



Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*

Adirno Hernández-Fernández*¹✉, Hector Nava-Trujillo y Venuslira Vilchez ²

¹Universidad Nacional Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprum" Santa Bárbara de Zulia, Edo. Zulia-Venezuela.

²Unidad de Investigación en Biotecnología Animal – FCV Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.

Recibido Septiembre-2009/Aprobado Diciembre-2009

RESUMEN

Fueron utilizados, trescientos ovarios de bovinos mestizos obtenidos de matadero para determinar el efecto de la técnica de recolección (Aspiración y Slicing), sobre la cantidad y la calidad de ovocitos. En la técnica de aspiración todos los folículos visibles (2–8 mm de diámetro) fueron aspirados (aguja de 18G x 1 ½ pulg.) y en la técnica de "slicing" los folículos fueron seccionados con una hoja de bisturí número 22. Los ovocitos se clasificaron en base al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma en ovocitos madurables con más de dos capas compactas de células del cumulus zona pelúcida bien definida y citoplasma homogéneo; y ovocitos no madurables parcialmente desnudos de células del cumulus. La variable clasificatoria fue, técnica de recolección, % madurables, % no madurables, promedio ovocitos madurables/ovarios, promedio ovocitos no madurables/ovario y promedio ovocitos totales/ovario. El % ovocitos madurables/ovario $73,49 \pm 24,54$; $65,17 \pm 10,52$ y no madurables/ovario $26,5 \pm 24,54$; $34,82 \pm 10,52$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0,05$). El promedio de ovocitos/ovario resultó en $4,58 \pm 1,05$ y $7,03 \pm 3,34$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0,05$), el promedio de ovocitos madurables/ovario $3,24 \pm 1,11$ y $4,37 \pm 1,45$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P > 0,05$) y el promedio de ovocitos no madurables/ovario $1,33 \pm 1,40$ y $2,66 \pm 1,96$ para aspiración y slicing, respectivamente ($P < 0,05$). La recuperación de ovocitos utilizando la técnica de slicing fue mayor por ovario que para la aspiración, lo cual va a depender de la calidad y cantidad de ovarios disponibles.

Palabras Clave: Bovino, Ovocito, Aspiración, Slicing

ABSTRACT

Comparison of two recovery methods of bovine oocytes for *in vitro* maturation

They were used, three hundred ovaries of bovine obtained mestizos of slaughterhouse to determine the effect of the gathering technique (Aspiration and Slicing), about the quantity and the oocyte quality. In the aspiration technique all the visible follicles (2–8 mm of diameter) they were aspirated (needle of 18G x 1 ½ pulg.) and in the slicing technique the follicles were cut with a scalpel leaf I number 22. The oocytes was classified based on the I number of layers of cells of the cumulus and the appearance of the cytoplasm in oocytes madurables with but of two compact layers of cells of the heaps, area very defined pelúcida and homogeneous cytoplasm; and oocytes not partially naked madurables of cells of the heaps). The classificatory variable was, gathering technique,% madurables,% non madurables, average oocytes madurables/ovarium, average oocytes non madurables/ovarium and average oocytes totales/ovarium. The % oocytes madurables/ovarium $73,49 \pm 24,54$; $65,17 \pm 10,52$ and non madurables/ovarium $26,5 \pm 24,54$; $34,82 \pm 10,52$, for aspiration and slicing ($P > 0,05$). The average of oocytes/ovarium $4,58 \pm 1,05$ and $7,03 \pm 3,34$, for aspiration and slicing ($P > 0,05$), the average of oocytes madurables/ovarium $3,24 \pm 1,11$ and $4,37 \pm 1,45$, for aspiration and slicing ($P > 0,05$) and the oocytes average not madurables/ovarium $1,33 \pm 1,40$ and $2,66 \pm 1,96$, for aspiration and slicing ($P < 0,05$). The oocytes recovery using the slicing technique was bigger for ovary than for the aspiration, that which will depend on the quality and quantity of available ovaries.

Keywords: Bovine, Oocyte, Aspiration, Slicing.

INTRODUCCIÓN

La mayor importancia de los métodos de recolección de ovocitos es maximizar el número total de ovocitos y que estos

sean de buena calidad (citoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del cumulus) recuperados por ovarios,

que puedan ser utilizados para la maduración, fecundación y cultivo *in vitro*. (Gonzalez y col. 1992; Katska 1984).

Las células del cumulus son un complejo metabólico para el ovocito, por las uniones gap heterologas (LI y col. 2000; Shimada y col. 2001) y su papel como modulador del efecto de las hormonas y factores de crecimiento (Byskov y col. 1997; Shimada y col. 2003), durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, siendo documentada en varias especies (Petr y col. 1989; Apa y col. 1994; Shimada y Terada 2002; Yamashita y col. 2003). La maduración de ovocitos bovinos involucra modificaciones en el citoesqueleto de las células del cumulus, en términos de reorganización de microtubulus, la cual es dependiente de las hormonas y pueden regular la progresión y completación de la maduración ovocitaria (Allworth y Albertini 1993). Además la presencia de unas pocas capas de células del cumulus influyen en el proceso de maduración, lo cual puede estar influido por el método de recolección de los ovocitos. (Ahmed y col. 2001; Katska 1984)

Para la producción *in vitro* de embriones, la eficiencia del método de recolección y la clasificación de los ovocitos son un prerrequisito. Muchos métodos tales como la aspiración del material folicular, la disección de folículos aislados individualmente y el Slicing de los ovarios han sido descritos para obtener ovocitos inmaduros de ovarios procedentes de matadero. Sin embargo, técnicas como el slicing de los ovarios, lavado de los folículos con solución salina fosfatada y busferada (PBS) o la ruptura de folículos aislados puede incrementar el número de ovocitos recuperados comparado con la aspiración del material folicular. (Alm and Torner, 1994)

El objetivo del presente estudio fue comparar la recuperación en cantidad y calidad de ovocitos bovinos procedentes de ovarios de matadero por las técnicas de aspiración folicular y a través de Slicing.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, diseño experimental y colección de ovocitos

Un total de 300 ovarios no seleccionados fueron obtenidos de vacas mestizas, sacrificadas en un matadero local (MATOCA), ubicado en la población de la Concepción, Municipio Jesús Enrique Losada del Estado Zulia. Los ovarios fueron transportados en solución fisiológica al 0,9 %, a una temperatura de 30 - 35 °C, hasta el laboratorio de fecundación *in vitro* de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Alrededor de dos horas después de la recolección los ovarios fueron lavados tres veces sucesivamente en una solución de PBS.

Los ovarios colectados fueron divididos en dos grupos. En el grupo I (técnica de slicing 153 ovarios), los ovarios después de fijados con una pinza hemostática curva fueron superficialmente seccionados longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles con una hoja de bisturí, cada ovario fue sumergido por separado en un medio de lavado en una placa de petri.

En grupo II (técnica de aspiración, 147 ovarios), todos los folículos visibles de 2 - 8 mm de diámetro fueron aspirados con una jeringa de 10 mL con una aguja de 18G x 1 ½ pulgada, volúmenes de 5 - 10 mL fueron depositados en un cilindro graduado protegido de la luz.

En ambas técnicas, después de la colección de los ovocitos, el contenido del cilindro graduado, como de las placas de

petri fue dejado en reposo por aproximadamente 15 minutos, se procedió a decantar cuidadosamente el sobrenadante del cilindro graduado y se tomo el sedimento colocándolo en una placa de petri para su observación en una lupa estereoscópica a 40 X.

La clasificación de los ovocitos colectados fue determinado de acuerdo al número y compactación de las células del cúmulo y al grado de homogeneidad del citoplasma en dos clases; A ovocitos con más de dos capas compactas de células del cumulus, zona pelúcida bien definida y homogeneidad del citoplasma, competentes para la maduración *in vitro*; B ovocitos parcialmente desnudos de células del cumulus.

Análisis estadístico

Las variables analizadas fueron: técnica de recolección, número de ovarios, número total de ovocitos recolectados, número de ovocitos buenos, número de ovocitos malos, porcentaje de ovocitos buenos, porcentaje de ovocitos malos, promedio de ovocitos buenos por ovarios, promedio de ovocitos malos por ovario y promedio de ovocitos totales por ovario. Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y P 0,05 fue considerado significativa (SAS, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de la apariencia morfológica y la determinación del estado meiótico de ovocitos inmaduros, son parámetros importantes para mejorar los procedimientos *in vitro* de los gametos; tales como la maduración *in vitro* y la fecundación *in vitro* (MIV-FIV). Las características de los ovocitos originarios de los folículos antrales han sido descritas en diferentes especies, como en el ratón (Ericsson y Sorensen, 1974) y ganado (Rajakoski, 1960; Leibfried y Frist 1979).

Estudios en conejo y en ganado indican que a través de la técnica de slicing se recolectan un gran número de ovocitos comparado con la aspiración folicular (Arlotto y col, 1990).

El número de ovocitos recolectados fue de $124 \pm 35,14$ y $192 \pm 94,30$ para la técnica de aspiración y slicing, respectivamente (Tabla 1) obteniéndose un mayor número de ovocitos por la técnica de slicing, similar a lo reportado por González y col (1992), Hamano y Kuwayma (1993), Martino y col. (1992), Shirazi y col. (2005) y Das y col. (1996), sin que se observase diferencia significativa ($P > 0.05$). Lorenzo y col. 1996, reportaron en conejo una baja tasa de recuperación por la técnica de aspiración, que puede deberse a la dificultad en desprender los ovocitos de las células de la granulosa folicular. En la aspiración folicular se tiende a perder solo células del cumulus como ocurre en el ganado (Katska, 1984).

Tabla 1. Número y características de ovocitos recolectados de vacas mestizas por las técnicas de "Slicing" y Aspiración.

TÉCNICA	OV (N)	MEDIA ± DE EN OVOCITOS RECOLECTADOS					
		COC	BUENOS	MALOS	PmOVARIO	PmBUENOS	*PmMALOS
ASPIRACIÓN	147	124 ± 35,1	95,2 ± 48,9	28,8 ± 21,5	4,5 ± 1,0	3,2 ± 1,1	1,3 ± 1,4a
SLICING	153	192 ± 94,3	122,6 ± 54,7	70,0 ± 47,8	7,0 ± 3,3	4,3 ± 1,4	2,6 ± 1,9b

* Numero con letras diferentes entre la misma columna difieren significativamente (O<0,05)

COC: Complejo Cumulus Ovocito. PmOvarios: Promedio por Ovarios. PmBuenos: Promedio de ovocitos buenos. PmMalos: Promedio de ovocitos Malos

El número de ovocitos buenos y malos fue de 95,2 ± 48,92; 28,8 ± 21,51 y 122,6 ± 54,71; 70,0 ± 47,86, para la técnica de aspiración y slicing respectivamente (P> 0.05). Estos resultados indican que la técnica de slicing produce un número mayor de ovocitos malos por ovario. Martino y col.

(1992), atribuyen esta condición como un factor de la técnica de recuperación de poblaciones heterogéneas de ovocitos de todos los folículos pequeños en el estroma ovárico y que muchos de estos ovocitos no se han desarrollado (Figura 1).

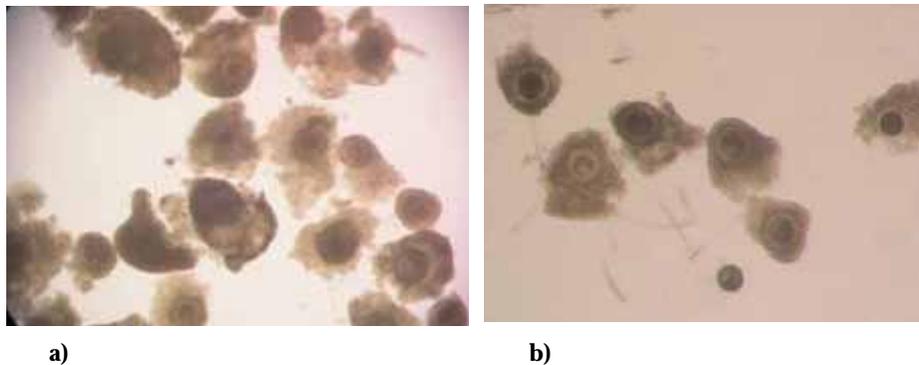


Figura 1. Microfotografías: ovocitos de bovinos vistas al lente 10X a) Buena calidad. b) Mala calidad.

En conejos no hubo diferencias significativas en la proporción de ovocitos recuperados por ambos métodos; indicando que las capas de células del cumulus alrededor del ovocito no fueron dañadas durante la aspiración, esto probablemente se debe al uso de una aguja de diámetro suficiente para no producir daño a las capas de células del cumulus de los ovocitos (Lorenzo y col. 1996)

El porcentaje de ovocitos buenos y malos por ovario fue de 73,49 ± 24,54; 65,17 ± 10,52 y 26,5 ± 24,54 ; 34,82 ± 10,52, para la técnica de aspiración y slicing respectivamente (P> 0.05), contrario a lo reportado por Choi y col. (1993) en equinos, Carolan y col. (1994) en Bovinos y Das y col. (1996) en

Búfalas, quienes observaron que la técnica de slicing produjo mayor cantidad de ovocitos de buena calidad por ovario, cuando se compararon con los ovocitos recolectados por la técnica de aspiración folicular.

El promedio de ovocitos por ovario fue de 4,58 ± 1,05 y 7,03 ± 3,34, para la técnica de aspiración y slicing, respectivamente (P> 0.05), el promedio de ovocitos buenos por ovario fue de 3,24 ± 1,11 y 4,37 ± 1,45, para aspiración y slicing, respectivamente (P> 0.05) y el promedio de ovocitos malos por ovario fue de 1,33 ± 1,40 y 2,66 ± 1,96, para aspiración y slicing respectivamente, observándose diferencia significativa (P< 0.05)

CONCLUSIONES

Ambos métodos pueden producir una gran cantidad de ovocitos de calidad aceptable para estudios *in vitro* en animales domésticos. Una rápida operación en la recolección de ovocitos por la técnica de aspiración, es una ventaja comparada con la técnica de Slicing (reduciendo posibles alteraciones del pH, temperatura y contaminación bacteriana de los medios); además el mejor método de recolección de ovocitos depende del número de ovarios para procesar, sin olvidar la experiencia del técnico.

A pesar de no observarse diferencias significativas en el promedio de ovocitos recuperados entre la técnica de

aspiración folicular y Slicing; el Slicing permitió recuperar un mayor número de ovocitos por ovario. Sin embargo el porcentaje de ovocitos buenos para maduración *in vitro* fue al menos numéricamente mayor cuando estos se recolectaron mediante la técnica de aspiración folicular.

Recomendaciones

Deben realizarse más ensayos en cuanto a la determinación del estado reproductivo de la fuente de ovocitos, así mismo en determinar el porcentaje de maduración de estos ovocitos.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y a la Unidad de Investigación en Biotecnología Animal (UNIBIO).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmed, S.**, Omaima, A., and Kandil, M. (2001). Factors affecting number of surface ovarian follicles and Oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:71-77.
- Allworth, A.**, and Albertini, D. (1993). Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accomplished by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton, *Dev. Biol.* 158: 101-112.
- Alm, H.** and Torner, H. (1994). In Vitro maturation of horse oocyte. *Theriogenology* 42:345-349.
- Apa, R.**, Lanzone, A., Miceli, F., Mastrandrea, M., Caruso, A., Mancuso, S. and Canipari, R. (1994). Growth hormone induces in vitro maturation of follicle-and cumulus-enclosed rat oocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 106: 207-212.
- Arlotto, T.**, Lebfried-Rutledge and Frist, N (1990). Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocyte from two localization in the ovary. *Theriogenology* 33:188.
- Byskov, A.**, Anderson, C., Hossaini, A. and Guoliang, X. (1997). Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiotic-activating substances when stimulated with FSH, *Mol. Reprod. Dev.* 46:296-305.
- Carolan, C.**, Monaghan, P., Gallagher, M. and Gordon, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro, *Theriogenology* 41 5:1061-1068.
- Choi, Y.**, Hochi, S., Braun, J., Sato, K. and Oguri, N. (1993). In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries, *Theriogenology* 40 5:959-966.
- Das, G.**, Jain, G., Solanki, V. and Tripathi, V. (1996). Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology.* 46:1403-1411.
- Ericsson, G.**, and Sorensen, R. (1974). In Vitro maturation of mouse Oocytes isolated from late, middle, and pre antral graafian follicles. *J. Exp. Zool.* 190:123-127.
- Gonzalez, R.**, Soto-Belloso, E., Delgado, N., Portillo, G., DeOndiz, A. y Velarde, J. (1992). Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Revista Científica- LUZ* 2: 11-13.
- Hamano, S.**, Kuwayma, M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine Oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration methods. *Theriogenology.* 39:703-712.
- Katska, L.** (1984). Comparison of two methods for recovery of ovarian Oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7:461-463.
- Leigfried, M.**, and Frist, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48:76-86.
- Li, R.**, Norman, R., Armstrong, D. and Gilchrist, R. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells, *Biol. Reprod.* 63 3:839-845.
- Lorenzo, P.**, Rebollar, P., Illera, M., Illera, J., Illera, M., and Alvarino, J. (1996). Characterization of Rabbit follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Arch. Zootec.* 45:25-35.
- Martino, A.**, Palomo, M., Mogas, T. and Paramio, M. (1992). Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization, *Theriogenology* 42 5:859-873.
- Petr, J.**, Zetova, L., Fulka, J. and Jilek, F. (1989). Quantitative inhibitory influence of porcine cumulus cells upon the maturation of pig and cattle oocytes in vitro, *Reprod. Nutr. Dev.* 29 5:541-549.
- Rajakoski, E.** (1960). The ovariam follicular system in sexually mature heifers with special referente to seasonal cyclical and left-right variations. *Acta Endocr. (Copenhagen) Supp.* 52:1.
- Shimada, M.** and Terada, T. (2002). FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes, *Mol. Hum. Reprod.* 8 7:612-618.
- Shimada, M.**, Ito, J., Yamashita, Y., Okazaki, T. and Isobe, N. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes, *J. Endocrinol.* 179 1: 25-34.
- Shimada, M.**, Maeda, T. and Terada, T. (2001). Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes, *Biol. Reprod.* 64 4:1255-1263.
- Shirazi, A.**, Shams-Esfandabadi, N. and Hosseini, N. (2005). A comparison of two recovery methods of ovine oocyte for in vitro maturation. *Small Ruminat Research.* 58, 3:283-286.
- Statistical Analysis System.** (2000). User's Guide. SAS. Institute Inc., Cary. N. C. USA.
- Yamashita, Y.**, Shimada, M., Okazaki, T., Maeda, T. and Terada, T. (2003). Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes, *Biol. Reprod.* 68 4:1193-1198.

