

# Viabilidad de gametos femeninos obtenidos por aspiración folicular de ovarios *pos mortem* en ovinos (*Ovis aries*)

Reynaldo Susaño Mamani; Nicol Salinas Lluta

Universidad Boliviana de Informática, sub sede “El Alto”  
Carrera de Medicina Veterinaria

E-mail de contacto: reypc123@gmail.com

**Resumen.** El objetivo del estudio fue comparar la eficiencia de la recuperación de gametos femeninos a través de la aspiración folicular de ovarios *pos mortem*. Se obtuvo 40 ovarios con un total de 56 ovocitos, teniendo como objetivo estudiar la viabilidad de ovocitos en animales de producción láctea o cárnica, buscando recuperar las características de vacas de alto valor genético que han cumplido su ciclo reproductivo o hayan sufrido una muerte súbita. Debido a que durante la observación en laboratorio se requería el mayor porcentaje de seguridad, se utilizó azul de tripán para determinar los óvulos no viables; las células germinales que no lograron una coloración con el azul de tripán, aseguran la viabilidad de los ovocitos observados sin tinción. Se tuvo los siguientes resultados: de las muestras de ovocitos vivos del ovario derecho, observadas con azul de tripán, estaba claro que el 75,60% eran viables para la fecundación *in vitro*. Siguiendo el mismo procedimiento para el ovario izquierdo, se estableció la viabilidad de un 70,10% (con el uso de azul de tripán), teniendo como objetivo estudiar la viabilidad de óvulos de animales *pos mortem*, buscando recuperar las características en ovinos de alto valor genético que han cumplido su ciclo reproductivo o hayan sufrido una muerte súbita. Finalmente, la frecuencia de folículos aspirados fue del 100% utilizando el método de aspiración de folículos; la frecuencia de ovocitos A, B, C y D observados fue del 79,41% y la frecuencia de no ovocitos fue del 13,23%.

**Palabras clave:** Óvulos; Morfología; Viabilidad

## Introducción

En diversas especies domésticas se emplean biotecnologías reproductivas para mejorar los índices reproductivos y productivos. Sin embargo, al igual que en el resto de especies domésticas, la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* y la transferencia de embriones, podrían apoyar los programas de mejoramiento y aprovechar al máximo el potencial genético del animal.

La aplicación de procedimientos en biotecnologías reproductivas se ha incre-

mentado en los últimos años y en un futuro pueden llegar a ser utilizados en programas a gran escala en la producción comercial de embriones en laboratorio. Dentro de este concepto, la colección de ovocitos es un paso necesario para llegar a establecer programas de fertilización *in vitro* (FIV).

Los ovarios contienen un número mayor de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo, de los cuales solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal.

La colección de ovocitos permite la recuperación y utilización de folículos no ovulatorios, que bajo circunstancias fisiológicas se convertirían en folículos atrésicos. Los ovarios de ovejas sacrificadas en mataderos se pueden obtener a bajo costo y en grandes cantidades, lo que permite la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de óvulos de animales en diversas etapas del ciclo estral.

Clasificar morfológicamente los ovocitos ovinos *pos mortem* fue uno de los objetivos de la investigación, a fin de comprobar si los óvulos son viables de ovarios *pos mortem* para luego obtener y manipular gametos femeninos por medio de la técnica de aspiración folicular.

## Materiales y métodos

### Localización

El presente trabajo de investigación se realizó a nivel de laboratorio de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Boliviana de Informática sub sede El Alto, ubicado en el departamento de La Paz, a una altitud 4015 msnm; geográficamente a 16°30'0" de latitud Sur y 68°12'53" de longitud Oeste.

### Materiales biológicos

Se utilizaron 40 pares de ovarios ovinos, las cuales fueron colectados en el matadero del municipio de Batallas.

### Metodología

Los ovocitos fueron aspirados una vez que estuvieron en el laboratorio para su observación y clasificación morfológica.

Con la ayuda de una pinza quirúrgica y una aguja número 18, se extrajeron los

ovarios. Se realizó un lavado con suero fisiológico para proceder con la aspiración folicular para la obtención de óvulos.

Cada folículo visible en el ovario que tenía más de 2 mm, se aspiró con una jeringa de 18 G y el aspirado se vertió luego con cuidado en una placa Petri que contenía solución salina al 0,9%. Luego se llevó la placa Petri al microscopio para observar los ovocitos.

### Evaluación morfológica

Los ovocitos debían elegirse cuidadosamente para el proceso de evaluación, y dado que los ovocitos de categoría A y B presentan las mayores proporciones de maduración, se eligieron aquellos con citoplasma homogéneo, no granular o polarizado y células del cúmulo intactas que rodean el gameto, utilizando los lineamientos de: (Herradon 2007).

### Evaluación de viabilidad con tinción

En su estudio se empleó la tinción supravital con azul de tripán (AT) para distinguir entre ovocitos vivos y muertos, antes de utilizar la fecundación *in vitro* (FIV), para comprobar la viabilidad de los ovocitos y eliminar los que estén muertos.

Se perforaron los folículos ováricos. Los complejos de ovocitos del cúmulo (COC) se dividieron en cuatro categorías: A, B, C y D, y las categorías A y B recibieron exposición a azul de tripán (AT) durante dos a cinco minutos.

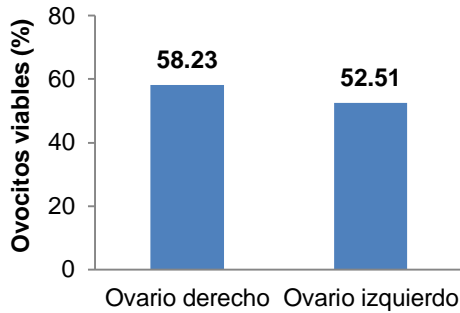
### Análisis estadístico

El número de ovocitos viables y no viables se midió como parte del análisis estadístico descriptivo que se realizó para esta investigación.

## Resultados y discusión

### Comparación del porcentaje de ovocitos viables encontrados en los ovarios derecho e izquierdo uso azul de tripán

La comparación de la viabilidad (en %) de los ovocitos, entre ovario derecho e izquierdo, se presenta en la Figura 1, donde los mismos fueron registrados a simple observación.



**Figura 1.** Porcentaje de recuperación de óvulos

### Comparación del porcentaje de ovocitos viables libres de azul de tripán en la primera etapa en los ovarios derecho e izquierdo

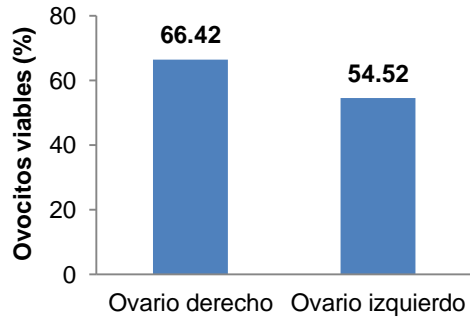
Los resultados estadísticos de la prueba "t" para la comparación de la viabilidad del ovocito, a partir de las observaciones del ovario derecho e izquierdo, se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Prueba "t" para la comparación del % de viabilidad de ovocitos, en el ovario derecho e izquierdo

Parámetro estadístico	Ovario derecho	Ovario izquierdo
Media	58.23	52.51
Observaciones	34	34
P (T<=t) 2 colas	0.431	
Valor crítico de t (2 colas)	1.997	

Con un promedio de 58,23 y 52,51%, respectivamente, los resultados del Cuadro 1 muestran que existen diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos viables del ovario derecho e izquierdo, lo que indica que estadísticamente hubo más ovocitos viables en el ovario derecho, ya que el rango crítico de "t" (1.997, -1.997) está dentro del rango del valor de P para dos colas (0.431).

La comparación del porcentaje de ovocitos viables en los ovarios derecho e izquierdo se muestra en la Figura 2, donde se contaron con azul de tripán, es decir, después de la observación inicial.



**Figura 2.** Comparación de los porcentajes de ovocitos viables de los ovarios derecho e izquierdo teñidos con azul de tripán

La Figura 2 muestra una diferencia del 11,90%, siendo el ovario derecho el que presenta el porcentaje medio más alto de viabilidad ovocitaria (66,42%) y el ovario izquierdo el porcentaje medio más bajo (54,52%).

González (2014) encontró que la frecuencia de preñez en el cuerno derecho es mayor que en el izquierdo, en el trópico bajo colombiano, y como resultado, el ovario derecho presenta una mayor proporción de estructuras de cuerpo lúteo y folículo que el izquierdo, lo que indica que el derecho es más activo.

En consecuencia, se puede indicar que los hallazgos de la presente investigación son consistentes con los de Gonzáles 1992, tanto en las observaciones con azul de tripán como sin azul de tripán (figuras 1 y 2), quien observó que el ovario derecho tenía un mayor % de ovocitos viables.

Los resultados estadísticos, de la prueba "t" para comparar la viabilidad de los ovocitos sin azul de tripán (sin AT) y con azul de tripán (con AT), de las observaciones del ovario derecho, se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Prueba "t" para la comparación del % de viabilidad de ovocitos, en observaciones sin azul de tripán (Sin AT) y con azul de tripán (Con AT) en el ovario derecho

Parámetro estadístico	SIN AT	CON AT
Media	72.92	66.42
Observaciones	19	19
P (T<=t) 2 colas	0.395	
Valor crítico de t (2 colas)	2.028	

El porcentaje de ovocitos viables con AT y sin AT es significativamente diferente, con un promedio de 66,42% y 72,92%, respectivamente, con un número estadísticamente mayor de ovocitos viables sin AT según el Cuadro 2, ya que el valor crítico de "t" (2.028, -2.028) está dentro del rango del valor de P para dos colas (0.395).

En el Cuadro 3 se muestra que existen diferencias significativas entre el porcentaje de ovocitos viables sin AT y con AT, con un promedio de 63.52% y 54.52%, respectivamente, debido a que estadísticamente hubo menos ovocitos viables con AT. El valor de P para dos colas

(0.307) está dentro del rango del valor crítico de "t" (2.028, -2.028).

**Cuadro 3.** Prueba "t" para la comparación del % de viabilidad de ovocitos, en observaciones sin azul de tripán (Sin AT) y con azul de tripán (Con AT) en el ovario izquierdo

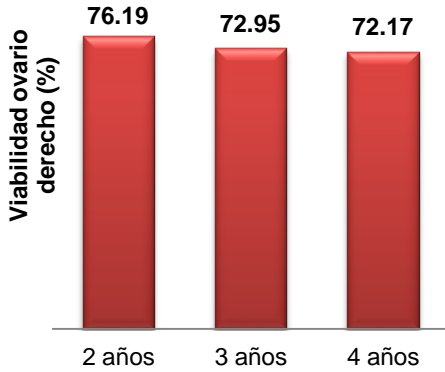
Parámetro estadístico	SIN AT	CON AT
Media	63.52	54.52
Observaciones	19	19
P (T<=t) 2 colas	0.307	
Valor crítico de t (2 colas)	0.028	

**Comparaciones entre los porcentajes de ovocitos viables de los ovarios izquierdo y derecho a distintas edades**

En general, los datos mostraron que el ovario derecho contenía más ovocitos viables que el izquierdo. Se cree que este comportamiento está influenciado por la genética y la fisiología de las ovejas. También es importante señalar que la mayoría de los ovarios que se recolectaron al azar, pertenecían a ovejas que tenían entre 3 y 4 años de edad.

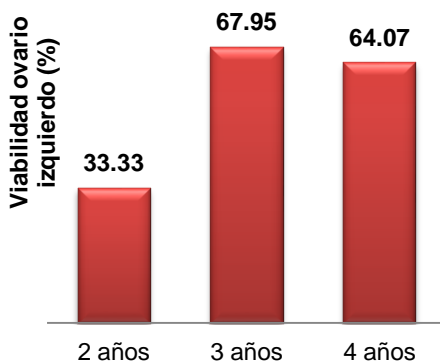
El porcentaje de viabilidad de los ovocitos correspondientes al ovario derecho, se compara entre ovejas de diferentes edades en la Figura 3. Estos datos se obtuvieron por observación simple, sin usar azul de tripán.

De acuerdo con la Figura 3, cuyos datos fueron captados por simple observación, la edad de 2 años con 76.19% de viabilidad tuvo un total de dos observaciones, mientras que los casos de 3 y 4 años tuvieron 8 y 9 observaciones, respectivamente, con un promedio igual a 72.95% y 72.17% de viabilidad de los ovocitos.



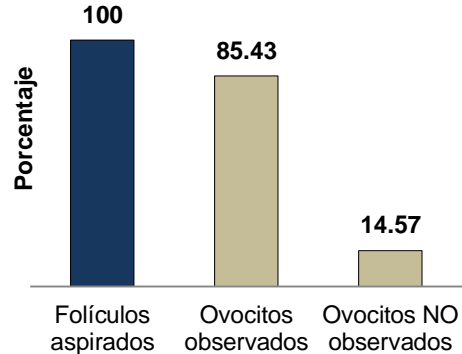
**Figura 3.** Comparación del % de ovocitos viables (en el ovario derecho) observados sin azul de tripán, entre diferentes edades en ovinos

En el caso de los ovocitos observados del ovario izquierdo (Figura 4), se evidencia que el mayor porcentaje de viabilidad corresponde a las edades de 3 y 4 años, con 67.95% y 64.07% de viabilidad ovocitaria, respectivamente, quedando en último lugar la edad de 2 años, con un promedio de 33.33% de viabilidad. Como superan el 50% de viabilidad, las edades de 3 y 4 años, tanto en el ovario izquierdo como en el derecho, tienen un buen porcentaje de viabilidad. Estas edades también se corresponden con la probabilidad de obtener un mayor número de ovarios del matadero.



**Figura 4.** Comparación de la proporción de ovocitos viables (en ovario izquierdo) que se observaron sin azul de tripán en ovejas de distintas edades

Las observaciones con azul de tripán de ovocitos viables, se muestran en la Figura 5. Estas observaciones se relacionan con los ovocitos extraídos del ovario derecho.



**Figura 5.** Comparación del % de ovocitos foliculares aspirados que eran visibles y los que no lo eran

***La técnica de aspiración folicular ha demostrado ser efectiva***

Usando todos los folículos aspirados de la investigación actual como referencia, la Figura 5 compara los ovocitos observados y no observados.

La Figura 5 demuestra que de los 100 folículos aspirados, se encontraron 85,43% de los ovocitos correspondientes a las categorías A, B, C y D, mientras que 14,57 estaban desprovistos de ovocitos.

González (1992) encontró que la técnica de aspiración folicular recuperó el 88,61% de todos los ovocitos. Estos resultados se acercan a los hallazgos de la investigación actual, lo que indica que la técnica es válida.

## Conclusiones

- Sin el uso de azul de tripán, el ovario derecho mostró el mayor porcentaje de ovocitos viables para la fertilización *in vitro*, con un promedio de 58,23% y 72,92%. El ovario izquierdo ocupó el segundo lugar con 52,51% y 63,52%.
- Cuando se utilizó azul de tripán para observar las muestras, se encontró que el ovario derecho, con una viabilidad de ovocitos promedio de 66,42%, tenía un porcentaje más alto de viabilidad de ovocitos que el ovario izquierdo, que tenía un promedio de 54,52%.
- Con el uso de azul de tripán se establece que el 85,6% de los ovocitos son viables para la fecundación *in vitro*.
- Dado que el 85,43% de los ovocitos eran visibles, el método de aspiración folicular ha demostrado su eficacia.

## Referencias citadas

- González R. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovino mestizos sacrificados. Revista Científica FCV de LUZ. Vol II Nº 2. Zulia, Venezuela. *En línea*. Disponible en: [www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23692/2/articulo\\_2.pdf](http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23692/2/articulo_2.pdf) Consultado el 21 de mayo de 2016.
- Herradon P. 2007. Fecundación *In Vitro*: Alternativa para la Mejora Genética en Bovinos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1). Cusco, Perú. p. 34. *En línea*. Disponible en: [www.bioline.org.br/pdf?la07027](http://www.bioline.org.br/pdf?la07027) Consultado el 29 de octubre de 2015.