ESTUDIO DE LA TASA DE RECUPERACION DE ÓVULOS DE VACUNO SEGÚN LA TÉCNICA DE OBTENCIÓN:*ASPIRACION O SLICING* Y LA FASE ESTRAL OVARICA

MARCO-JIMENEZ, FRANCISCO., VICENTE, J.S.
Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Dep. Ciencia Animal,
Universidad Politécnica de Valencia, 46071 Valencia, España.
e-mail: framarj1@etsia.upv.es

INTRODUCCION

La utilización de técnicas como los test biológicos de calidad seminal, la clonación o la transgénesis, exige un elevado un elevado número de óvulos. Estos pueden obtenerse a partir de animales de matadero mediante aspiración o disección folicular (Leibfried y First, 1979; Xu *et. al*, 1987) o mediante *slicing* (Suss y Madison 1983; Carolan *et. al*, 1993:1994; Xu *et. al*, 1992a,b, Hamano y Kuwayama, 1994). La eficacia del proceso de maduración depende tanto de la edad del animal, del tamaño folicular del que procede el complejo *cumulus-ovocito* (COC's) y de la calidad de estos. Las técnicas de recuperación utilizadas, la selectiva aspiración folicular y el indiscriminado sciling, sobre terneras de 10-12 meses, pueden condicionar el tipo de COC's a madurar y con ello la tasa de éxito.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la metodología de obtener COC's para una posterior maduración y utilización para evaluar la capacidad fecundante de semen congelado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios fueron obtenidos de terneras (10-12 meses) sacrificadas en un matadero comercial (frisona, Limusin etc.), transportados al laboratorio en un recipiente isotermo, en un tiempo inferior a dos horas. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados en PBS junto con gentamicina (50μg/ml) y finalmente puestos en un recipiente a 35ºC en PBS. Previamente a la recuperación de los óvulos, los ovarios fueron clasificados en cuatro grupos, según el estado del ciclo estral en el que se encontraban: (I) ovarios con folículo dominante y sin cuerpo lúteo, (II) ovarios con folículo dominante y con cuerpo lúteo, (III) ovarios sin folículo dominante y con cuerpo lúteo y (IV) ovarios sin folículo dominante y sin cuerpo lúteo.Los óvulos fueron recuperados empleando dos técnicas: *aspiración* folicular y *slicing*. La aspiración se realizó ayudados de una bomba de aspiración (Dinko Mod D-95) bajo presión constante (de 30 mmHg), utilizando un tubo esteril cónico de 50 ml y una aguja de 18G $1^{1/2}$. El líquido aspirado fue transferido a placas Petri de 60 × 15 mm con PBS modificado por la adición de glucosa (100mg/L), piruvato sódico (36 mg/L), BSA fraction V (0,5 g/L) y gentamicina (50μg/ml). En la técnica de slicing los ovarios fueron situados en placas Petri de 60 × 15 mm con PBSm y sometidos a cortes transversales y longitudinales mediante un bisturí sobre toda la superficie ovárica.

Los óvulos fueron catalogados siguiendo la clasificación de Le Guienne(1999), descartando aquellos COC's con pocas capas de células de la granulosa o que presentaban manchas citoplasmáticas.

Los análisis estadísticos que se realizaron fueron un análisis de medias, sobre los parámetros cuantitativos), y un GLM (General Linear Models, Statgraphics Plus 4.1) para analizar los valores cinéticos .

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 245 ovarios, de los que 46, 57, 72 y 70 corresponden a cada uno de los tipos descritos anteriormente. Se realizó aspiración folicular sobre 132 ovarios, obteniendo 309 COC's (45, 75, 89 y 100, respectivamente para cada tipo) y se aplicó slicing sobre 113 ovarios, obteniendo 1150 COC's (249, 203, 256 y 442, respectivamente para cada tipo de ovario). Todos los COC's considerados en esta experiencia fueron catalogados según el patrón descrito por Le Guienne(1999), por lo

que se consideran como los más idóneos para realizar maduración *in vitro*. El análisis de los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Número de COC's obtenido según el tipo de ovario y el método de recuperación (media ± desviación estándar)

Técnica	FD	FD y CL	CL	Sin FD y sin CL	Total
Slicing	$10,2 \pm 1,1^{a}$	$7,1 \pm 1,1^{a}$	$8,8 \pm 1,0^{a}$	$12,2 \pm 0,9^{a}$	$9,6 \pm 0,5^{a}$
Aspiración	$2,1 \pm 1,1^{b}$	$2,7 \pm 1,0^{b}$	$2,6 \pm 0,8^{b}$	$3,1 \pm 0,9^{b}$	$3,1 \pm 0,9^{b}$

FD: Folículo dominante; CL: Cuerpo lúteo . ^{a,b} Columnas con letras diferentes $p<0.05$

Los resultados obtenidos mostraron un mayor porcentaje de COC's recuperados mediante slicing, acorde con los resultados obtenidos por otros autores (Carolan 1993, 1994: Lonergan *et. al,* 1994). Los cortes sobre el ovario permitieron recuperar folículos situados en el interior del tejido ovárico, folículos que son descartados cuando se utiliza la aspiración, ya que sólo se aspiran aquellos que están situados sobre la superficie ovárica. La selección de los COC's de grado 1 y 2 según la clasificación de Le Guienne(1999) permitió descartar aquellos que presentan manchas pignóticas en el citoplasma, formas irregulares o según el *cumulus*. Ahora bien, hay otra serie de parámetros muy importantes a considerar en la recuperación: Localización de los folículos, diámetro folicular y diámetro del ovocito. Los ovocitos recuperados de la región cortical del ovario son significativamente más competentes que los localizados en el área subcortical (Arlotto *et. al*,1995), no permite el slicing discriminar la situación de los folículos. El diámetro folicular presenta el mismo inconveniente y la misma idea. La mayoría de autores (y en diferentes especies) manifiestan que los oocitos recuperados de los folículos de pequeño tamaño son incapaces de reanudar la meiosis o se bloquean en estadio de metafase I (bovino: Fair *et. al*, 1995, caprino: De Smedt *et. al*, 1994; ovino: Moor y Trouson, 1977). El diámetro folicular también influye sobre el tamaño del ovocito. Fair *et. al* (1995) y Suzuki *et. al* (1994) mostraron como a medida que aumentaba el diámetro folicular, se incrementaba la media del diámetro del ovocito. Motlik y Fulka (1986) en folículos de 0.4-0.9 mm observaron diámetros desde 110 a 113 y Fuhrer *et. al* (1989) observaron diámetros alrededor de $132,6 \pm 6,5$ en folículos de 3-8 mm. El tamaño ovocitario es determinante en el desarrollo de la maduración oocitaria. Oocitos con pequeño tamaño presentan una mayor problemática en el crecimiento que los de mayor tamaño. Un grupo representativo de óvulos (100 para cada método de recuperación) fueron medidos mediante un ocular graduado. Los valores obtenidos para slicing y aspiración fueron $123,77 \pm 6,91$ *vs* $122,62 \pm 5,28$ (respectivamente, media ± error estándar).No existió diferencia significativa entre ambos métodos, mostrando un diámetro ovocitario muy similar. La similitud de los diámetros se explica por la clasificación previa realizada (Le Guienne *et. al,* 1999), lo que contribuye a tener una población de COC's con unas características comunes. Por último cabe destacar, que la aspiración folicular permite controlar la presión de aspiración (constante gracias al uso de una bomba) lo que contribuye a preservar las capas de células de la granulosa de mejor forma que el slicing. El uso de slicing proporcionó un mayor número de COC's recuperados y clasificados como idóneos ($9,57 \pm 0,51$ *vs* $3,08 \pm 0,92$). En nuestro caso, la aspiración folicular, a pesar del menor número de COC's que proporcionan(de grado 1 y 2 según Le Guienne1999) presentan en general un mayor número de células de la granulosa, evita el exceso de material celular en el medio de recuperación y permite reducir el tiempo de trabajo, y por tanto se considera como mejor método de obtención de COC's para maduración *in vitro*. El porcentaje de maduración *in vitro* (medio

empleado por Marco-Jiménez y col., 2002) obtenido para 338 COC's recuperados mediante aspiración folicular fue del 75,73%.

La clasificación de los ovarios (presencia o ausencia de folículo dominante o cuerpo lúteo) no influyó en los resultados, de manera que no existe correlación con la técnica de obtención de los COC's empleada. La influencia del ciclo estral sobre la tasa de recuperación de COC's se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Tipo de ovario y óvulos recuperados

TIPO OVARIO	N COC's Recuperados (Media ± error estándar)
Folículo dominante	$6,4 \pm 0,9^{a,b}$
Folículo dominante y cuerpo lúteo	$4,6 \pm 0,9^{b}$
Cuerpo lúteo	$5,0 \pm 0,8^{a,b}$
Sin folículo dominante y sin cuerpo lúteo	$7,7 \pm 0,8^{a}$

^{a,b} Columnas con letras diferentes $p<0.05$

El número de COC's recuperados fueron estadísticamente significativo ($p<0,05$) cuando en el ovario hubo presencia del cuerpo lúteo. La presencia o no del folículo dominante no modificó el número de COC's recuperados, mientras que este decreció cuando hubo cuerpo lúteo. Cabe indicar que este estudio sólo valora el número de óvulos obtenidos que presentan unas características citoplasmáticas y del *cumulus* determinadas, pero que no estudia el comportamiento de cada tipo de ovario frente a la maduración *in vitro*. Basándose sólo en el número de óvulos recuperados y a pesar de la significación estadística, mientras que no se muestre las diferencias en la maduración *in vitro* de algún tipo de ovario sobre otro, no parece interesante quedarse sólo con los ovarios que nos proporcionó más COC's ya que no se pueden seleccionar previamente a los animales con este tipo de ovario, si no que en la cadena de sacrificio el tiempo invertido es el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arlotto T., Schwartz J, First N, Leibfrieb-Rutledge M (1995). Theriogenology 45: 943-956.
- Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M. and Gordon, I (1993). AETE, 180.
- Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M. and Gordon, I (1994). Theriogenology 41, 1061-1068.
- De smedt V, Crozet N, Gall L (1994). J. Exp. Zool 269:128-139.
- Fair T, Hyttel P, Greve T (1995) Mol. Reprod. Dev. 42: 437-442.
- Fuhrer F, Mayr B, Schellander K, Kalat M, Schleger W (1989). J Vet Med 36:285-291.
- Hamano, S. and Kuwayama, M. (1994). Theriogenology 39, 703-712.
- Le Guienne. Atlas of the bovine oocytes. AETE newsletter, 1999; 10:6-8.
- Leibfried, L and First, N.L. (1979). Journal of Animal Science 48, 76-86.
- Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. Reprod Nutr Dev 1994; 34: 329-339.
- Marco-Jiménez F., Mazón J., Vicente, J.S. 2002. AETE, página 208.
- Moor R, Trouson A (1977). J. Reprod Fert 49:101-109.
- Motlik J, Fulka J (1986). Theriogenology 25:87-96.
- Suss, U and Madison, V. (1983). Archives of Andrology 11, 217-218.
- Suzuki H, Yang X, Foote R (1994). Theriogenology 41:307.
- Xu K, Greve , Callesen H, Hyttel P (1987). J Reprod. Fert 81:501-504.
- Xu, K.P., Hill, B. and Bettridge, K.J. (1992a). Veterinary Record 130, 204-206.
- Xu, K.P.,Yadav, D.R., King, W.A. and betteridge, K.J. (1992b). Molecular Reproduction and Development 31, 249-252.