

Artículo original:

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS OVOCITO-CÚMULUS (COCs) DE ALPACA RECUPERADOS DE OVARIOS POSTMORTEN EN UN CAMAL

Comparison of three recovery methods of alpaca cumulus-oocyte complexes (COCs) harvested from postmortem ovaries in a slaughterhouse

Gomez O.E.(1), Choque D.(1), Henao F.(2), Escobedo M.H.(1), Valverde N.(1,3)

INTRODUCCIÓN

(1) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú.

(2) Laboratorio Bio-Genes Ltda., Medellín-Colombia

(3) Pasante de Laboratorio.

Email: oegomezq@hotmail.com

Palabras Clave:

Alpacas, COCs, ovocito

El desarrollo de los métodos de recuperación de complejo ovocitos cumulus (COCs) de ovarios postmortem en camales, pretende maximizar la cantidad de ovocitos aptos o buenos para la maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV). Los ovarios pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37°C hasta 8 horas sin llegar a afectar la calidad de los ovocitos en los procesos de MIV y FIV (Lu, 1990); sin embargo, los procesos de FIV en el futuro, se realizaran en alpacas de alta calidad genética, consiguientemente serán valiosos los métodos de recuperación en la obtención de COCs por animal y muchas veces por ovario, como ocurre en las especies en proceso de extinción; por lo que, se hace necesario evaluar la eficiencia de los métodos de recuperación en la alpaca. El objetivo fue comparar la cantidad de COCs aptos (condiciones buenas), COCs aptos por ovario, y la proporción de COCs aptos por lado de ovario, utilizando los métodos de recuperación como aspiración folicular, slicing folicular y disección-ruptura folicular del ovario de la alpaca procedentes del camal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló entre el último semestre del 2012 y primer semestre del 2013. Del Camal Municipal de la Comunidad de Iscahuaca (Cotaruse, Aymaraes, Apurímac), se tomaron 270 ovarios (135 alpacas) de hembras vacías en edad reproductiva, a dos horas post-beneficio, inmediatamente se identificaron y colocaron en una caja térmica en solución fisiológica al 0.9% a 30-35°C, al que se agregó penicilina G potásica; luego fueron transportados en un intervalo máximo de 4 horas al laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac; inmediatamente llegado, se procedió a lavar los ovarios con solución fisiológica al 0.9% a 30-35°C y retirar los restos de tejido. Para la aspiración folicular, de 98 ovarios (49 alpacas), se tomaron solo los folículos visibles de 2 a 6 mm de diámetro, y fueron aspirados utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 21G x 1½ pulgadas, y luego colocados en un medio de lavado (Ruiz *et al.*, 2011) entre 5 – 10 ml en una placa Petri graduada. Con el slicing folicular (incisión de la superficie del folículo del ovario) se procedió según Arlotto *et al.* (1990), para ello se emplearon 86 ovarios (43 alpacas), los cuales se fijaron a una pinza hemostática curva para luego, utilizando un bisturí, seccionar longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6 mm, seguidamente cada ovario fue sumergido por separado en medio de lavado en una placa Petri graduada y con una suave presión se lavó el folículo. Para la disección-ruptura folicular, se utilizaron 86 ovarios (43 alpacas), y se procedió a diseccionar folículos de 2 a 6 mm hasta aislar la integridad del folículo ovárico, luego se procedió a realizar la ruptura de la membrana del

folículo en una placa Petri graduada, utilizando un bisturí delgado (Lu, 1990). En todos los casos, se tomaron COCs solo de la superficie visible del ovario. El tiempo de decantación fue de 15 min. La recuperación de COCs, fue individualmente por cada ovario. El contenido de las placas Petri fue evaluado con la ayuda de un microscopio (BA210, clinical MOTIC, China Group Ltda) a 40X. La caracterización se realizó según lo propuesto por De Loose *et al.* (1989), de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma del ovocito: categoría 1 (COC con 5 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 2 (COC con 2-4 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 3 (1 capa de células de granulosa o parcialmente denudado, y citoplasma vacuolado; y categoría 4 (ovocitos denudados, y citoplasma granulado). Solo los COCs de las categorías 1 y 2 fueron considerados como aptos o de condición buenos para maduración *in vitro* (Ratto *et al.*, 2005). Luego se agrupó según método de recuperación a los COCs aptos (buenos) totales; y previa estimación, a los COCs aptos por ovario, y la proporción de COCs aptos por lado derecho e izquierdo del ovario. El análisis estadístico se realizó a través del ANOVA, previa transformación de datos con raíz de X+1, utilizando el software estadístico R.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

COCs Aptos (buenos): Se han encontrado 63.17, 67.90 y 72.36% de COCs aptos o de condición buenos del total COCs recuperados con los métodos de aspiración folicular, slicing de ovarios y disección-ruptura folicular, respectivamente ($p < 0.05$), siendo mayor los COCs recuperados por disección-ruptura folicular que por aspiración folicular. Al respecto, Huanca *et al.* (2007), reportó la recuperación de 54.00% (19/35) COCs de folículos > 3 a más mm por aspiración folicular y con aguja de 18G. En nuestro caso la recuperación por aspiración folicular se hizo de folículos de 2-6 mm de la superficie del ovario, y con aguja de 21G x 1½ pulgadas. Con el mismo método Ruiz *et al.* (2011) informó que de 667 COCs recuperados, el 69% clasificaron como aptos para la maduración in vitro. Sin embargo, Gonzales *et al.* (2009) reportaron de 500 ovarios que recuperaron 180 COCs, y de estos solo el 44.4% fueron clasificados como aptos para maduración in vitro y fecundación in vitro; esta baja tasa de recuperación posiblemente se deba a que se aspiraron folículos de 4 a 6 mm de diámetro y al tiempo de traslado desde lugares alejados hasta el laboratorio de procesamiento. Con respecto al método de slicing de ovarios en la alpaca, la información es escasa, y solo se tiene un reporte desarrollado por Condori *et al.* (2010). Sobre el método de disección-ruptura folicular, solo se conoce aplicado en otras especies como en la vaca y la oveja con tasas de recuperación más altas ($> 90\%$). Al parecer la disección-ruptura folicular provee mayor cantidad COCs, aunque con la desventaja de requerir mayor tiempo para su procesamiento, lo que podría afectar a la calidad del COCs en el caso de la alpaca.

Tabla 1: Métodos de recuperación, total de COCs aptos (buenos), COCs por ovario, y COCs aptos por ovario para maduración in vitro (MIV) y fecundación in vitro (FIV) de ovarios de alpaca

TECNICAS DE RECUPERACIÓN	TOTAL DE COCs	N° DE COCs	N° DE COCs
	APTOS O BUENOS (%)	POR OVARIO	APTOS POR OVARIO
Aspiración folicular	63.17 (199/315) ^a	3.21 ± 1.19 ^a	2.03 ± 0.76 ^a
Slicing folicular	67.90 (220/324) ^{ab}	3.77 ± 1.25 ^b	2.56 ± 0.89 ^b
Disección-ruptura folicular	72.36 (254/351) ^b	4.08 ± 1.15 ^b	2.95 ± 1.11 ^c

Letras diferentes en las columnas significan diferencias estadística ($p < 0.05$)

COCs por ovario, y COCs Aptos (buenos) por ovario:

Se lograron recuperar 3.21, 3.77 y 4.08 COCs por ovario ($p < 0.05$), y 2.03, 2.56 y 2.95 COCs aptos por ovario ($p < 0.05$), utilizando aspiración folicular, slicing de ovarios y disección-ruptura folicular, respectivamente. Similarmente, Ruiz *et al.* (2011), aspirando folículos de 2 a 6 mm, recolectó en promedio 3.5 complejos ovocito-cúmulos (COCs) por ovario. En comparación con otras técnicas, se tiene el reporte de Brogliatti, *et al.* (2000) quienes recuperaron, sin realizar estimulación ovárica, 1.55 ovocitos por ovario de folículos > 3 mm, utilizando aspiración folicular guiada en llamas; y 0.8 ovocitos de categorías A y B por ovario. Los bajos resultados por la aplicación del método de aspiración folicular, sugieren que los ovocitos de alpaca serían más sensibles a la aspiración folicular, ya que este método provocaría daños a nivel de los cúmulos del COCs. Asimismo, la sensibilidad al daño del cúmulos, estaría explicado en parte, por la baja calidad de la dieta alimenticia de las alpacas en las alturas andinas, ya que se ha demostrado la influencia nutricional en la actividad ovárica en el caso de los vacunos (Ruiz *et al.*, 2008).

Tabla 2: Métodos de recuperación y cantidad de COCs aptos (buenos) por ovario derecho e izquierdo.

TECNICAS DE RECUPERACION	N° COCs APTOS EN OVARIO DERECHO	N° COCs APTOS EN OVARIO IZQUIERDO
	Aspiración folicular*	98 (49.25%)
Slicing folicular*	115 (52.27%)	105 (47.73%)
Disección-ruptura folicular*	130 (51.18%)	124 (48.82%)

* No hay diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$)

CONCLUSIONES

De folículos de 2-6 mm en la superficie del ovario, la disección-ruptura folicular provee mayores cantidades de COCs aptos para la MIV y FIV que el slicing folicular y la aspiración folicular; así mismo se recuperan mayor número de COCs por ovario y COCs aptos por ovario que por los otros métodos; ambos ovarios de la alpaca producen similares proporciones de COCs aptos.

BIBLIOGRAFIA

- Arlotto T, Lebfried-Rutlege ML, First N. 1990. *Theriogenology* 33:188. Abstract.
- Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. 2010. *Reprod Fertil Dev* 23(1):224-224.
- De Loose F, Van Vliet P, Van Maurik P, Kruip TAM. 1989. *Gamete Res* 24:197-204.
- Gonzales HM, Cornejo D, Davalos R, Barces O, Melliso E, Ruiz J. 2009. *Scientia* 11:183-193.
- Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A, Huanca T. 2007. *APPA-ALPA*, Cusco, Perú.
- Lu KH. 1990. National University of Ireland, *Pb.D. Thesis*.
- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. 2005. *Theriogenology* 63:2445-2457.
- Ratto M, Cervantes M, Norambuena C, Silvia M, Miragaya M, Huanca, W. 2011. *Anim Reprod Sci*, 2011, 127:100-105.
- Ruiz AZ, Domínguez C, Martínez N, Pinto L, Drescher K, Rossini J. 2008. *Zoot Trop* 26(2).
- Ruiz J, Landeo L, Artica M, Ratto M, Correa J. 2011. *Rev Inv Vet Perú* 22(3):206-212.

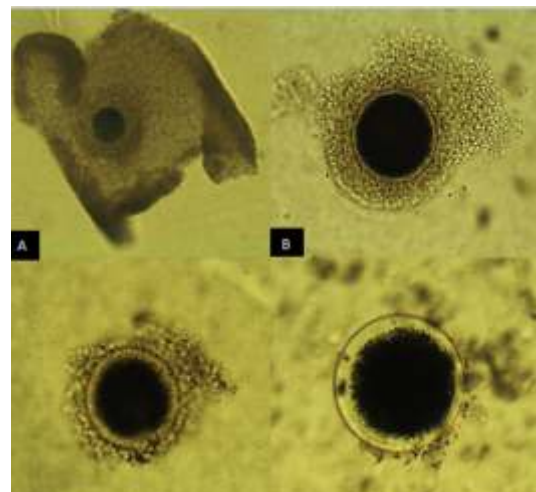


Figura 1. COCs de alpaca: A y B (Condición aptos o buenos), C y D (Condición no aptos o malos)