

COMPARACION DE DOS METODOS DE RECOLECCION DE OOCITOS DE OVARIOS DE BOVINOS MESTIZOS SACRIFICADOS

Comparisson of two methods of oocytes collection from sacrificed bovine crossbred ovaries

Rumualdo González* **
 Eleazar Soto Belloso* **
 Nelson Delgado*
 Germán Portillo*
 Aitor De Ondiz**
 Juan Carlos Velarde**

* Facultad de Ciencias Veterinarias.
 Universidad del Zulia,
 Maracaibo. Estado Zulia, Venezuela.

** Venezolana de Inseminación Artificial
 y Transplante de Embriones. C.A.
 Maracaibo. Estado Zulia. Venezuela.

RESUMEN

Doscientos ovarios no seleccionados fueron obtenidos de 100 Vacas y novillas mestizas (Cebú x Razas Lecheras) no gestantes sacrificadas en un matadero local. Los ovarios se transportaron hasta el laboratorio en solución salina estéril y mantenidos a 30-35° C. De los primeros 100 ovarios, los oocitos de folículos vesiculares de 2-5 mm de diámetro fueron recuperados por el método de aspiración usando una aguja 18 G conectada a una jeringa de 10 ml. Los oocitos de los restantes 100 ovarios fueron obtenidos por el método de disección utilizando una hojilla de bisturí. Después de recuperados los oocitos, se clasificaron de acuerdo a las características de su cumulus ooforus^[6]. De un total de 385 oocitos, 40.3%, 48.3% y 10.9% fueron considerados clase A, B y C, respectivamente, con una media de 3.8 oocitos por ovario usando el método de aspiración. Con el método de disección 1.280 oocitos fueron colectados de los cuales 59.3%, 33.0% y 7.5% fueron considerados clase A, B y C, respectivamente. La media de oocitos por ovario fue de 12.8. Estos resultados indican que en hembras bovinas mestizas un número significativamente alto ($P < 0.01$) del complejo cumulus-oocitos fueron obtenidos usando el método de disección cuando este se comparó con el método de aspiración.

Palabras claves: Oocitos, recolección, métodos, bovinos mestizos.

ABSTRACT

Two hundred non selected ovaries were collected from 100 open cows heifers crossbred (Zebu x Dairy breeds) slaughtered at a local abattoir. The ovaries were

transported to the laboratory in sterile saline solution held at 30-35° C. From the first 100 ovaries, oocytes from vesicular follicles of 2-5 mm diameter were recovered by the aspiration method using a 18 gauge needle attached to a 10 ml syringe. Oocytes from the second 100 ovaries were obtained from a dissection method using a blade scalpel. After recovery the oocytes were classified according to their cumulus oophorus characteristics^[6]. From a total of 385 oocytes 40.3%, 48.3% and 10.9% were considered class A, B and C respectively with an average of 3.8 oocytes per ovarie using the aspiration method. With the dissection method 1.280 oocytes were collected from which 59.3%, 33.0% and 7.5% were considered class A, B and C respectively. The average oocyte per ovarie was 12.8. These results indicate that a significantly higher number ($P < 0.01$) of cumulus oocytes were obtained using the dissection method when compared with the aspiration method in crossbred female bovine.

Key words: Oocytes, collection, methods, bovine crossbred.

INTRODUCCION

Los oocitos primarios son actualmente utilizados como sustrato ooplásmico en los programas de investigación sobre fertilización in-vitro de óvulos y producción de clones^[6,7]. Los ovarios de bovinos sacrificados comercialmente son la principal fuente de oocitos, dada su abundante disponibilidad, fácil obtención y bajo costo^[7].

Actualmente, los métodos propuestos para la obtención de oocitos, consisten en la aspiración de folículos vesiculares^[1,2]; el aislamiento y posterior ruptura de los folículos^[8]; y el seccionamiento y lavado de los ovarios^[3,10]. Investigaciones recientes han demostrado que la tasa de recuperación, como la calidad de los oocitos esta influenciada por los métodos de recolección empleados^[5,8,9].

El objetivo de este trabajo fue comparar los métodos de aspiración de folículos y el de seccionamiento ovarico en la obtención de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados.

MATERIALES Y METODOS

Un total de 200 ovarios no seleccionados fueron obtenidos de 100 vacas y novillas mestizas (Cebú x razas lecheras) no gestantes sacrificadas en el matadero industrial FRICAPECA de la ciudad de Machiques del Estado Zulia. Los ovarios fueron transportados en solución salina (8.5 g/L) a una temperatura de 30-35° C hasta los laboratorios de la empresa VIATECA a 25 Km del matadero de FRICAPECA. Alrededor de 2-3 horas después de la recolección, los ovarios fueron lavados tres veces sucesivamente con la solución salina.

En el primer experimento 100 ovarios fueron empleados para ensayar la técnica de punción y aspiración de los folículos^[2]. Folículos vesiculares de 2-5 mm de diámetro fueron punzados y aspirados empleando una jeringa desechable de 10 ml, conteniendo 1 ml de solución salina y aguja 18G. Volúmenes de 5 ml de líquido folicular fueron depositados en tubos de ensayo de 10 ml. Después de un reposo de 10 minutos se aspiró cuidadosamente con una pipeta pasteur el sedimento de cada tubo, siendo éste depositado en placas de Petri de 100 x 100 mm^[1]

En el segundo experimento, 100 ovarios fueron empleados para evaluar la técnica de seccionamiento de los ovarios en la recolección de oocitos^[4,10]. Los ovarios, después de fijados con una pinza hemostática curva, fueron superficialmente seccionados longitudinal y transversalmente con una hoja de bisturí. Para la recuperación de los oocitos, los ovarios fueron lavados por inmersión en solución salina fisiológica conteniendo 0.5 mg/ml de alcohol polivinílico. El líquido resultante fue pasado a través de una unidad de filtración EmCon (EmCon embryo filter Inc.), con el objeto de lavar y separar en forma Simultánea los complejos oocitos-cumulus. El concen-

trado remanente de cada filtración fue vertido en placas de Petri de 100 x 100 mm. Los oocitos de cada experimento fueron identificados mediante un microscopio estereoscópico 40X y posteriormente clasificados según criterios establecidos por Shioya y col.^[6], en oocitos A (con cumulus denso y compacto), oocitos B (parcialmente desnudos, con un estrato delgado de células o un pequeño remanente de células del cumulus) y oocitos C (desnudos o desprovistos del cumulus ooforus).

RESULTADOS Y DISCUSION

De 100 ovarios en los cuales se aplicó la técnica de aspiración, se obtuvieron 385 oocitos para un promedio de 3.8 oocitos por ovario con una calidad de 156 (40.3%), 186 (48.3%) y 42 (10.9%) clase A, B y C, respectivamente. En el segundo experimento, donde se empleó la técnica de seccionamiento, de 100 ovarios procesados fueron colectados 1.280 oocitos, para un promedio de 12.8 oocitos por ovarios. Según la evaluación morfológica de los oocitos, 724 (59.3%), 403 (33.0%) y 92 (7.5%) fueron clase A, B y C, respectivamente, ver TABLA. Al comparar ambas técnicas, sobre la tasa de recolección de oocitos, se demostró que el método de seccionamiento resultó más efectivo al lograr una diferencia considerable ($P < 0.01$) de 8.3 oocitos más por cada ovario respecto a la técnica de aspiración folicular. Recientemente Vergos y col.^[8] y Lonergan y col.^[4,5], demostraron igualmente una menor eficacia del método de aspiración respecto al método de disección folicular.

Considerando los oocitos clase A y B como de mejor calidad para el cultivo, el rendimiento de ambas categorías fue de 88.6% y 92.3% ($P > 0.05$) oocitos recolectados por los métodos de aspiración y seccionamiento respectivamente.

Los resultados de esta investigación demostraron una vez más, la superioridad del método de seccionamiento respecto al de aspiración, al lograr un promedio de 12.8 y

TABLA
TASA DE RECOLECCION DE OOCITOS SEGUN METODO EMPLEADO

| Método de Recolección | Nº de Ovarios | CLASIFICACION DE OOCITOS RECOLECTADOS | | | Oocitos/Ovario | |
|--------------------------|---------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| | | Total | A | B | | C |
| Aspiración | 100 | 385 | 156 (48.3%) | 186 (48.3%) | 42 (10.9%) | 3.8 ^a |
| Seccionamiento | 100 | 1.280 | 724 (59.3%) | 403 (33.0%) | 92 (7.5%) | 12.8 ^b |

Las cifras entre parentesis representan porcentajes
a, b ($P < 0.01$)

3.8 oocitos por ovario por cada procedimiento. Este hecho representa un importante beneficio en la producción de oocitos destinados a los programas comerciales y de investigación sobre maduración (MIV), fertilización (FIV) y cultivo (CIV) in vitro de oocitos bovinos.

Estudios futuros orientados a evaluar el potencial de MIV/FIV/CIV de oocitos según el método de recolección emplearían justificadamente. Whitesell y col.^[10] reportaron una mayor tasa de desarrollo de embriones productos de MIV/FIV de oocitos obtenidos por aspiración respecto al método de seccionamiento. Convencionalmente, solo folículos de 2-6 mm de diámetro son seleccionados para obtener oocitos por aspiración directa de los mismos. El empleo del método de seccionamiento ovarico, involucra una mayor proporción de la población de folículos vesiculares presentes. Esta situación condiciona, por lo tanto, que la cantidad como el potencial de MIV/FIV/CIV de oocitos debería ser diferente entre ambos métodos de recolección. Lonergan y col.⁴ lograron una tasa significativamente superior de oocitos con cumulus denso y de embriones desarrollados por MIV/FIV/CIV de oocitos provenientes de folículos mayores de 6 mm de diámetro comparados con aquellos folículos de 2-6 mm. Estos autores demostraron claramente una relación entre el tamaño del folículo y la calidad de oocitos, habiéndose especulado sobre una posible influencia de factores de crecimiento en los folículos de mayor tamaño.

Más conocimientos son necesarios lograr para identificar los diferentes factores relacionados con la producción y calidad de los oocitos destinados a los programas de MIV/FIV/CIV.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[1] Gonzalez F., R., Sato, E., Landaeta, A., Velarde, J.C. De

Ondiz, A. and Delgado, N.J. Recollection and evaluation of oocytes from sacrificed bovine crossbred ovaries. *Rev. Científica. Fac. Vet. Univ. Zulia*. 2(1): 22-24. 1992.

- [2] Kanagawa, H. Recovery of infertilized ova from slaughtered cattle. *Jap. J. Vet. Res.* 27: 72-76. 1979.
- [3] King, W.A., Yadav, B.R., Xu, K.P., Picard, L., Sirard, M.A., Verini Suplizi, A. and Betteridge, K.J. The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 36(5): 779-788. 1991
- [4] Lonergan, P., Sharif, H., Monagan, P., Wahid, H., Gallagher, A. and Gordon, H. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 37(1): 248. 1992
- [5] Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gallagher, M. and Gordon, I. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology* 35(1): 231. 1991
- [6] Shioya, Y., Kuwayama, H., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 30: 3. 1988
- [7] Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. Development of Bovine oocytes matured, fertilized and culture in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*. 35(6): 1197-1207. 1991
- [8] Vergos, F., Kinis, A., Lonergan, P., Sharif, H., Gallagher, M. and Gordon, I. Effect of recovery method on the yield of embryo after in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *J. Reprod. Fert. Abst.* 6:68. 1990
- [9] Wahid, H., Gordon, H., Sharif, P., Lonergan, P., Monagan, P. and Gallagher, M. Effect and efficiency of recovery methods for obtaining ovine follicular oocytes for in vitro procedures. *Theriogenology* 37(1): 318. 1992.
- [10] Whitesell, D.R., Hill, K.G., Miller, D.R., Jones, A.L. and Wilson, J.M. In vitro embryo production from oocytes recovered from excised ovaries of terminally ill cows. *Theriogenology*. 37(1): 322. 1992.