

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE OVOCITOS INMADUROS PARA FERTILIZACIÓN *in vitro* FIV OBTENIDOS DE HEMBRAS *Bubalus bubalis* ENVIADAS A MATADERO

Mara Dunia Quintana*, P.E.C. Campos*, P. Herrera*, C. Gallego**, E. Padrón***

*Universidad Agraria de la Habana (UNAH). Facultad de Medicina Veterinaria.
Departamento Clínica. Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, San José de las Lajas,
Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: mdutra@isch.edu.cu; **Instituto de Ciencia Animal (ICA),
Carretera Central km 47 1/2, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba; ***Empresa Pecuario
Genética Bubalina «El Cangre», El Cangre km 6 1/2, Güines, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: Con el objetivo de comparar dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros se obtuvieron complejos cúmulos-ovocitos (CCO) a partir de ovarios de hembras *Bubalus bubalis* sacrificadas en el matadero. El traslado se efectuó en 500mL de solución salina en un periodo de 6 horas. Se emplearon dos técnicas para extraer los CCO de folículos entre 2 y 8mm de diámetro, la punción folicular (PF) con agujas 18Gx1½ y la disección quirúrgica de los folículos superficiales (DF) utilizando un micro-escalpelo oftálmico. Para la clasificación de los CCO se utilizó el criterio de la integridad de las capas de células del cúmulo y las características del citoplasma del ovocito. Se obtiene como promedio 34.25 CCO por el método de PF y 46.80 CCO por DF con diferencias significativas de 99% de confianza entre ambos. Por el método de PF se obtienen 28 CCO calidad I, lo cual significa 20,43% del total para un promedio de 2.7CCO/ovario; resultados inferiores a la técnica de DF en la que se obtuvieron 139 CCO de calidad I con 6.3 CCO/ovario representando el 59,4% del total de los ovocitos recolectados. Utilizando el método de DF se recolecta mayor cantidad de CCO en cantidad y calidad que con el método de PF.

(Palabras clave: ovocitos; recolección; métodos; *Bubalus bubalis*)

COMPARISON OF TWO RECOLLECTION METHODS OF IMMATURE OOCYTES FOR *in vitro* FERTILIZATION IVF DERIVED FROM *Bubalus bubalis* FEMALES SENT TO SLAUGHTER

ABSTRACT: Cumulus-oocyte complexes (COCs) were extracted from buffalo ovaries (*Bubalus bubalis*) slaughtered in slaughterhouse. COCs were transported to the laboratory for six hours in 500 ml of saline solution at 29.1°C. COCs extraction was carried out between 2 and 8 mm of diameter using two methods, the follicular puncture (FP) with 18Gx1½ needle and surgical dissection (SD) of follicles using an ophthalmic micro-scalpel. In order to classify COCs, the integrity of the cumulus layers and the oocytes cytoplasm characteristics were taken into account. The results showed significant differences of 99% in the average of COCs recovery and their quality when compared to FP and SD methods. By the FP method, the average of COCs recovery was of 28 and 2.7 COCs per ovary with quality obtained, which represents 20,43% of all oocytes recovered in this group. However, the SD method achieved an average of COCs recovery of 139 and 6.3 COCs per ovary, representing 59,4% of all oocytes recovered for this group. These results demonstrate that the SD method for COCs collection is more efficient than the FP method.

(Key words: oocytes; collection; methods; *Bubalus bubalis*)

INTRODUCCIÓN

La *fertilización in vitro* (FIV) es una metodología que proporciona la posibilidad de producir embriones genéticamente manipulados y luego transferirlos (1). Por esta razón, se hace necesario conseguir una fuente alternativa que permita la obtención de ovocitos maduros y embriones a gran escala disminuyendo el costo, y poder así seguir avanzando en el desarrollo de las biotecnologías de la reproducción. Una de las vías alternativas para la optimización de las técnicas de producción "in vitro" es precisamente el empleo de ovarios de hembras enviadas a matadero como una fuente más económica para generar ovocitos maduros y embriones.

Actualmente, los métodos propuestos para la obtención de ovocitos del ganado bovino son la aspiración de los folículos antrales (2), la ruptura de los folículos (3) y el seccionamiento continuo de los ovarios (4, 5). Misra, (6) plantea que la calidad de los ovocitos de búfalo depende en gran medida del método que se utiliza para la extracción. Por tal motivo nos proponemos recolectar los ovocitos inmaduros obtenidos de ovarios de hembras de *Bubalus bubalis* para la FIV en Cuba y comparar los métodos de punción folicular (PF) y la disección folicular (DF).

MATERIALES Y MÉTODOS

Hembras donantes

La matanza de las hembras bufalinas se realizó en el matadero Valle del Perú situado en la provincia Mayabeque. Los animales tenían 6 ± 0.84 años de edad y con un peso al momento del sacrificio de 500 ± 65.0 Kg. Los ovarios se extrajeron después del decolado conjunto a la extracción de todo el sistema reproductor. Se analizaron los dos ovarios los que fueron trasladados al laboratorio en 500 mL de solución salina al 0.9% en un tiempo máximo de 6 horas a 29°C en un frasco de cristal. Luego de un estudio biométrico en cuanto al largo, ancho y peso de los ovarios se procedió a la extracción de los complejos cúmulo- ovocito (CCO). Se emplearon dos métodos para extraer los CCO:

1. La punción folicular (PF) empleando una aguja hipodérmica (18Gx1½ TERUMO) acoplada a una jeringuilla plástica de 10 mL (HSW, Germany) previamente cargada con 1 mL de medio de cultivo 199 Hepes (SIGMA, M7528) enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi, PAA), 100 UI/ml de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (SIGMA, A5955). Se tomó el ovario y se le introdujo la aguja por el polo

libre del hilio aspirando de una vez el mayor número de folículos posibles entre 2 a 8 mm Ø. Posteriormente el contenido extraído fue depositado en un tubo cónico de 15 mL (COSTAR, USA) e incubado en un baño térmico a 37°C por 10 minutos hasta su procesamiento.

2. La disección quirúrgica de los folículos (DF) utilizando un micro-escalpelo oftálmico. Cada ovario fue depositado en una placa Petri de 60 mm Ø (Greiner®) y fijado con una pinza quirúrgica, posteriormente con la ayuda del micro-escalpelo la pared de cada folículo visible fue seccionada consiguiendo la expulsión del contenido folicular que se diluyó en 10 mL de PBS (10% de SFBi, 100 UI/ml de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (SIGMA, A5955) previamente depositado en la placa. Terminados ambos métodos los CCO son localizados bajo un estereoscopio con 4x de magnificación (Olympus, Japan) y su captura es realizada con capilares.

Para la evaluación de los CCO se tomó la escala de De Loos *et al.* (7), descrita para el bovino, donde la primera categoría se caracteriza por presentar ovocitos con más de 5 capas compactas de células del cúmulo y un citoplasma con granulaciones finas, densas y uniformes. Se toman como CCO de buena calidad los que se encuentran en el grupo I y II-III, los de los grupos V y desnudos no se consideran adecuados, por presentar poca o ninguna capa de células del cúmulo, lo que repercute en la maduración futura del CCO y compromete la FIV.

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de ovocitos recolectados y los CCO de calidad I, fueron analizados por el paquete estadístico Statgraphic Plus 5.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método DF resulta más eficiente que el PF Tabla 1, lo que corrobora lo obtenido por Lornergan *et al.* (8) Whitesell *et al.* (4) y Ohashi *et al.* (9, 10) quienes realizaron una comparación entre ambos métodos de extracción de ovocitos y reportaron que con la aspiración se obtienen menor cantidad de CCO que con la disección folicular, estos últimos plantean que por PF se aspiran menor cantidad de folículos de 2 a 8 mm de diámetro, mientras que el método de DF involucra una mayor proporción de la población folicular lo que condiciona la diferencia. No obstante, Whitesell *et al.* (4) reportan una mayor tasa de desarrollo en embriones producidos por FIV de ovocitos obtenidos por aspiración con respecto al método de disección. Este método

do tiene la característica de ser más rápido, exponiendo a los CCO a condiciones ambientales (extrafoliculares) por menos tiempo.

TABLA 1. Comparación entre la PF y la DF para la obtención de CCOs inmaduros a partir de ovarios de hembras enviadas a matadero./ *Comparison between FP and SD for immature COCs from female ovaries sent to slaughter*

Ovocitos	Media	DS	CV (%)
PF	34.25 ^a	6.28	18.33
DF	46.80 ^b	5.88	12.56

Letras diferentes indican diferencia significativa <0.001

Para el método de DF se seleccionan folículos presentes en la corteza ovárica sin embargo, este método consume más tiempo y es menos práctico si se desea trabajar con un número elevado de ovarios (11, 12). Por tanto para un trabajo extensivo se considera más recomendado la PF para no comprometer resultados tales como la tasa de clivaje

En la Tabla 2 se muestran los diferentes grupos de CCO clasificados por la escala de De Loos *et al.* (7) descrita para el bovino quienes evaluaron los mismos en dependencia de la cantidad de células de cúmulo y las características de homogeneidad del citoplasma, situando para el grupo de calidad I los que presentaron más de 5 capas de células del cúmulo y granulaciones finas y densas en el ooplasma. Se muestra que el método de DF es más efectivo respecto a la técnica de PF. A nivel mundial varios grupos de trabajo han obtenido por el método de PF desde 0.73 CCO/ovario (14) hasta 2.2 CCO/ovario (15). Los valores obtenidos en nuestra evaluación son ligeramente superiores a los de Ohashi *et al.* (9) y coinciden con Huang *et al.* (12) quienes reportaron que el número de ovocitos utilizable por ovario es de 3.18 ± 2.89 en la especie bufalina.

TABLA 2. Evaluación de los CCO obtenidos por los dos métodos por la escala de Loos./ *Evaluation of COCs obtained by Loos scale*

Método de extracción	Total de CCO colectados según su calidad.			Total	CCO/ovarios
	I	II-III	IV		
PF	28	51	58	137	2.7 a
DF	139	52	43	234	6.3 b

Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

Leal *et al.* (13) realizaron un ensayo de fertilización "in vitro" en búfalo obteniendo 25.9% de calidad I, 30.7% de calidad II, 10.2% de calidad III para un total entre II y III de 40.9% y desnudos un 18.6%. Es importante resaltar que para nuestras condiciones se obtengan 20.43% CCO calidad I por PF y 59.4% por DF ya que los CCO de calidad al fertilizarse pueden dar embriones con características nucleares y citoplasmáticas para ser vitrificados (16) elemento que puede contribuir al mejoramiento genético de la masa bufalina en Cuba.

Los resultados de esta investigación demuestran por primera vez en nuestro país la superioridad del método de DF con respecto al de PF para el desarrollo de la FIV a partir de ovarios de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero como fuente viable de ovocitos bufalinos.

REFERENCIAS

- Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PSP, Sarma PV. Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in-vitro maturation of buffalo oocytes. *Theriogenology*. 2002;57(3):1151-1159.
- González FR, Soto E, Landaeta A, Velarde JC, De Ondiz A, Delgado NJ. Recollection and evaluation of oocytes from sacrificed bovine crossbred ovaries. *Rev cient*. 1992;1:22-24.
- King W, Yadav BR, Xu K, P Picard, Sirad L, Verini Suplizi, A. editors. The sex ratios of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 1991;36(5):779-788.
- Whitesell DR, Hill KG, Miller DR, Jones AL, Wilson JM. In vitro embryo production from oocytes recovered from excised ovaries of terminally ill cows. *Theriogenology*. 1992;37(1):322.
- Misra AK. Advances in embryo technology in water buffaloes. 7th World Buffalo Congress 20-23 October 2004, Makati Shangri –Hotel Ayala Avenue, Makati city, Philippines. Abst. 2004.
- Vergos F, Kinis A, Lonergan P, Sharif H, Gallagher H, Gordon I. Effect of recovery method on the yield of embryos after in vitro maturation and fertilization of the bovine follicles oocyte. *J Reprod Fert Abst*. 1990;6:68.
- De Loos FAM, Jeunken M, Zeinstra E, Bevers MM. Structural aspects of bovine maturation in vitro. *Mol Reprod*. 1992;31:208-214..

8. Lonergan P, Sharif H, Monagan P, Wahid H, Gallagher A, Gordon I. The effect of recovery method on the types of aneuploid oocytes obtained for *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 1991;35(1): 231.
9. Ohashi OM, Miranda MS, Dantas JK, Santos SSD, Sousa JS. La transferencia de embriones y la fertilización *in vitro* en el programa de búfalo de la Amazonía En: 1er Simposio de America Buffalo, *Actas*. 2002;p. 217-224. Belém.
10. Ohashi OM, Miranda MS, Sousa JS, Sousa AJO, Cordeiro MS, Biondi CF. Produção *in vitro* de embrião bubalino. La producción *in vitro* de embriones de búfalo. *Revista Brasileira Reproducción Animal*. 2003;27:103-108.
11. Boni R. *In-vitro* production in bovine and buffalo species. *Buffalo J*. 1994;2(89):147-160.
12. Das GK, Jain GC, Solanki DN, Tripathi VN. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology*. 1996;46:1403-141.
13. Huang Fenxiang, Pang Chunying, Zhang Xiufang editors. *In vitro* fertilization and subsequent Embryo development using oocytes derived from abattoir ovaries in different seasons in buffalo. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*. 2008;35:76-78.
14. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, editors. First pregnancies established from vitrified Blastocysts entirely produced *in-vitro* in mediterranean Italian buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2003; p 374.
15. Leal LS, Moya-Araújo CF, Fernandes CB, Martins LR, Landim-Alvarenga FC, Oba E. Evaluation of recovery, quality and *in vitro* nuclear maturation of oocytes obtained from Buffalo and Bovine Ovaries. 9no Congreso de búfalo, Argentina 2010.
16. Totey SM, Singh G, Taneja H, Pawshe CH, Talwar GP. Maduración *in vitro*, la fertilización y el desarrollo folicular de los ovocitos de búfalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fert*. 1992;95:597-607.

(Recibido 201-2011; Aceptado 10-1-2012)