

**EFFECTO DE LA RAZA DE LA DONADORA SOBRE LA CANTIDAD Y CALIDAD DE
OVOCITOS RECUPERADOS POR ASPIRACION FOLICULAR GUIADA POR
ULTRASONOGRAFIA TRANSVAGINAL**

Effect of donor breed on oocyte quality and quantity recovery by transvaginal
ultrasound-guided ovum pick-up

C. Quispe¹, E. Fernández², E. Ancco¹, K. Oriundo¹, E. Mellisho¹

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.13>

¹ *Laboratorio de Biotecnología
Reproductiva, Departamento
Producción Animal, Facultad
de Zootecnia, Universidad
Nacional Agraria La Molina.*

² *Unidad experimental de
zootecnia – Renato Zepilli,
Facultad de Zootecnia,
Universidad Nacional
Agraria La Molina.*

E-mail:
carlosequ_vet@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la raza de ganado lechero (Holstein, Brown Swiss y Simmental) sobre la calidad y cantidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. Se realizaron 88 sesiones en vacas de tres razas lecheras (13 Simmental, 12 Brown Swiss y 63 Holstein), criadas en sistema intensivo entre 50 a 120 días en lactación post parto con un promedio de producción de lote de 22, 26 y 36 kg/leche/día para las razas Simmental, Brown swiss y Holstein. Se consideraron vacas cíclicas en condición corporal no menor a 2.5 ni mayor a 4, sin problemas reproductivos. Para el proceso de aspiración se utilizó un ecógrafo con transductor microconvexo a una frecuencia de 7.5 MHz vía transvaginal con una guía de aspiración folicular con aguja de 21G conectada a cañería y guía de aspiración a una bomba al vacío a la presión de 50 mm de Hg. El contenido folicular se trasladó al laboratorio para pasarlas por un filtro de 100 μ m de diámetro y separar los ovocitos y las células del cumulus de los demás restos celulares y sangre. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron visualizados bajo un microscopio estereoscópico entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm conteniendo medio H-199® para ser clasificados bajo un aumento de 40X. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías, siendo clasificadas como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D). Los datos fueron analizados con la prueba de T-Student encontrándose diferencias significativas ($P<0,05$) en el número de ovocitos recuperados entre las tres razas (Simmental, 9.1 ovocitos. Brown swiss, 7,0 ovocitos y Holstein, 5,2 ovocitos), siendo superior en la raza Simmental en calidad y cantidad de ovocitos. En conclusión, existe diferencia entre razas en la calidad y cantidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal.

Palabras clave: OPU, ovocito, bovinos, ultrasonido.

ABSTRACT

The ovaries of a cow have an abundant source of oocytes. The objective was to determine the effect of dairy cattle breed (Holsteins, Brown Swiss and Simmental) on the quality and quantity of oocytes recovered by transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up. 88 sessions were held in three dairy cows breeds (Simmental, 13, Brown Swiss, 12 and Holstein, 63), raised in intensive system between 50-120 days postpartum lactation with an average production of 22, 26 and 36 kg / milk / day for the Simmental, Brown Swiss and Holstein breed. Cycling cows and body condition (>2.5 to 4.0) and without reproductive problems were considered for the aspiration process with microconvexo ultrasound transducer a frequency of 7.5 MHz with by transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up with 21G needle. The aspiration was OPU a vacuum pump to a pressure of 50 mm Hg. Follicular contents were transferred to the laboratory and to pass through a filter 100 um in diameter and separate the oocyte and cumulus cells of blood and other cellular debris. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were visualized under a stereoscopic microscope at 40X 20 immediately transferred to a 10 mm plate 35x H-199® containing means to be classified under 40X magnification. COCs were evaluated by morphology and classified into four categories, being classified as viable (quality A and B) and non-viable (grade C and D). Data were analyzed with T - Student test meeting significant differences ($P \leq 0.05$) in oocytes retrieved number among the three breeds (Simmental, 9.1, Brown Swiss 7.0 and Holstein, 5.2), being higher in the Simmental breed in quality and quantity of oocytes. In conclusion, there is a difference between breeds in the quality and quantity of oocytes recovered by follicular transvaginal ultrasound-guided aspiration

Keywords: OPU, oocyte, bovine, ultrasound

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas están siendo utilizadas cada vez con mayor énfasis en países sudamericanos, persiguen un fin común, el mejoramiento genético del ganado. Al respecto Munar *et al.* (2013) menciona que la producción de embriones se puede realizar mediante superovulación de donadoras y obtención de ovocitos de donantes para los sistemas de fecundación *in vitro* (IVF).

Es importante tener presente que, en condiciones naturales, menos del 0,1% de los folículos llegan a ovulación (Gosden y Telfer, 1987). Sin embargo, los ovarios de vacas (*Bos Taurus*) representan una fuente abundante y desaprovechada de germoplasma. Silva-Santos *et al.* (2011) afirman que la población de folículos pre antrales varía de 109,000 a 89,000 entre el estatus de vaquilla a vaca. No obstante, hay que considerar que dicho número declina con el tiempo para reducirse a unos 3,000 folículos en vacas de 15 a 20 años de edad (Erickson, 1996). Por lo que, recuperar los ovarios de matadero como fuente germoplasma para procedimiento de fecundación *in vitro*, permitirá generar crías viables, a pesar que la hembra haya sido beneficiada en el matadero, revalorizando la genética del animal.

En el enfoque de fecundación *in vitro* (IVF), el uso de ovocitos con alta capacidad de desarrollo podría eliminar algunos factores que afectan directamente en la eficiencia reproductiva del rebaño, tales como gestión de la detección de celo, momento de inseminación relativa a la ovulación y procedimiento de inseminación artificial (Abraham *et al.*, 2012). Además, permite incrementar el desempeño reproductivo de vacas en diferentes etapas reproductivas y vacas con problemas reproductivos o vaquillas de alto valor genético incluso pre-púberes.

La aspiración de los folículos ováricos por vía transvaginal guiada por ultrasonografía (Ovum Pick-up, OPU) fue descrita por primera por Pieterse *et al.* (1988) y se ha convertido en una de las alternativas para incrementar la tasa reproductiva de la hembra con la producción eficiente de embriones *in vitro*. En la actualidad los laboratorios *in vitro* bien manejados logran una tasa de blastocistos alrededor de 35% a partir de ovocitos viables recuperados, lo que implica que al momento de la aspiración folicular las donadoras deberían tener la máxima cantidad de folículos entre 4 a 8 mm de diámetro, que permita incrementar la eficiencia en la recuperación de ovocitos. El procedimiento transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) es semi-invasivo, altamente repetible y se puede aplicar a los animales en varios estados reproductivos (Pontes *et al.*, 2009). La eficiencia de recuperación de ovocitos en bovinos a través de OPU está sujeta a muchos factores relacionados a la donante; genética, estado fisiológico, raza, condición corporal, etc.

Nuestro estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la raza de ganado lechero (Holstein, Brown Swiss y Simmental) sobre la calidad y cantidad de

ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en la Unidad Experimental de Zootecnia “Renato Zepilli”, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicada en el distrito de la Molina, Lima, Perú.

Se realizaron 88 sesiones en vacas de tres razas lecheras (12 Brown Swiss, 63 Holstein y 13 Simmental), criadas en sistema intensivo entre 50 a 120 días en lactación post parto con un promedio de producción de lote de 22, 26 y 36 kg/leche/día para las razas Simmental, Brown Swiss y Holstein. Se consideraron vacas cíclicas en condición corporal no menor a 2.5 ni mayor a 4, sin problemas reproductivos.

Todos los animales fueron sometidos a un protocolo de sincronización de onda folicular 1.2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrovet®, Montana), 50 mg de progesterona (Progestyn A-E, Lab Tornel S.A Mexico), 0.524 mg de prostaglandina F2a (Lutaprost®, Agrovit Market) e inserción de un implante intravaginal de 1 g de progesterona (DIB, Syntex, Argentina). La aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal fue realizada al día 4 del inicio del tratamiento. Previa a cada sesión de OPU se prepararon los animales realizando la evacuación del recto y la limpieza de la zona del periné. Se aplicó anestesia epidural a una dosis de 5ml de lidocaína al 2% en el espacio sacro cóxigea. Para el proceso de aspiración se utilizó un ecógrafo (DP-50vet, Mindray, China) con transductor microconvexo a una frecuencia de 7.5 MHZ vía transvaginal con una guía de aspiración folicular (WTA®, Brasil) con aguja de 21G (WTA®, Brasil) conectada a cañería y guía de aspiración a una bomba al vacío a la presión de 50 mm de Hg.

Los folículos se visualizaron, para conocer la población folicular y se aspiraron folículos entre 4 – 8 mm en el tubo cónico temperado a 37 c° y contenía solución buffer fosfato (PBS) suplementada con heparina sódica, con el fin de disminuir la presencia de coágulos que afecten la recuperación de ovocitos.

El contenido folicular fue colectado en un tubo cónico de 50 ml (Falcon®), y trasladadas al laboratorio para pasarlas por un filtro de 100 µm de diámetro y separar los ovocitos y las células del cumulus de los demás restos celulares y sangre. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron visualizados bajo un

microscopio estereoscopio entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm (Falcon® 1008) conteniendo medio H-199® (Vitrogen, Brasil), para ser clasificados bajo un aumento de 40X. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (De Loos et al., 1989) (1) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cumulus con citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente por células del cumulus y citoplasma irregular, (3) ovocitos desnudos y (4) ovocitos rodeado por fibrina, con aspecto de tela de araña. Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.

Se determinaron las diferencias entre calidad y cantidad de ovocitos recuperados entre razas, se hizo una prueba de comparación de medias y el estadístico de prueba fue la prueba de T – student utilizando el programa “R” versión 3.1.3 con un nivel de significancia de p<0.05.

RESULTADOS

En la tabla 1, se presentan la cantidad y calidad de ovocitos recuperados en las tres razas lecheras, indicando que la raza simmental presentó un mayor número de ovocitos en cantidad y calidad y estadísticamente diferente (p<0.05) a las razas Holstein y Brown swiss.

Tabla 1: Recuperación de ovocitos totales y viables por sesión OPU

	Raza		
	Brown Swiss	Holstein	Simmental
Sesiones OPU (n)	12	63	13
Ov. Recup./Sesión	7.0a	5.2a	9.1b
Ov. Viables (A y B) /Sesión	2.4a	2.1a	3.3b

Las comparaciones entre medias son entre razas. a, b, letras diferentes indican que existen diferencias significativas (p<0.05)

DISCUSION

Para recuperar un mayor número de ovocitos por donadora es necesario un número mayor de folículos en el ovario, la cual está influenciada principalmente por la raza de la donadora, estatus nutricional y condiciones climáticas. La diferencia entre razas presenta un número de folículos diferentes en la dinámica folicular del ovario. Figueiredo *et al.* (1997)

y Viana *et al.* (2000) han reportado que las razas Bos indicus tienen un número mayor de ondas foliculares. Así mismo, Segerson *et al.* (1984) reportaron una mayor población folicular (< 5mm) en Bos indicus comparado a Bos taurus. A pesar de que Silva-Santos *et al.* (2011) reportaron que no hay diferencias entre la población folicular de ovarios fetos y vaquillas en Bos taurus y B. indicus.

En nuestro trabajo las tres razas lecheras mostraron un número de ovocitos recuperados por raza Holstein (5,2 ovocitos), Brown swiss (7,0 ovocitos) y Simmental (9.1 ovocitos) siendo inferior a lo reportado por Rafagnin *et al.* (2011) quienes reportaron en la raza Gir (Bos indicus) y Holstein (Bos Taurus) de 17.1 vs 11.4 ovocitos totales recuperados y 12.1 vs 8.0 ovocitos viables por sesión.

Silva-Santos *et al.* (2011) afirman que la población de folículos pre antrales varía de 109,000 a 89,000 entre el estatus de vaquilla a vaca. Rizos *et al.* (2005) indicaron que el número de ovocitos recuperados puede ser afectado por el número de partos (núlpara y múltipara), siendo los valores para vaquillas y vacas Holstein un número total de ovocitos recuperados de 4.7 vs 2.8, y ovocitos de calidad A y B de 3.0 vs 1.8, respectivamente, siendo estos similares a los resultados obtenidos en nuestro estudio en la raza Holstein. Según Pérez (2003), el número de folículos (>5mm) de diámetro posible a OPU es significativamente baja en vacas post parto en raza de carne (2.0 ± 0.3 y leche (1.8 ± 0.3), reduciendo la probabilidad de obtener un blastocisto producido *in vitro*.

CONCLUSIÓN

Existen diferencias entre razas sobre la calidad y cantidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal

AGRADECIMIENTOS

Unidad experimental de zootecnia "Renato Zepilli", Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

REFERENCIAS

- Abraham M, Gustafsson H, Ruete A, Brandt Y. Breed influences on *in vitro* development of abattoir-derived bovine oocytes. Acta Veterinaria Scandinavica 2012, 54:36.
- De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip T. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 1989; 24(2):197-204.

- Erickson B. Development and senescence of the bovine ovary. Journal of Animal Science 1996, 25:800–805.
- Figueiredo R, Barros C, Pinheiro O, Soler J. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. Theriogenology 1997; 47: 1489-1505.
- Gosden R, Telfer E. Numbers of follicles in mammalian ovaries and their allometric relationships. J. Zool, 1987. 211, 169 – 175.
- Munar C, Mujica I, Martín E, Irouleguy J, Huter S, Alonso H, Arzeno M, Goitia O, Farnetano N, Anchordoqui J. Factors affecting efficiency of recipients herds in dairy and beef cattle operations. Spermova 2013; 1(1): 15 – 19.
- Pérez O. Oocyte production in the early postpartum cow. Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University. Requirements for the degree of Doctor of Philosophy. 2003. 152pp.
- Pieterse M, Kappen K, Kruip T, Taverne M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology, 1988. 30:751-762.
- Pontes J, Nonato-Junior I, Sanches B, Ereno-Junior J, Uvo S, Barreiros T, Oliveira J, Hasler J, Seneda M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. Theriogenology 2009; 71:690–7.
- Rafagnin L, Fernandes K, Gomes Dos Santos G, Fortes J. Producción *in vitro* de embriones de razas lecheras a gran escala. Spermova, 2011; 1(1): 86 -91.
- Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee J, O'Farrell K, MacSiurtain M, Lonergan P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. Theriogenology 2005; 63: 939–949.
- Segerson E, Hansen T, Libby D, Randel R, Getz W. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. J Anim Sci, 1984; 59: 1026-1046.
- Silva-Santos K, Seneda M. Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries Anim. Reprod, 2011, v.8, n.3/4, p.58-67.
- Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard J, Chastant S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. Reproduction 2003. 126, 629–637.