias significativas en ovarios de bovino obtenidos en matadero y, al mismo tiempo, permitió confirmar que el diámetro de los folículos es similar en ambos ovarios, izquierdos y derechos, entre los dos métodos de medición, pero en cuanto a la maduración *in vitro*, de los ovocitos provenientes de los ovarios izquierdos y derechos no son significativas, se confirma que es factible la obtención de ovocitos de buena calidad para su maduración *in vitro* por ambos métodos y ambos ovarios, izquierdos y derechos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Rastro Temamatla A.C. del Estado de México por proporcionar los ovarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Beg, A. y O. Ginther, 2006, "Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors", en *Reproduction*, 132: 365-377.
- Casas, E. *et al.*, 2010, "Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*", en *Toxicology in Vitro*, 24: 224-230.
- Civale, J. *et al.*, 2013, "Calibration of ultrasound backscatter temperature imaging for high-intensity focused ultrasound treatment planning", en *Ultrasound Med Biol*, 39(9): 1596-1612.
- Dieci, C. *et al.*, 2016, "Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production", en *Mol Hum Reprod.*, 22(12): 882-897.
- Do, H. *et al.*, 2018, "Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients", en *Theriogenology*, 120: 105-110.
- Evans, C. *et al.*, 2012, "Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring", en *Reprod Dom Anim*, 47 Suppl, 4: 31-37.
- Ferreira, M. *et al.*, 2013, "Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/IA of high-producing Holstein cows", en *Animal Reproduction Science*, 140: 26-33.
- Gil, A. *et al.*, 2010, "Advances in Swine in vitro embryo production technologies", en *Reprod Dom Anim, Suppl*, 2: 40-48.
- Hiaro, Y. *et al.*, 2014, "In vitro Growth and maturation of vitrified-warmed bovine oocytes collected from early antral follicles", en *Reprod Dev*, 60(1): 68-72.
- Iwata, J. *et al.*, 2006, "Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes", en *Animal Reproduction Science*, 91: 215-223.
- Jorssen, P. *et al.*, 2015, "Morphologic characterization of isolated bovine early preantral follicles during short-term individual in vitro culture", en *Theriogenology*, 84(2):301-311.
- Karamishabankareh, H. *et al.*, 2015, "In vivo and in vitro study of the function of the left and right bovine ovaries", en *Theriogenology*, 84(5): 724-731.
- Kuehl, O., 2001, *Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de Investigaciones*, Thomson Learning, México.

- Labrecque, R. *et al.*, 2016, "Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: Insights from correlation network analysis", en *Mol Reprod Dev*, 83(6): 558-569.
- Landry, A. *et al.*, 2016, "Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments", en *Theriogenology*, 86(5): 1240-1246.
- Lopes, S. *et al.*, 2018, "Supplementation of bovine follicular fluid during in vitro maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number", en *Theriogenology*, 126: 222-229.
- Mattern, F. *et al.*, 2017, "Gene-specific profiling of DNA methylation and mRNA expression in bovine oocytes derived from follicles of different size categories", en *Reprod fertil Dev*, 29(10): 2040-2051.
- Melo, O. *et al.*, 2017, "Identificación of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells", en *Anim Genet*, 48(1): 19-29.
- Mokhtari, A. *et al.*, 2016, "Factors affecting the size of ovulatory follicle and conception rate in high-yielding dairy cows", en *Theriogenology* 85(4): 747-753.
- Nagai, K. *et al.*, 2015, "Fertilizability of oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries", en *Anim Reprod Sci*, 163: 172-178.
- Nemcova, L. *et al.*, 2016, "Detection of genes associated with developmental competence of bovine oocytes", en *Anim Reprod Sci*, 166: 58-71.
- Perry, A. *et al.*, 2014, "Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol", en *Domest Anim Endocrinol*, 48: 16-20.
- Pfeifer, F. *et al.*, 2013, "Ultrasound biomicroscopy: a non-invasive approach for in vivo evaluation of oocytes and small antral follicles in mammals", en *Reprod Fertil Dev*, 26(1): 48-54.
- Picton, M. *et al.*, 2003, "Growth and maturation of oocytes in vitro", en *Reprod Suppl*, 61: 445-462.
- Scully, S. *et al.*, 2014, "Characterization of follicle and development in beef heifers using high resolution three-dimensional ultrasonography", en *Theriogenology*, 81: 407-418.
- Shabankareh, K. *et al.*, 2015, "In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size", en *Iran J Reprod Med*, 13(10): 615-622.
- Silva-Santos, *et al.*, 2014, "Antral follicle populations and embryo production –in vitro and in vivo- of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages", en *Reprod Domest Anim*, 49(2): 228-232.

- Wang, W. y K. Niwa, 1995, "Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium", en *Zygote*, 3: 345-350.
- Wani, A, 2002, "In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes, Review", en *Small Ruminant Research*, 44: 89-95.

