

## **Efecto de temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas**

### **Effect of transport temperatures (35°C, 4°C) on the morphologic quality of oocytes collected from ovaries of alpacas**

Huanca, W<sup>1\*</sup>; Palomino, J.M<sup>2</sup>; Cervantes, M.<sup>1</sup>; Cordero, A.<sup>3</sup>; Huanca, T.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal. Fac de Medicina Veterinaria, UNMSM, Lima-Perú. Email: whuanca2002@yahoo.com

<sup>2</sup> Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria, UNSCH, Ayacucho-Perú. Email: leunamvet@yahoo.com

<sup>3</sup> Facultad de Zootecnia. Universidad Agraria la Molina, Lima-Perú. Email: aidacordero08@yahoo.com

<sup>4</sup> Estación Experimental Illpa-Quimsachata. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, Puno-Perú. Email: illpa@inia.gob.pe

#### **RESUMEN**

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. Se formaron dos grupos. El grupo G1 (n=10) correspondió a ovarios colocados en solución salina a 35°C y el grupo G2 (n=10) a ovarios colocados en solución salina a 4°C. Fueron transportados al laboratorio en un lapso de 18 horas. En cada grupo, usando el método de aspiración los ovocitos fueron colectados desde los ovarios, siendo colocados en solución salina a 35°C. Se evaluó la calidad morfológica y diámetro de los ovocitos colectados. Los resultados obtenidos fueron: G1: calidad morfológica 54% de ovocitos de categoría I y II, diámetro de los ovocitos 0.17±0.03mm, 3.5±1.7 ovocitos colectados de 5.1±2.3 folículos > 3mm; y para G2: calidad morfológica 36% de ovocitos de categoría I y II, diámetro de los ovocitos 0.17±0.03mm, 3.6±2.1 ovocitos colectados de 6.6±1.6 folículos > 3mm. Diferencia estadística significativa fue observada entre la calidad morfológica de ovocitos obtenidos desde ovarios de alpacas transportados a 35°C y 4°C. Los resultados nos sugieren una mejor calidad morfológica en ovocitos procedentes de ovarios transportados en suero fisiológico a 35°C respecto a los transportados a 4°C.

**Palabras clave:** temperatura, calidad morfológica, ovocitos, alpacas.

#### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effect of different transport temperatures (35°C, 4°C) on the morphologic quality of oocytes collected from ovaries of alpacas. It was formed two groups. The G1 (n=10) group corresponded to ovaries put on saline solution at 35°C and the G2 (n=10) group to ovaries put on saline solution at 4°C. Both were transported to the laboratory in a time lapse of 18 hours. In each group, were collected oocytes from ovaries using the aspiration method, and then put in saline solution at 35°C. It was evaluated the morphologic quality and diameter of collected oocytes. Results obtained were: G1: morphologic quality 54% oocytes of I and II category, oocytes diameter of 0.17±0.03mm, 3.5±1.7 oocytes collected of 5.1±2.3 follicles > 3mm; and for G2: morphologic quality 36% oocytes of I and II category, oocytes diameter of 0.17±0.03mm, 3.6±2.1 oocytes collected of 6.6±1.6 follicles > 3mm. Statistic difference was observed between the morphologic quality of oocytes collected from ovaries of alpacas transported at 35°C and 4°C. Results suggest a better morphologic quality in oocytes from ovaries transported in saline solution at 35°C with respect to them transported at 4°C.

**Key words:** temperature, morphologic quality, oocytes, alpacas.

#### **INTRODUCCIÓN**

En diversas especies domésticas se emplean biotecnologías reproductivas para mejorar los índices reproductivos y productivos. En camélidos sudamericanos los estudios sobre biotecnología reproductiva son limitados (Novoa, 1991). Sin embargo, al igual que en el resto de especies domésticas, la fecundación in vitro y la transferencia de embriones podrían apoyar los programas de mejoramiento.

La maduración de ovocitos in vitro, se constituye en un paso fundamental para el avance de biotecnologías como la fecundación y producción de embriones in vitro. En tal sentido, la obtención de ovarios provenientes de hembras sacrificadas en el camal permitiría suministrar de una fuente abundante de

ovocitos obtenidos a bajo costo, los que podrían ser madurados, fertilizados y cultivados in vitro hasta estados avanzados del desarrollo embrionario. Sin embargo, esto puede ser afectado por factores externos relacionados con la manipulación de los ovarios, como su temperatura de almacenamiento y el tiempo de colección de los ovocitos después del sacrificio. Estudios han demostrado que la calidad del complejo cúmulo ovocito (CCO) tiene una implicancia directa sobre el potencial de maduración de los ovocitos (Word y Wildt, 1997). Gordon y Lu (1990) reportan que los ovocitos pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30° a 37° C durante 8 horas sin llegar a afectar su calidad ni los procesos de maduración y fertilización in vitro. Estudios en diversas especies domésticas donde se emplearon diferentes temperaturas de almacenamiento refieren variaciones en la calidad de los ovocitos que afectarían su desarrollo posterior (Jing et al., 2004; Ozdas et al., 2005; Wongsrikeao et al., 2005; Tas et al., 2006; Lucci et al., 2007).

No se conoce el efecto de la temperatura a la cual son transportados los ovarios de alpaca, por lo cual se plantea el presente trabajo con el propósito de evaluar de manera preliminar el efecto de diferentes temperaturas (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de los ovocitos colectados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento fue realizado en el Anexo Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA-INIA, ubicada a 4200msnm, en Puno. Se emplearon 20 ovarios, que fueron transportados desde el camal Nuñoa – Puno, hasta el laboratorio de Reproducción del Anexo Quimsachata. El grupo G1 (n=10) correspondió a ovarios colocados en solución salina a 35°C y el grupo G2 (n=10) a ovarios colocados en solución salina a 4°C.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados con suero fisiológico a 35°C, y luego secados en papel toalla, para proceder a la punción de los folículos > a 2mm empleando una aguja 18X. El líquido folicular aspirado fue colocado en tubos falcón de 50ml, reposando por 15 minutos, para ser vertido en placas petri, y se procedió a la búsqueda de los ovocitos en el estereoscopio, siendo entonces trasladados a nuevas placas petri con solución salina fisiológica a 35°C, donde fueron evaluados y clasificados.

La clasificación empleada fue la siguiente (Sanchez y Silva, 2003):

- Ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del cumulus.
- Ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del cumulus.
- Ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cumulus presentes son menos compactas.
- Ovocitos categoría IV (malos) presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del cumulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 117 folículos aspirados se colectaron 71 ovocitos, siendo la tasa de recuperación 60.7%. Los resultados correspondientes a G1 y G2 se observan en el Cuadro 1, no se encontró diferencia estadística significativa en el número ni tamaño de los ovocitos colectados. La calidad morfológica de los ovocitos colectados en el presente estudio, se indica a continuación en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Número y tamaño de ovocitos colectados

	Grupos		
	G1	G2	total
N° ovarios	10	10	20
N° folículos aspirados	51	66	117
N° de ovocitos colectados	35	36	71
Tasa de recuperación (%)	68.6	54.5	60.7
Tamaño del ovocito (mm)	0.17±0.03	0.17±0.03	0.17±0.03

G1: ovarios transportados en solución salina a 35°C y G2: ovarios transportados en solución salina a 4°C

Estos resultados indican que en el grupo G1 hubo un mayor número de ovocitos comprendidos en la categoría I y II (considerados aptos para maduración) respecto al grupo G2. Sugiriendo que posiblemente la temperatura de transporte de los ovarios esté afectando la calidad morfológica de los ovocitos colectados. Aunque el aspecto morfológico del complejo cúmulos ovocito no asegure la capacidad de desarrollo in vitro de los ovocitos, este puede dar un indicativo acerca de su salud y se ha demostrado que está bastante

correlacionada con la producción de blastocistos en otras especies (Blondin, 1995). La calidad de los ovocitos se estima regularmente luego de evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma (Seneda *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Calidad morfológica de los ovocitos colectados

	G1	G2
Categoría I	3	1
Categoría II	16	12
Categoría III	14	5
Categoría IV	2	18
total	35	36
Ovocitos aptos: I y II (%)	19 (54%)	13 (36%)
Ovocitos no aptos: III y IV (%)	16 (46%)	23 (64%)
Total	35	36

G1: ovarios transportados en solución salina a 35°C y G2: ovarios transportados en solución salina a 4°C

Siendo el presente un estudio preliminar, será importante realizar estudios posteriores donde se evalué la maduración *in vitro* de los ovocitos colectados de ovarios de alpaca almacenados a diferentes temperaturas, y así determinar los porcentajes de desarrollo embrionario logrados.

### CONCLUSIONES

Con los resultados del presente estudio podemos concluir que la temperatura de transporte de los ovarios de alpaca tiene efecto sobre la calidad morfológica de los ovocitos colectados.

### LITERATURA CITADA

- Blondin, P. and M.A. Sirard. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 41(1):54-62.
- Gordon, I and K.H. Lu. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87.
- Jing Z., ShuWen Z., XiuGuo H., XiaoJie A., HuaWei L. 2004. Effects of transport temperature of ovaries on *in vitro* fertilization and development of porcine oocytes. *Chinese Journal of Veterinary Science.* Vol. 24(6):617-618
- Lucci CM., Schreier LL., Machado GM., Amorim CA., Bão SN., Dobrinsky JR. 2007. Effects of Storing Pig Ovaries at 4 or 20°C for Different Periods of Time on the Morphology and Viability of Pre-Antral Follicles. *Reproduction in Domestic Animals.* Vol 42 (1):76-82.
- Novoa C. 1991. Fisiología de la Reproducción de la hembra. En: *Avances y Perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos.* Cap III. editor Fernández Baca S. Santiago-Chile
- Ozdas O.B., Tas M, Cirit U., Evecen M., Demir K., Bacinoglu S., Ak K. and I.K. Ileri. 2005. Effect of different transport temperatures (+4°C, +32°C) on *in vitro* maturation of oocytes collected from cattle and sheep ovaries. *Reproduction, Fertility and Development.* 17(2) 296-296
- Sanchez A. and Silva M. 2003. Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Arch. Med. Vet.* [online]. [citado 24 Junio 2007]. Vol.35(1):119-126.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Anim Reprod Sci.* 67:37-43
- Tas M, Evecen M., Özdas O.B., Cirit U., Demir K., Birler S., Pabuccuoglu S. 2006. Effect of transport and storage temperature of ovaries on *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Anim Reprod Scie.* Vol 96(1-2):30-34
- Wongsrikeao P., Otoi T., Karja N., Agung B., Nii M. and Nagai T. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 51:87-97
- Wood, T., D. Wildt. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and development into blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 110: 355-360.