

## Efecto de la presión de vacío sobre las características funcionales de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero

*Effect of aspiration vacuum on functional characteristics of bovine oocytes recovered from sloughhouse ovaries*

**Perea G., F.P.<sup>1,2,3</sup>, Quezada C., A.I.<sup>1</sup>, Mocha Z., A.R.<sup>1</sup>, Argudo G., D.E.<sup>1</sup>, Ayala G., L.<sup>1</sup>, Méndez, S.M.<sup>1</sup>, Soria, M.E.<sup>1</sup>, Galarza A., L.R.<sup>1</sup>, Hernández F., H.J.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Agrarias, Universidad de Los Andes, Venezuela.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Venezuela.

Autor de correspondencia: fernando.perea@ucuenca.edu.ec

### 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de cualquier método para obtener ovocitos es lograr el mayor número de ellos viables para maximizar la producción de embriones *in vitro*. Existen deferentes factores que afectan la calidad de los ovocitos al momento de su recuperación mediante la técnica de ovum pick up (OPU), tales como el tipo y calibre de aguja, frecuencia de aspiración, raza y condición corporal de la vaca, etc. Entre ellos, la presión de vacío que se utiliza para su recuperación ha sido reiteradamente documentada (Hasler, 1998; Ward, Lonergan, Enright, & Boland, 2000; Boni, 2012).

Las evidencias indican que la presión de vacío, durante la aspiración de ovocitos mediante OPU, afecta el número y características de los ovocitos recuperados, así como también su competencia para madurar y desarrollarse a blastocistos luego de la fecundación *in vitro* (FIV) (Hasler, 1998; Vos, Henriksen, & Dielman, 1999; Ward *et al.*, 2000).

Ward *et al.* (2000) evaluaron el efecto de cuatro presiones de vacío (30, 50, 70, 90 mmHg) sobre la competencia de los ovocitos de progresar a blastocistos luego de la FIV. Aunque la presión aplicada durante la OPU no afectó el número de ovocitos recuperados, como si lo indicaron otros estudios (Vos *et al.*, 1999), los ovocitos aspirados con una presión de 90 mmHg comprometieron su viabilidad y redujeron en más de 20% lograr iniciar la segmentación luego de la FIV. Aun mas, las presiones de vacío superiores a 50 mmHg redujeron en promedio 2.8 y 4.5 veces la capacidad de los embriones para progresar a los estadios de blastocistos y blastocistos protruidos respectivamente (Ward *et al.*, 2000).

Se estableció como objetivo de este estudio determinar el efecto de la presión de vacío sobre ovocitos colectados de ovarios de matadero en la región sur de la sierra ecuatoriana a más de 2,500 msnm.

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con ovarios bovinos obtenidos de un camal municipal de Cuenca, y transportados a una temperatura entre 35 y 37°C en un tiempo no mayor a 3 horas, hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicado en la granja de Irquis, a 25 km de la ciudad de Cuenca.

Los tejidos adyacentes de los ovarios fueron removidos, e inmediatamente fueron lavados con cloruro de sodio estéril al 0.9% a 37°C de dos a tres veces hasta que el contenido líquido estuvo

completamente cristalino. Se aspiraron los complejos cúmulos ovocitos (COCs) de folículos de 2 a 8 mm de diámetro. La punción se realizó con una aguja de calibre 18G x 1.5 pulgadas conectada a una bomba de vacío (BV 003D, WTA®, Brasil). Los ovarios recolectados fueron divididos al azar en tres grupos y cada uno fue aspirado con una de las siguientes presiones de vacío: 80, 65 y 50 mmHg. Luego de la búsqueda e identificación de los COCs, estos se clasificaron según el criterio de Hawk & Walk (1994), usándose únicamente los de categoría A y B.

Una muestra representativa de los COCs (30%) fue usada para determinar la integridad de la membrana. Para ello los COCs fueron incubados con Hialuronidasa (1mg/ml; p/v) (Sigma, USA), por un minuto, seguido por pipeteo por 5 minutos, con la finalidad de separar las células del cúmulo de la zona pelúcida. Luego de ser lavados con H-SOF (fluido oviductal sintético) los ovocitos fueron incubados con Azul de Tripán (AT) por 10 minutos, y posteriormente evaluados en un estereoscopio de luz diascópica.

El 70% restante de COCs fueron incubados en un medio TCM 199, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0.75 mg/ml de L-Glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina, en una estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, humedad del 90% y temperatura de 38.5°C por 24 horas.

Tras ser madurados, los COCs fueron desnudados como se indicó anteriormente, y se expusieron por 15 minutos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma, USA) en concentración de 1µg/ml (p/v), con la finalidad de determinar qué proporción de ellos se encontraban en metafase II (MII), mediante la identificación de 1<sup>er</sup> corpúsculo polar en el espacio perivitelino, en un microscopio invertido de fluorescencia.

Se consideraron como variables independientes el tratamiento (80, 65 y 50 mmHg de presión de vacío) y la repetición (n = 12); y como variables dependientes, la tasa de recuperación de ovocitos (número de COCs recuperados sobre el número de folículos aspirados por cien), porcentaje de ovocitos de categoría A y B (número de COCS de categoría A y B sobre el total de COCs obtenidos por cien), porcentaje de ovocitos viables (número de COCS positivos al AT sobre el total de COCs expuestos al colorante por cien), porcentaje de ovocitos maduros (número de COCS maduros sobre el total de COCs puestos a madurar por cien). Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM del SAS (Statistical Analysis System, 2012). Las medias se compararon con el procedimiento LSmeans del SAS.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de recuperación no difirió estadísticamente entre tratamientos, aunque hubo una diferencia de 5.8 y 8.1 puntos porcentuales entre T2 (65 mmHg) con respecto a T1 (50 mmHg) y T3 (80mmHg) respectivamente (Tabla 1), coincidiendo con los hallazgos de Hashimoto, Takakura, Kishi, Sudo, Minami *et al.* (1999), quienes compararon cuatro presiones de vacío (40, 80, 120 y 160 mmHg) y no encontraron diferencia en la tasa de recuperación. Bols *et al.* (1996) determinaron que con presiones por encima de 70 mmHg la tasa de recuperación de ovocitos aumentó y su calidad disminuyó.

Los COCs de calidad A y B fueron proporcionalmente más numerosos en T1 y T2 que en T3. Asimismo, los ovocitos viables fueron similares entre tratamientos; mientras que en la tasa de maduración fueron diferentes únicamente T1 y T3 ( $P<0.05$ ), resultando que la aspiración de los folículos con una presión de vacío de 50 mmHg fue mejor que los aspirados con 80 mmHg.

Ha sido ampliamente documentado que la presión de vacío afecta el número y calidad de los ovocitos aspirados (Bols *et al.*, 1996; Fry, Niall, Simpson, Squires, & Reynolds, 1997; Hasler *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000), así como la competencia de estos para madurar, clivar y progresar al estado de blastocito (Bols *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000). Aparentemente las fuerzas físicas que se ponen en juego durante el proceso de aspiración, pueden afectar la capacidad funcional de los ovocitos, tal como lo demuestra este y numerosos estudios citados previamente.

**Tabla 1.** Efecto de la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre la tasa de recuperación, calidad, viabilidad y tasa de maduración de ovocitos bovinos (media  $\pm$  error estándar).

Características de lo ovocitos	Presión de vacío (mmHg)		
	50	65	80
Nro. de ovarios	84	84	84
Nro. folículos aspirados	1162	961	1013
Nro. folículos/ovario	13.8	11.4	12.0
Tasa de recuperación (%)	58.8 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	64.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	56.5 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
Ovocitos A y B (%)	88.6 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	88.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	81.7 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
Ovocitos viables (%)	83.4 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	85.5 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	80.4 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>
Ovocitos maduros (%)	52.5 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	49.4 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	45.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>

Letra diferente en la misma línea difiere <sup>a,b</sup>  $P < 0.05$

#### 4. CONCLUSIONES

La presión de vacío utilizada para aspirar los COCs de los folículos afectó algunas de las variables estudiadas. Aplicando 80 mmHg se obtuvo una menor proporción de COCs de categoría A y B y de ovocitos maduros comparado con 65 y 50 mmHg.

#### REFERENCIAS

- Bols, P., Van Soom, A., Ysebaert, M., Vandenheede, J., de Kruif, A. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45, 1001-1014
- Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 9(3), 362-369.
- Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires T. J., Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47, 977-987.
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M. (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*, 51, 757-765.
- Hasler, J. F. (1998). The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, 76(Suppl. 3), 52-74.
- Hawk, H. W., Wall, R. J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology*, 41(8), 1585-1594.
- Statistical Analysis Systems Institute. (2012). *User's Guide*. University North of Caroline, USA. Version 12.2
- Vos, P. L. A. M., Henriksen, P. J. M., Dielman, S. J. (1999). Results of oocytes from eCG stimulated bovine follicles at the time of preovulatory LH surge are severely affected by the system of aspiration. *Theriogenology*, 51, 310.
- Ward, F. A., Lonergan, P., Enright, B. P., Boland, M. P. (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pickup technology. *Theriogenology*, 54, 433-446.