

Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes

Evaluation of the quality of bovine oocytes obtained from follicles with three different sizes

Estrella, C.A., Suconota, A.G.*, Ayala, L.E.

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Autor de correspondencia: gabriela.suconotap@ucuenca.ec

1. INTRODUCCIÓN

La producción de embriones in vitro (PIV) es una biotecnología muy desarrollada a nivel mundial. Por esto, es común que hoy en día se busque adaptarla a los recursos biológicos, económicos y técnicos de cada lugar, con la finalidad de desarrollar nuevos aportes científicos (Peláez, 2011) así como producir embriones a menor costo, maximizando los recursos genéticos (Martínez, 2013). Los ovocitos necesarios para PIV son obtenidos de ovarios de matadero o de animales vivos utilizando para ello la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU) (Herradón, Quintela, Bece rra, Ruibal, & Fernández, 2007). Sin embargo, el porcentaje final de embriones transferibles obtenidos por estas biotecnologías es bajo, debido a la calidad variable de los ovocitos (Lonergan, Rizos, Gutierrez-Adan, Fair, & Boland, 2003).

Para la selección de COCs generalmente se utilizan criterios morfológicos, que se basan en la evaluación del número de capas y compactación de las células del cúmulo oóforo; así como en la homogeneidad y tonalidad del citoplasma. Otra forma utilizada es la medición del diámetro ovocitario; lamentablemente, este método es poco práctico, pues requiere la eliminación de las células del cúmulo, comprometiendo la viabilidad del ovocito. Varios estudios mencionan que para obtener ovocitos de buena calidad se debe aspirar folículos entre 4-8 mm, descartando los <4 mm y los >8 mm, sin embargo, no está claro si estos folículos podrían proporcionar ovocitos de buena calidad y en qué porcentaje (Hansen, 2001). Por lo expuesto, en el presente estudio se evaluó la calidad de los ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los 648 ovarios usados en este estudio fueron recolectados en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces por semana, y transportados en solución salina al 9%, entre 35 - 37°C. 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. Los folículos de cada ovario fueron agrupados de acuerdo a su tamaño, en G1 <4 mm, en G2 entre 4 y 8 mm, y, en G3 >8 mm. Se aspiraron 3,373 folículos (G1: 1,964); (G2: 1,703) y (G3: 336) con aguja de calibre 21G, conectada a una bomba de vacío (WTA BV 003D ®) a una presión de 65 mmHg. Los COC's (complejo cúmulo ovocito) obtenidos de cada grupo fueron clasificados de acuerdo al criterio de Hawk & Wall, (1994) en calidad AB, considerados aptos (ovocito con varias capas de células del cúmulo, con citoplasma homogéneo y fino) y calidad C, no aptos (ovocito denudados o con cúmulo completamente expandido, citoplasma con áreas muy claras o muy oscuras). Los datos recolectados fueron analizados mediante un modelo lineal general mixto con el procedimiento MIXED del SAS (2013) vw 9.3. El modelo que se utilizó fue: $Y_{ijk} = T_i + A_j (T_i) + E_{ijk}$ y se aplicó la prueba de Tukey-Kramer 19 para la comparación múltiple de las medias de mínimos cuadrados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la aspiración de los ovocitos de los tres grupos de folículos en estudio se determinó que la cantidad de COC's recuperados no presentaba diferencia estadística ($P>0.05$). Sin embargo, al valorar la calidad de los COC's se estableció un mayor porcentaje de ovocitos aptos (A y B) en el grupo 2 (folículos de 4 a 8 mm) en relación a G1 (folículos < 4 mm) y G3 (folículos > 8 mm) ($P<0.05$), Tabla 1. Además, el porcentaje de COC's aptos obtenidos en G2 fue aproximadamente el doble de aquellos clasificados como no aptos, es decir, al puncionar folículos que tenían de 4 a 8 mm, se pudo obtener un 66% de ovocitos viables para la PIV. Lonergan, Monaghan, Rizos, Boland, & Gordon (1994) establecieron que los folículos de entre 3 y 8 mm proporcionan un 68.8% de ovocitos aptos, lo cual mantiene concordancia con los resultados de la presente investigación para esa categoría de COC's.

Tabla 1. Porcentaje de COC's recuperados por aspiración folicular en los tres grupos de folículos en estudio y clasificados como aptos (tipos A y B) y no aptos (tipo C).

Complejo cúmulo	G1 (<4mm)	G2 (4-8mm)	G3 (>8mm)
Tasa de	68.3±5.83 ^a	74.3±3.69 ^a	64.0±3.33 ^a
Categoría AB (%)	43.7±3.27 ^{aA}	66.0±2.23 ^{bB}	54.7±4.80 ^{aA}
Categoría C (%)	56.3±3.27 ^{aB}	34.0±2.23 ^{bA}	45.3±4.79 ^{aA}

^{a,b} = letras diferentes indican diferencia estadística entre filas ($P<0,05$). ^{A,B} = letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas ($P<0,05$)

Caamaño, Maside, Gil, Muñoz, Cuello *et al.* (2011) manifestaron que la eficiencia de la maduración, fertilización y PIV varía dependiendo de la calidad de los ovocitos, así como de las características de cada especie, obteniendo un 98.2% en porcino, mientras que en ovocitos bovinos el porcentaje es todavía mayor estando cerca del 90% (Dieleman, Hendriksen, Viuff, Thomsen, Hyttel *et al.*, 2002).

Los grupos 1 (folículos <4 mm) y 2 (folículos >8 mm), proporcionaron alrededor de un 50% de ovocitos aptos para el proceso de fecundación in vitro, lo cual concuerda con los resultados de Raghu, Nandi, & Reddy (2002), quienes en un estudio en búfalas establecieron que los ovocitos provenientes de folículos pequeños pueden alcanzar competencia. De Santis, Cino, Coticchio, Fusi, Papaleo *et al.* (2007) indicaron que la selección de ovocitos con las mejores características morfológicas no asegura la llegada a buen término de desarrollo de embriones, por lo que sugiere realizar o buscar parámetros más confiables como la prueba de Test Brilliant Cresyl Blue o del fluorocromo Diacetato de Fluoresceína.

4. CONCLUSIONES

La tasa de recuperación de COC's fue estadísticamente similar entre tamaños foliculares. En general, un 50% de los ovocitos obtenidos de folículos menores a 4 mm y mayores a 8 mm fueron clasificados como aptos (categoría A y B) para iniciar un proceso de fecundación in vitro. No obstante, en estos folículos la proporción de COC's de categoría A y B, duplicó los de categoría C, concordando con lo reportado en otros estudios.

REFERENCIAS

- Caamaño, J. N., Maside, C., Gil, M. A., Muñoz, M., Cuello, C., Díez, C., Sánchez-Osorio, J. R., Martín, D., Gomis, J., Vázquez, J. M., Roca, J., Carrocera, S., Martínez, E. A., Gómez, E. (2011). Use of polarized light microscopy in porcine reproductive technologies. *Theriogenology*, 76(4),

669-677.

- De Santis, L., Cino, I., Coticchio, G., Fusi, F., Papaleo, E., Rabellotti, E., Brigante, C., Borini, A., Ferrari, A. (2007). Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(3), 338-345. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60348-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60348-3)
- Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J., Viuff, D., Thomsen, P. D., Hyttel, P., Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Kruip, T. A., Niemann, H., Gadella, B. M., Bevers, M. M., Vos, P. L. (2002). Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, 57(1), 5-20. Hansen, P. J. (2001). Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *Animal Science*, 80(2), 33-44.
- Hawk, H. W., Wall, R. J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571-1583.
- Herradón, P., Quintela, L.A., Becerra, J. J., Ruibal, S., Fernández, M. (2007). Fecundación In vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15(1), 33-40.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 37(1), 48-53.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 259-267.
- Martínez, Y. (2013). *Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro*. Tesis de Maestría, 36 pp. Universidad de Oviedo. Disponible en http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM_Yaiza_Martinez.pdf
- Peláez, V. (2011). *Producción in vitro de embriones*. Tesis de pregrado, 86 pp. Universidad de Cuenca. Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Raghu, H. M., Nandi, S., Reddy, S. M. (2002). Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(1-2), 55-61.