

Recuperación de ovocitos del ovario de las alpacas (*Vicugna pacos*)

Oocyte recovery from the ovary alpacas (*Vicugna pacos*)

Carlos Rea-Dongo¹, Valeriano Paucara-Ocsa², Ulises Sandro Quispe-Gutiérrez³

¹ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – mvzcarlos1210@gmail.com

² Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – vpaucara@unamba.edu.pe

³ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – usquispe@unamba.edu.pe

Resumen. El objetivo de este estudio fue evaluar los ovocitos recuperados según calidad, métodos de recuperación, medios de colección y medios de transporte de ovarios de alpacas. Se colectaron ovarios del matadero y se transportaron en medios buffer fosfato salino (PBS) o NaCl, mantenidos entre 30 a 36 °C por 6 h hasta el arribo al laboratorio, luego se les mantuvo a 37 °C durante la evaluación. Se recuperaron ovocitos mediante aspiración folicular o slicing; con medio de cultivo tisular (TCM) o PBS. Se aspiraron ovocitos de folículos de 2 a 6 mm de diámetro. Se colectó mayor ($P < 0.05$) cantidad de ovocitos por ovario con el método de slicing que con aspiración (slicing: 10.53 ± 0.53 ; aspiración: 4.98 ± 0.46). Las proporciones de ovocitos recuperados de calidad 1 y 2 aptos para maduración *in vitro* entre método de aspiración (27.4; 40.5%) y slicing (26.8; 38.8%) fueron similares ($P > 0.05$). Los medios de transporte de los ovarios PBS o NaCl, medios de colección de ovocitos PBS o TCM no afectaron ($P > 0.05$) la cantidad de ovocitos ni el número de ovocitos recuperados según calidad. En conclusión, se recuperó más ovocitos con el método slicing que, con aspiración folicular; el número y la calidad de ovocitos recuperados no fueron afectados por medios de transporte de ovarios PBS o NaCl ni por medios de colección de ovocitos PBS o TCM

Palabras clave: TCM, PBS, Camélido.

Abstract. The objective of the study was to evaluate the recovered oocytes according to quality, recovery methods, collection media and ovarian transport media in alpaca. Ovaries were collected from the slaughterhouse and transported in phosphate buffered saline (PBS) or NaCl media, kept between 30 to 36 °C for 6 h until arrival at the laboratory, then they were kept at 37 °C during the evaluation. Oocytes were recovered by follicular aspiration or slicing; with tissue culture medium (TCM) or PBS. Oocytes were aspirated from follicles 2 to 6 mm in diameter. A greater ($P < 0.05$) number of oocytes per ovary was collected with the slicing method than with aspiration (slicing: 10.53 ± 0.53 ; aspiration: 4.98 ± 0.46). The proportions of quality 1 and 2 recovered oocytes suitable for *in vitro* maturation between aspiration (27.4; 40.5%) and slicing (26.8; 38.8%) were similar ($P > 0.05$). PBS or NaCl ovarian transport media, PBS or TCM oocyte collection media did not affect ($P > 0.05$) the number of oocytes or the number of oocytes recovered according to quality. In conclusion, more oocytes were recovered with the cutting method than with follicular aspiration; the number and quality of retrieved oocytes were not affected by PBS or NaCl oocyte transport media or by PBS or TCM oocyte collection media.

Keywords: TCM, PBS, Camelid.

1 Introducción

La carne y fibra constituyen los productos principales de importancia económica en los sistemas de producción de alpacas [1]. El Perú posee una población de 3 685 516 alpacas, alrededor del 90% son de baja calidad genética [2]. Esta calidad genética, entre otros factores, está relacionada directamente con la fertilidad, que cada vez es más afectada [3].

Las biotecnologías reproductivas en camélidos que están en desarrollo en el Perú, incluyen la inseminación artificial, transferencia de embriones, criopreservación de gametos y estudios preliminares sobre fertilización *in vitro* [4]. Los protocolos de recuperación y maduración de ovocitos afectan la fertilización *in vitro*, siendo bajas [5,6]. Los estudios futuros que implican la aplicación de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos deben centrarse en el desarrollo de protocolos estandarizados para la maduración *in vitro* de ovocitos y cultivo de embriones, estos avances deben contribuir a la producción exitosa de la primera cría de camélidos sudamericanos derivado de tecnologías *in vitro* [5]; que permitiría la posibilidad de obtener mayor número de generaciones de poblaciones en tiempo menor [6].

Por las consideraciones anteriores, hay necesidad de mejorar el transporte de ovarios, medios de colección y métodos de recuperación de ovocitos; en consecuencia, obtener más cantidad de ovocitos de calidad que sirvan para la maduración *in vitro*. Esto podría ayudar a mejorar las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos. El objetivo de este estudio fue evaluar los ovocitos recuperados según calidad, métodos de recuperación, medios de colección y medios de transporte de ovarios de alpacas Huacaya.

2 Método

2.1 Localización

El estudio de la evaluación ovocitaria, se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga (13°08'40.3"S 74°13'25.8"W). Los ovarios de las alpacas, fueron recuperados del Camal Municipal de Huancavelica (12°47'25.8"S 75°02'15.1"W).

2.2 Diseño experimental

Se usó dos medios de transporte de ovarios: fosfato buffer salino (PBS), NaCl al 0.9%; dos medios de colección de ovocitos: medio de cultivo tisular (TCM - 199), PBS; dos métodos de recuperación de ovocitos: aspiración folicular y slicing. Distribuidos al azar en factorial 2Ax2Bx2C (A = medios de transporte; B = medios de colección; C = métodos de recuperación).

2.3 Colección y transporte de ovarios

Colección de ovarios

Los ovarios fueron colectados (n=160) de alpacas adultas Huacaya postmortem beneficiadas en el Camal Municipal de Huancavelica, dentro de los 15 min de beneficio aproximadamente. Los ovarios se cortaron de la bolsa ovárica, luego, colocados en bolsas de polietileno en medios de transporte.

Transporte de ovarios

Los ovarios fueron transportados en dos medios de transporte PBS o NaCl, cada uno en 500 mL de medio, dentro de la caja de poliestireno, donde se mantuvieron a una temperatura de 30 a 36 °C arribando al laboratorio en 6 h aproximadamente para su evaluación.

2.4 Recuperación de ovocitos

Por método de aspiración

Los ovarios fueron lavados dos veces con cloruro de sodio al 0.9%, manteniéndose a 36 °C utilizando platina térmica. Se aspiró los ovocitos de folículos de 2 a 6 mm de diámetro con aguja de 18 G x 1.5'' adosado a una jeringa de 10 mL, donde contenía 1 mL de PBS o TCM. Se aspiró de ambos grupos de ovarios con medios de transporte NaCl o PBS. El contenido folicular aspirado se colocó a tubos cónicos de 45 mL, sedimentando por 15 min, luego se aspiró el sedimento con pipeta Pasteur hacia las placas Petri de 10 x 30 mm de diámetro para su evaluación posterior.

Por método de slicing

Los ovarios fueron manipulados como se describió anteriormente, hasta la colocación sobre las placas Petri (14 x 93 mm) que contenía 2 mL de PBS o TCM, se sujetó con pinza el ovario y se realizó los cortes longitudinales y transversales a distancias de 2 mm aproximadamente por los lados de la pared ovárica donde se ubica la corteza ovárica, luego se embebió con el medio de colección y se realizó el lavado con el mismo medio. El contenido de la placa Petri se transfirió a otra placa de 10 x 30 mm dejando reposar por 15 min hasta su evaluación posterior.



2.5 Evaluación de ovocitos

Previo a la evaluación los ovocitos, los ovocitos fueron lavados en gotas de PBS o TCM en repetidas veces. La calidad de los ovocitos se evaluó de acuerdo a la clasificación morfológica descrito por De Loos et al. [7]; los ovocitos fueron categorizados según el número de capas de células del cumulus y el aspecto del citoplasma, categoría 1: COC con ≥ 5 capas de células del cumulus compactos y citoplasma homogéneo; categoría 2: COC con 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 3: ≤ 1 capa de células de la granulosa o parcialmente denudado, y citoplasma vacuolado; y categoría 4: ovocitos denudados y citoplasma granular.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico SAS v 9.3 [8]. Se comprobó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas con Levene. Los datos se transformaron a valores angulares cuando fueron necesarios. Se realizó el análisis de varianza mediante procedimiento GLM considerando factorial $2A \times 2B \times 2C$ (factor A, medios de transporte de ovarios: PBS o NaCl; factor B, factor método de recuperación de ovocitos: aspiración o slicing; factor C, medio de colección de ovocitos: PBS o TCM). La comparación de medias se realizó con prueba de Tukey. Se consideró que hubo diferencia cuando $P \leq 0.05$.

3 Resultados

3.1 Ovocitos recuperados

Los resultados de los ovocitos recuperados se muestran en la Tabla 1. Se recuperó mayor ($P < 0.05$) cantidad de ovocitos con el método slicing que con aspiración. Los medios de transporte de ovarios con PBS o NaCl, medios de colección de ovocitos con PBS o TCM no afectaron ($P > 0.05$) la cantidad de ovocitos recuperados. Entre medios de transporte, medios de colección y métodos de recuperación no hubieron ($P > 0.05$) interacciones para la cantidad de ovocitos recuperados.

Tabla 1. Media de ovocitos recuperados (\pm desviación estándar) de ovarios de alpacas, según medios de transporte, medios de colección y métodos de recuperación.

Medio de transporte	Método de recuperación	Medio de colección	Ovarios utilizados (n)	Total de ovocitos recuperados	Ovocitos por ovario
PBS	Aspiración	PBS	20	99	4.95 \pm 0.64
		TCM	20	105	5.25 \pm 0.49
	Slicing	PBS	20	213	10.65 \pm 0.64
		TCM	20	217	10.85 \pm 0.49
NaCl	Aspiración	PBS	20	98	4.90 \pm 0.57
		TCM	20	96	4.80 \pm 0.14
	Slicing	PBS	20	203	10.15 \pm 0.21
		TCM	20	209	10.45 \pm 0.78
	Aspiración		80	398	4.98 \pm 0.46 ^a
	Slicing		80	842	10.53 \pm 0.53 ^b

Letras con superíndices distintas dentro de la misma columna expresan diferencias ($P < 0.05$).
 PBS= buffer fosfato salino; TCM= medio de cultivo tisular.

3.2 Cantidad de ovocitos recuperados según calidad

Los resultados de los ovocitos recuperados de acuerdo a la calidad se muestran en la Tabla 2. Se colectó mayor ($P < 0.05$) número de ovocitos de calidad 1, 2, 3 y 4 con el método de slicing que con aspiración folicular. Las proporciones de ovocitos recuperados de calidad 1 y 2 aptos para maduración in vitro entre método de aspiración (27.4; 40.5%) y slicing (26.8; 38.8%) fueron similares ($P > 0.05$). Los medios de transporte de ovarios PBS o NaCl, medios de colección de ovocitos PBS o TCM no afectaron ($P > 0.05$) sobre la calidad de ovocitos recuperados. No hubo ($P > 0.05$) interacciones entre medios de transporte, medios de colección y métodos de recuperación para la cantidad de ovocitos recuperados según calidad.

Tabla 2. Número de ovocitos recuperados clasificados según calidad y métodos de recuperación de ovocitos de Alpacas.

Calidad de ovocito	Método de recuperación de ovocitos			
	Aspiración (n = 80 ovarios)		Slicing (n = 80 ovarios)	
	Cantidad	%	Cantidad	%
1	109 ^a	27.4	226 ^b	26.8
2	161 ^a	40.5	327 ^b	38.8
3	51 ^a	12.8	106 ^b	12.6
4	77 ^a	19.3	183 ^b	21.7
Total	398		842	

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la misma fila expresan diferencia ($P \leq 0.05$).

4 Discusiones Conclusiones

Los resultados encontrados en esta investigación de ovocitos recuperados por ovario por método de aspiración fue 5.0 ± 0.4 ; por slicing 10.5 ± 0.5 ; estos resultados son respaldados por Vasquez et al. [9] quienes recuperaron 4.50 ± 2.06 ovocitos con método de aspiración y 10.0 ± 7.01 ovocitos por ovario utilizando corte folicular. Otros estudios muestran resultados variables, Benavides et al. [10] reportan por método de aspiración 7.42 ± 4.67 ; por disección 14.45 ± 4.38 de ovocitos colectados por ovario. Gomez et al. [11] encontraron por aspiración folicular 3.21 ± 1.19 ; por slicing folicular

3.77 ± 1.25 ; por disección-ruptura folicular 4.08 ± 1.15 ovocitos colectados por ovario. Mamani [12] recuperó 2.5 de COC viables por ovario; Ruiz et al. [13] 2.2 COC por ovario de alpaca.

Varios factores afectarían la cantidad de los ovocitos recuperados. Uno de los más importantes sería el estado de la onda folicular, que estaría relacionado con la nutrición. La época en que se colectó los ovocitos, este estudio se realizó en época seca, donde la disponibilidad de alimentos para las alpacas es limitada. Dupont et al. [14] señalan que en los rumiantes como en otros mamíferos, las alteraciones de la energía y el metabolismo de proteínas relacionados con las variaciones en la dieta pueden afectar las funciones reproductivas a diferentes niveles en el eje gonadotrópico. Los factores que influyen son los nutrientes (ácidos grasos, glucosa y aminoácidos) y las señales hormonales de diversos tejidos periféricos, IGF-I, hormona del crecimiento, hormonas tiroideas y adipocinas como leptina, adiponectina y resistina. El metabolismo de la glucosa en la función folicular es importante para el desarrollo de los ovocitos [15].

Los ovocitos recuperados de acuerdo a la calidad encontrados en el presente estudio, para las calidades I más II (67.9% mediante aspiración; 65.6% a través de slicing), son respaldados por Gomez et al. [11] quienes recuperaron 63.2, 67.9 y 72.4% de complejos ovocitos cumulus de calidad I y II, con los métodos de aspiración folicular, slicing de ovarios y disección-ruptura folicular, respectivamente. En otro estudio Benavides et al. [10] recuperaron 17.5 y 63.41% de ovocitos de calidad A y B mediante aspiración; 18.46 y 56.34% de calidad A y B por el método de disección. Vasquez et al. [9] reportaron 40.0 y 31.1% de ovocitos colectados por aspiración; 30.0 y 31.0% por corte de ovocitos de calidad I y II, respectivamente.

El estado de crecimiento y desarrollo de los folículos afectaría la calidad de los ovocitos. Trasorras et al. [16] señalan que, al no conocerse los estados de los folículos si están en fase preovulatoria, crecimiento o regresión, afectaría la calidad de los ovocitos. La mayor cantidad de ovocitos recuperados por método de corte, estaría atribuido a que son provenientes de diferentes tamaños o fases de folículos, mientras por aspiración los ovocitos fueron aspirados de folículos entre 2 a 6 mm de diámetro. El crecimiento y desarrollo de los folículos y los ovocitos es influido por las gonadotropinas y estas tienen dependencia de la nutrición. La insulina, leptina, factor de crecimiento tipo insulinoide, hormona de crecimiento, hormonas tiroideas, ghrelina, apelina, adipocinas, adiponectina, resistina y otras biomoléculas posiblemente regulen la cantidad de energía requerida en el crecimiento de folículos, ovocitos y embriones [14]. La calidad de los ovocitos es afectada por la nutrición y alimentación, sobre todo el tipo energético, en efecto influye en los mecanismos reproductivos de los animales [17,18]. El crecimiento y maduración de los ovocitos son afectados por procesos metabólicos energéticos que ocurren en los mismos, por tanto, afectan la calidad de los ovocitos, la participación de los ácidos grasos es fundamental [19,18].

5 Referencias

1. Trillo Zárate, F., Calcina Condori, J., Barrantes Campos, C., Aliaga Gutiérrez, J.: Influencia del sexo, edad, año y efectos maternos aditivos y permanentes sobre características de importancia económica en alpacas Huacaya. *Rev. Investig. Vet. del Perú* 32, e18493 (2021).
2. INEL.: Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012. (2012).
3. Huanca, T.: Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (vicugna pacos). Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela (2008).
4. Huanca, W.L.: Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia* IX, 505–509 (2005).
5. Leisinger, C., Coffman, E., Coutinho da Silva, M., Forshey, B., Pinto, C.: Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama pacos*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 150, 70–75 (2014).
6. Conde, P. A., Herrera, C., Trasorras, V. L., Giuliano, S. M., Director, A., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Sarchi, M. I., Stivale, D., Quintans, C., Agüero, A., Rutter, B., Pasqualini, S.: In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 298–308 (2008).
7. De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., Kruij, T.: Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24, 197–204 (1989).
8. SAS: Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (2011).
9. Vasquez Turpo, N.F., Durand Perez, M.G., Olivera Marocho, L.V., Perez Guerra, U.H.: Efecto de dos Métodos de Colección sobre la Cantidad y Calidad Ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llamas (*Lama glama*) post mórtem. *Rev. Investig. Altoandinas* 17, 331–340 (2015).

10. Benavides I,L., Huanca L,W., Quintanilla M,L.: Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro. *Rev. Investig. Vet. del Peru* 26, 596–603 (2015).
11. Gomez, O., Choque, D., Henao, F., Escobedo, M., Valverde, N.: Comparación de tres métodos de recuperación de complejos ovocito-cúmulus (COCs) de alpaca recuperados de ovarios postmortem en un camal. *Spermova* 3, 103–104 (2013).
12. Mamani Mango, G.D.: Métodos de selección espermática y tasa de fecundación in vitro en ovocitos de alpaca (Vicugna pacos). Tesis de maestría. Universidad Nacional Agraria la Molina (2015).
13. Ruiz, J.A., Correa, J.E., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M., Zacarías, A.: Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. In I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica (2007).
14. Dupont, J., Scaramuzzi, R. J., Reverchon, M.: The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 8, 1031–1044 (2014).
15. Collado-Fernandez, E., Picton, H.M., Dumollard, Ré.: Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 799–808 (2012).
16. Trasorras, V., Giuliano, S., Miragaya, M.: In vitro production of embryos in South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 136, 187–193 (2013).
17. Ruiz, A.Z., Rossini, M., Araneda, R., Pinto, L., Drescher, K., Pérez, R., Dominguez, C., Jerez, N.: Efecto del nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, expresión de transportadores de glucosa y tolerancia a la insulina en vacas mestizas durante el parto. *Zootec. Trop.* 26, 94–104 (2008).
18. de Andrade Melo-Sterza, F., Poehland, R.: Lipid metabolism in bovine oocytes and early embryos under in vivo, in vitro, and stress conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3421 (2021).
19. D’Occhio, M.J.D., Baruselli, P.S., Campanile, G.: Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 125, 277–284 (2018).