

Artículo original:

TECNICAS DEL SLICING Y ASPIRACION FOLICULAR EN LA EFICIENCIA DE LA RECUPERACION DE OVOCITOS BOVINOS CRIOLLOS POSTMORTEN EN EL CAMAL

Slicing and follicular aspiration techniques in the recuperation oocytes efficiency of creole bovine postmorten in the slaughterhouse

Gomez, O.E.(1); G. Alva(1);
F.V. Huillcas(2); D. Salinas(2)

INTRODUCCIÓN

(1) *Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia -
Universidad Nacional Micaela Bastidas de
Apurimac - Perú.*

(2) *Pasantes de laboratorio.*

Email: ogomezq@hotmail.com

Palabras Clave:

Aspiración, ovocito, fólculo, bovino

Actualmente, se producen embriones de bovino, pero con desarrollo atrasado y/o presencia de anomalías, lo que conlleva a una reducción de su viabilidad (Hansen, 2006), causado por el uso no estandarizado de las técnicas de recuperación de ovocitos, entre otros factores. La información existente acerca de los resultados del uso de las técnicas de recuperación de ovocitos es aun contradictoria; por lo que, la investigación se realizó con el objeto de determinar cómo afectan las técnicas del slicing y aspiración folicular en la categorización, calidad y rendimiento de ovocitos recuperados de los ovarios de bovino criollo post-morten. A través de estas técnicas de recuperación de ovocitos se pretende maximizar el número total de ovocitos recuperados, que puedan ser utilizados en los procesos de maduración (MIV) y fertilización in vitro (FIV) o in vivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el II semestre del 2011, en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac, ubicado en Abancay - Apurimac, a 2 378 msnm. Se procedió según lo propuesto por Hernandez-Fernandez *et al.* (2010), para el cual se tomaron 200 ovarios de vacas criollas, sacrificadas en el camal municipal de Abancay. Los ovarios fueron transportados en solución fisiológica al 0,9%, a una temperatura entre 30 – 35°C, hasta el laboratorio. Alrededor de 2 horas post-recolección de los ovarios, se lavaron por tres veces en solución fisiológica al 0,9%. Los ovarios se dividieron en dos grupos: Para la técnica de slicing se utilizaron 100 ovarios, los cuales se fijaron a una pinza hemostática curva para con un bisturí seccionar longitudinal y transversalmente cada fólculo de 2 – 8 mm de diámetro visibles en la superficie del ovario, y luego fue sumergido para lavarse con una suave presión cada área seccionado en un medio de lavado entre 5 – 10 ml en una placa de Petri graduado y protegido de la luz; Para la técnica de aspiración folicular, se tomaron 100 ovarios, y de sus fólculos visibles de 2 – 8 mm de diámetro se aspiraron los ovocitos utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 18G x 1½ pulgadas, luego colocados en un medio de lavado entre 5 – 10 ml en una placa Petri graduado y protegido de la luz. En ambas técnicas, el contenido de las placas de Petri se reposó por 15 min., luego se procedió a decantar el sobrenadante y se tomó el sedimento para su observación en un microscopio estereoscópico a 40X. Los ovocitos encontrados se clasificaron según lo descrito por Konishi *et al.* (1996) en 4 categorías, de acuerdo a las células del cúmulo que lo rodean: Grado I (> 4 estratos), Grado 2 (3 a 4 estratos), Grado 3 (1 a 2 estratos), Grade 4 (desnudado).

Los COCs con una masa de cúmulos celular expandidos o con un ooplasma degenerado se excluyeron de la clasificación.

Solo las categorías A y B fueron consideradas como viables para maduración in vitro (MIV), fertilización invitro (FIV) e in vivo, y como ovocitos de calidad buena. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS_V9 (Prueba de Chi Cuadrado para dependencias y Prueba de comparación de diferencia de proporciones para comparar rendimientos).

RESULTADOS Y DISCUSION

Técnicas de recuperación y categorización de ovocitos

En cuanto a ovocitos por categorías (Tabla 1): Las técnicas de recuperación como el slicing y aspiración folicular, proveen similar categorización de los ovocitos recuperados ($p > 0.05$).

Tabla 1: Técnicas de recuperación por categoría de ovocitos

TECNICAS DE RECUPERACION	CATEGORIA DE OVOCITOS					OVOCITOS TOTALES
	Grado A	Grado B	Grado C	Grado D	Total	
Slicing	151 (28.42%)	95 (17.89%)	146 (27.37%)	140 (26.32%)	532 (100.00%)	532 ^a (55.53%)
Aspiración folicular	118 (27.70%)	90 (21.13%)	118 (27.70%)	100 (23.47%)	426 (100.00%)	426 ^b (44.47%)

Letras diferentes en las columnas significa diferencia estadística ($p < 0.05$)

Estos resultados difieren a los reportados por González *et al.* (1992), quienes con la técnica del slicing hallaron 59.3%, 33.0% y 7.5% para las categorías A, B y C, respectivamente, y con la técnica de aspiración folicular encontraron 40.3%, 48.3% y 10.9% de ovocitos para las respectivas categorías, habiéndose recuperado diferentes cantidades de ovocitos por categoría y por técnicas de recuperación de ovocitos ($p < 0.05$). En cuanto a los ovocitos totales: González *et al.* (1992), del total de ovocitos



recuperados, encontraron mayor cantidad de ovocitos con la técnica del slicing (76.88%) que con aspiración folicular (23.12%) ($p < 0.01$), así como Hamano y Kuwayma (1993) que hallaron más ovocitos por el método del slicing que por aspiración folicular (63.3% y 22.1%); en ambos casos estaría explicado por la recuperación de ovocitos de la zona superficial y cortical (folículos < 2 mm de diámetro) del ovario al usar la técnica del slicing. En cambio, siguiendo nuestra metodología, Hernández-Fernández et al. (2010), encuentran 60.76% y 39.24% de ovocitos para la técnica de slicing y aspiración folicular ($p < 0.05$), respectivamente; nosotros encontramos 55.53% y 44.47% ($p > 0.05$).

Técnicas de recuperación y calidad de los ovocitos

No se ha encontrado (Tabla 2) asociación entre las técnicas de recuperación de ovocitos (slicing y aspiración folicular) y la calidad de ovocitos ($p > 0.05$); y es posible se deba al diseño experimental, en donde la recuperación de ovocitos fue de folículos de 2-8 mm de diámetro y solo de aquellos encontrados de la superficie del ovario, sin importar el ciclo estral de la vaca.

Tabla 2: Técnicas de recuperación por calidad de ovocitos

TECNICAS DE RECUPERACION	CALIDAD DE OVOCITOS		TOTAL
	BUENOS (MIV y FIV)	MALOS (Desecho)	
Slicing	246	286	532
	(46.24%) ^a	(53.76%) ^a	(100.00%)
Aspiración folicular	208	218	426
	(48.83%) ^a	(51.17%) ^a	(100.00%)
Total	454	504	958

Letras diferentes en las columnas significa diferencia estadística ($p < 0.05$)

Similarmente, Gonzales et al. (1992) encontraron que del total de ovocitos recuperados, los ovocitos de calidad con la técnica de slicing fue 88.6% y con aspiración folicular fue 92.3% ($p > 0.05$), estos resultados son altos en comparación con los nuestros; los autores indican que al usar el slicing, seccionaron longitudinal y transversalmente el ovario, y no indican la zona (superficial o cortical) de donde fueron tomados los ovocitos. Takagi et al. (1992), utilizando la técnica de aspiración folicular encontró 43.0% de ovocitos de calidad, similar al nuestro. Hamano y Kuwayma (1993) reportan que, del total de ovocitos recuperados, utilizando la técnica del slicing el 84.6% eran ovocitos de calidad cultivable, superior a 41.3% de ovocitos cultivables encontradas con la técnica de aspiración folicular; aunque usando el slicing tomaron ovocitos de la superficie y el interior del ovario. Al respecto, Arlotto et al. (1996) indica que, los ovocitos de los folículos corticales son más pequeños, tienen un potencial inferior a la maduración meiótica y desarrollo embrionario, así como solo los ovocitos corticales con diámetros más grande maduran in vitro y desarrollan a blastocitos. Hernández-Fernández et al. (2010), indican que, utilizando las técnicas de slicing y aspiración folicular, del total de ovocitos recuperados en cada técnica, el 63.66% y el 76.77% respectivamente, eran ovocitos de buena calidad ($p > 0.05$) siendo similares entre ambas; estos resultados son similares a los nuestros, pero superiores proporcionalmente.

Técnicas de recuperación y rendimiento de ovocitos

Las técnicas de slicing y aspiración folicular proveen 5.32 y 4.26 ovocitos por ovario ($p > 0.05$), así como 2.46 y 2.08 ovocitos de calidad por ovario ($p > 0.05$), respectivamente (cuadro 3).

Gonzales et al. (1992) utilizando las técnicas de slicing y aspiración folicular, encontraron 12.8 y 3.8 ovocitos por ovario ($p < 0.01$), siendo significativamente diferentes; e indican que al usar la técnica del slicing seccionaron longitudinal y transversalmente los ovarios, y no informaron el tamaño de los folículos seccionados, ni la zona del ovario de donde fueron tomados los ovocitos.

Tabla 3: Técnicas de recuperación por ovocitos totales y ovocitos de calidad por ovario

Recuperación	N° ovocitos/ovario	N° ovocitos de calidad/ovario
Slicing	5.32 ^a	2.46 ^a
Aspiración Folicular	4.26 ^a	2.08 ^a

Letras diferentes en las columnas significa diferencia estadística ($p < 0.05$)

Sin embargo, Zarate (2006), al utilizar la técnica de aspiración folicular, tomando solo ovocitos de folículos de 2 - 8 mm de diámetro encontró 6.11 ovocitos por ovario, muy próximos al hallado por nosotros. Hernández-Fernández et al. (2010), con las técnicas de slicing y aspiración folicular y siguiendo la metodología descrita, encontraron 4.3 y 3.2 ovocitos de buena calidad por ovario ($p > 0.05$), respectivamente, muy superior a los encontrados por nosotros. La menor cantidad de ovocitos de calidad por ovario, es posible se deba a la baja calidad nutritiva de la dieta animal (Ruiz et al. 2006); ya que los del bovinos criollos provenían de zonas de pastoreo con pastos naturales que contienen una calidad nutritiva disminuida.

CONCLUSIONES

Utilizando las técnicas de slicing y aspiración folicular no se encontró efecto de las técnicas de recuperación de ovocitos en la categorización de ovocitos. Asimismo, el uso de estas técnicas proveen similares calidades de ovocitos buenos o de ovocitos destinados a la MIV y FIV. Del mismo modo, con las técnicas descritas se recuperaron similar cantidad de ovocitos por ovario y similar cantidad de ovocitos de calidad por ovario, aunque inferiores a los reportados; Por tanto, es posible utilizar cualquiera de estas técnicas de recuperación, pero los ovocitos deben ser tomados de folículos de 2-8 mm de diámetro y solamente de aquellos que se encuentren en la superficie del ovario.

BIBLIOGRAFIA

- Arlotto, T.; J. Schwartz; N. First; M. Leibfried. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45(5):943-956
- Gonzales, R.; E. Soto; N. Delgado; G. Portillo; A. Ondiz; J. Velarde. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovino mestizos sacrificados. *Revista Científica FCV de LUZ*. Vol II N° 2
- Hamano, S.; M. Kuwayama. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 39(3):703-712
- Hansen, P.. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle: an overview. *Theriogenology*. 65:119-125
- Hernández, A.; H. Nava; V. Vilchez. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. *Producción Agropecuaria/Sanidad Animal*, 3(1): 41-44
- Konishi, M.; Y. Aoyagi; T. Takedomi; H. Itakura; T. Itoh; S. Yazawa. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro dev. of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 45:573-561
- Ruiz, A.Z.; C. Domínguez; N. Martínez; L. Pinto; K. Drescher; M. Rossini; R. Pérez; J. Rojas; R. Arana; A. Fernández; N. Jerez. 2008. Efecto del nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, expresión de transp. de glucosa y tolerancia a la insulina en vacas mestizas durante el parto. *Zootecnia Tropical*, Vol. 26, No. 2
- Zarate, O.E. 2006. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. [Tesis de Maestría]. Universidad Veracruzana. México

