

EVALUACIÓN DE LA SUPERESTIMULACIÓN OVÁRICA Y LA CALIDAD MORFOLOGICA DE OOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR

Giovanni Restrepo Betancur¹, Jorge Gómez Oquendo², Neil Vasquez Araque³

¹Magíster en Biotecnología, Profesor asistente, Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 N° 7-151 Medellín, Colombia, grestrepo@elpoli.edu.co

²Medico Veterinario, Profesor titular, Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 N° 7-151 Medellín, Colombia, jegomez52@gmail.com

³Magíster en Ciencias Biomédicas, Profesor asociado, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A No 63–20 Medellín, Colombia, nvasquez@unal.edu.co

RESUMEN

La aspiración folicular guiada por ultrasonido (AFGU) acoplada a la producción in vitro de embriones (PIVE), es una alternativa importante para el aprovechamiento de los recursos genéticos de hembras bovinas de alto potencial productivo. Sin embargo, la calidad reducida de los oocitos recuperados afecta la eficiencia de obtención de embriones. Esta investigación compara el desarrollo folicular y la calidad por criterios morfológicos de oocitos recuperados por AFGU, desde hembras bovinas estimuladas con FSH, o con la combinación FSH-hCG. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student. Los resultados evidenciaron una mayor calidad morfológica de los oocitos recuperados a partir de animales estimulados con FSH y hCG, respecto a aquellos estimulados solo con FSH. Se concluye que la inclusión de hCG en un esquema para la superestimulación ovárica con FSH de hembras bovinas sometidas a aspiración folicular, ejerce un efecto favorable sobre la calidad de los oocitos recuperados.

Palabras clave: oocitos bovinos, aspiración folicular, gonadotropinas, folículos ováricos.

Recibido: 01 de Octubre de 2010. Aceptado: 26 de Diciembre de 2011

Received: October 1st, 2010. Accepted: December 26th, 2011

EVALUATION OF THE OVARIAN SUPERSTIMULATION AND QUALITY OF BOVINE OOCYTES OBTAINED BY OVUM PICK UP

ABSTRACT

The ovum pick-up (OPU) coupled with the in vitro embryo production (IVP), is an important alternative to the use of genetic resources of cattle with high productive potential. However, the poor quality of oocytes recovered affects the efficiency of production of embryos. This research compares the follicular development and the quality by morphological criteria of oocytes recovered by OPU from cattle with FSH stimulation, or with FSH-hCG combination. Statistical analysis was performed by Student's t test. The results showed statistically higher quality of oocytes recovered from animals stimulated with FSH and hCG, compared to those stimulated with FSH alone. We conclude that the addition of hCG in a scheme for ovarian stimulation with FSH in cattle subjected to ovum pick-up, has a positive effect on the quality of oocytes retrieved.

Keywords: bovine oocytes, ovum pick-up, gonadotropins, ovarian follicles.

1. INTRODUCCIÓN

El ineficiente aprovechamiento de los recursos genéticos de las hembras bovinas de alto potencial productivo, es reconocido como una limitante de gran importancia en la ganadería de muchos países [1]. Uno de los procesos biotecnológicos implementados para superar dicha situación es la transferencia de embriones producidos por superovulación, la cual se ha tornado ineficiente a razón del reducido número de embriones transferibles y la alta variabilidad de los resultados en cada proceso [2], [3]. Con el fin de superar estas limitantes se desarrolló la aspiración folicular guiada por ultrasonido (AFGU), una técnica reportada por Pieterse y colaboradores en 1.988 [4], que ha demostrado ser exitosa y reproducible para la obtención de oocitos a partir de vacas y novillas, y que acoplada a la producción in vitro de embriones (PIVE), es más eficiente que la superovulación y la transferencia de embriones convencional [5], [6].

La hormona folículo estimulante (FSH) es conocida por inducir un incremento en el número de folículos ováricos antrales y preovulatorios, durante protocolos de superovulación y estimulación ovárica previa a la aspiración folicular. Sin embargo, se ha planteado que esta hormona por sí sola puede tener un efecto desfavorable para el logro de una adecuada competencia para el desarrollo de los oocitos bovinos. Lo cual es explicado por un crecimiento folicular acelerado, que podría conducir a una maduración asincrónica entre los folículos y los oocitos [7], [8]. Un posible reflejo de esta situación, es que en la mayoría de los reportes solo un máximo del 40% de los oocitos obtenidos por AFGU alcanza el estado embrionario de blastocisto [9]. Como una posible solución, se ha sugerido reducir en los protocolos la administración de FSH durante las fases finales del crecimiento folicular; y a su vez realizar la estimulación de los folículos con LH exógena. Ambos procesos promueven la maduración del folículo pre-ovulatorio y la maduración simultánea de los oocitos [10], permitiendo la obtención de oocitos con calidad superior [11].

Actualmente, es de amplia aceptación que una onda pre-ovulatoria de LH provee la señal para la maduración final del oocito, lo cual comprende la progresión meiótica hasta la metafase II, la adquisición de la capacidad para la fertilización, y la

futura competencia para el desarrollo embrionario [3], [12].

La alta variabilidad en la respuesta ovárica a la superestimulación hormonal es conocida como uno de los aspectos que más afecta la eficiencia de producción de embriones de forma convencional o *in vitro*. Parte de esta variabilidad es atribuible a la variación en el número de folículos durante las ondas, de manera que vacas con un relativamente alto número de folículos responden mejor a la estimulación [13].

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto de dos esquemas de superestimulación hormonal, sobre la respuesta ovárica (cantidad y tamaño de folículos) y la calidad por criterios morfológicos de los oocitos bovinos recuperados por aspiración folicular.

2. METODOLOGÍA

2.1 Localización

El trabajo se realizó en la Granja Román Gómez del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, localizada en el municipio de Marinilla (Antioquia), con una altitud de 2120msnm y una temperatura promedio de 17°C. El sistema de producción ganadera es lechería especializada en pastoreo por rotación, y el pasto predominante es *Pennisetum clandestinum*.

2.2 Superestimulación hormonal

Para el estudio se emplearon cuatro hembras bovinas del cruce F1 (Holstein x Bon) en fase de lactancia temprana, entre 2° y 4° parto, con una condición corporal de 3.5, sin historia de problemas sanitarios o al momento del parto. El ciclo estral de las hembras fue sincronizado mediante el uso de progesterona por el método del dispositivo intravaginal bovino (DIB®), en un protocolo que consistió en la inserción vaginal del dispositivo (1g de progesterona) y la aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol (I.M). Siete días después el dispositivo fue retirado y se aplicaron a cada animal 0.150mg de D(+)-cloprostenol (Prostal®, I.M), y al día siguiente se aplicó 1 mg (I.M) adicional de benzoato de estradiol. El celo fue detectado entre las 48 a 72 horas posteriores al retiro del dispositivo. Cuatro días después de la aparición del celo, en cada animal los folículos ováricos de la onda folicular emergente fueron contados y

medidos mediante ultrasonografía transrectal (Ecógrafo Aquila Vet Pro con transductor lineal 6.0/8.0 MHZ, Piemedical ®), y se realizó la ablación del folículo dominante por aspiración vía transvaginal.

Se estableció un tratamiento de vacas no superestimuladas hormonalmente (control) y dos tratamientos de superestimulación hormonal. Todas las vacas fueron sometidas a los diferentes tratamientos. El primer tratamiento de superestimulación denominado FSH-hCG, fue realizado tomando como base lo reportado por Blondin et al [7]. Fue iniciado el día 6 del ciclo estral, y consistió en seis dosis de FSH (Folltropin 50 mg I.M.) administradas cada 12 horas. Posteriormente las vacas fueron sometidas a un periodo de privación de FSH de 48 horas entre la última inyección de FSH y la aspiración folicular, y finalmente fue administrada a cada animal una dosis de gonadotropina coriónica humana -hCG- (Chorulon ®, 1500 UI. I.V), seis horas antes del procedimiento de aspiración. El segundo tratamiento de superestimulación denominado FSH, consistió en el mismo protocolo exceptuando la administración de hCG. Antes de la aspiración folicular (día 10 post-celo) los folículos ováricos para cada tratamiento fueron nuevamente contados y medidos mediante ultrasonografía transrectal.

2.3 Aspiración folicular

La aspiración folicular fue realizada en base a los procedimientos reportados por Pieterse et al [4] y Blondin et al [7]. Las vacas donadoras de complejos oocito-cúmulo (COC's) fueron contenidas en un brete donde se les vació el recto, y se desinfectó la región perineal. Se utilizó anestesia epidural (120mg de clorhidrato de lidocaina) para producir analgesia y relajación del recto y la vagina. La aspiración folicular se realizó con un equipo de ultrasonografía (Aquila Vet Pro, Piemedical ®), dotado con un transductor R10 de doble frecuencia 5.0/7.5Mhz con ángulo de 150°, y un sistema de punción con una aguja 18G conectado por un sistema de mangueras a una bomba peristáltica de vacío a 75mmHg de presión. Los ovarios fueron manipulados vía rectal con el fin de ubicarlos contra el transductor introducido vía vaginal. Los folículos ováricos visibles fueron puncionados y aspirados a través de la pared vaginal. El líquido folicular fue recolectado en tubos cónicos con medio PBS suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), heparina 20000 UI/L, y gentamicina 0,05 mg/ml. Terminado el proceso de

aspiración, los COC's fueron recuperados desde el líquido folicular utilizando un filtro convencional para embriones y medio PBS suplementado para su lavado.

2.4 Evaluación morfológica de COC's

Los COC's recuperados por aspiración se clasificaron en tres categorías (Tabla 1) de acuerdo a criterios morfológicos de cantidad y calidad de capas de células del cúmulo, y de apariencia del ooplasma, considerando parámetros establecidos por Lindner y Wright [14].

Tabla 1. Categorías de complejos cúmulo-oocito

Categoría	No. de células del cúmulo	Citoplasma
1	Capas múltiples y compactas de células (> 4)	Homogéneo y transparente
2	Capas múltiples de células de cúmulo (1 a 3)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3	Denudados o con células expandidas	Irregular con zonas oscuras

2.5 Análisis estadístico

La comparación estadística de los resultados en lo relacionado con el tamaño de los folículos ováricos en los diferentes momentos de medición, fue realizada mediante una prueba t de Student, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1®. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Se encontró un rango entre 10 y 15 folículos ováricos por vaca en las hembras sincronizadas y evaluadas por ultrasonografía transvaginal. Con la estimulación hormonal el número de folículos aumentó en un promedio de 4 folículos ováricos totales por animal, mientras que el tamaño folicular aumento de manera considerable como se evidencia en la tabla 2.

Tabla 2. Tamaño folicular promedio (mm ± DS) en los diferentes momentos de medición y tratamientos.

Ítem	4 días post-celo	10 días post-celo / Tratamiento o control	10 días post-celo / Tratamientos de superestimulación
Tamaño folicular	0.38±0.14	0.4±0.23	0.95±0.34*
Varianza	0.021	0.052	0.116
Maximo	0.67	0.8	1.71
Mínimo	0.15	0.2	0.4

*Se encontró diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) para el tamaño folicular (10 días post-celo) entre el control, y el promedio de los tratamientos de superestimulación hormonal.

Los resultados del tamaño de los folículos ováricos para los tratamientos de superestimulación hormonal (FSH vs. FSH-hCG) se muestran en la tabla 3.

Un promedio de siete COC's por animal fueron recolectados mediante aspiración folicular. Los resultados correspondientes a la clasificación morfológica de los COC's recolectados se presentan en la tabla 4. La figura 1 muestra oocitos recuperados del tratamiento FSH-hCG.

Tabla 3. Comparación del tamaño folicular (mm ± DS) entre los tratamientos de superestimulación (FSH vs. FSH-hCG).

Ítem	Tratamiento FSH	Tratamiento FSH-hCG
Tamaño folicular	0.84±0.39	1.022±0.30*
Varianza	0.151	0.091
Maximo	1.71	1.66
Mínimo	0.4	0.57

*No se encontró diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre los tratamientos.

Tabla 4. Resultados por tratamiento de calidad por criterios morfológicos de COC's.

Categoría de Calidad	Tratamiento FSH (% de COC's)	Tratamiento FSH-hCG (% de COC's)
I	0	57
II	40	28.6
III	60	14.4

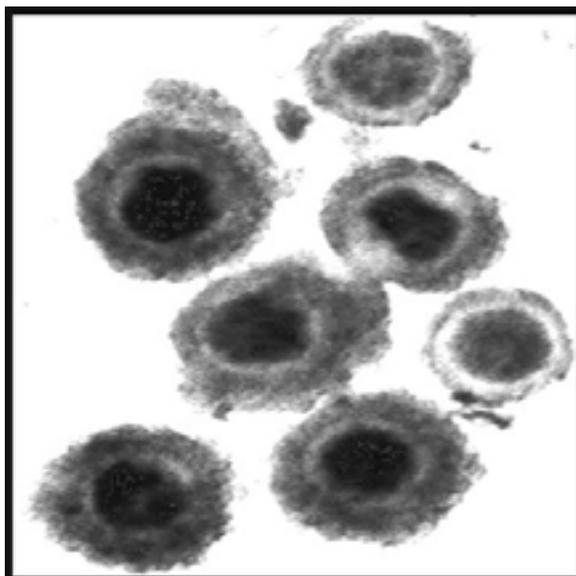


Fig. 1. COC's de vacas superestimuladas con el tratamiento FSH-hCG.

4. DISCUSIÓN

Durante el ciclo estral bovino el desarrollo de ondas foliculares permite a través de los estímulos hormonales apropiados, el crecimiento de un folículo dominante y la ovulación de un oocito competente para desarrollarse en un embrión. Sin embargo, gran cantidad de folículos reclutados en cada onda folicular sufren atresia, como una consecuencia normal de la generación de señales químicas y hormonales derivadas del establecimiento de la dominancia. Los procesos de superestimulación hormonal han sido desarrollados con la finalidad de "rescatar" los numerosos folículos de la atresia, para destinar sus oocitos a procesos biotecnológicos reproductivos como la transferencia de embriones convencional, o la aspiración folicular guiada por ultrasonido acoplada a la producción de embriones *in vitro*.

Convencionalmente la hormona folículo estimulante (FSH) ha sido empleada en los procesos de superestimulación, dado que es reconocido que esta hormona somete a la población de folículos ováricos a un crecimiento acelerado [7]. Lo cual fue corroborado por los resultados de esta investigación, toda vez que se encontró una diferencia estadística significativa en el tamaño de los folículos ováricos en el día 10 del ciclo estral, a favor de aquellos animales que recibieron

protocolos de superestimulación hormonal (incluida la FSH) respecto a aquellos animales donde el crecimiento folicular se dio sin superestimulación.

No se encontró diferencia estadística entre los protocolos de superestimulación hormonal (FSH vs. FSH-hCG), lo cual es coherente con la literatura, dado que el crecimiento acelerado de los folículos es atribuible a la FSH, más no al efecto de una hormona luteinizante como es el caso de la hCG, la cual a pesar de participar en el desarrollo folicular, tiene una función más relacionada con proveer la señal para la maduración final del oocito (progresión meiótica hasta metafase II), lo cual permite la adquisición por parte del oocito de la capacidad para su fertilización y su futura competencia embrionaria para el desarrollo [3], [12].

En promedio al menos 4 folículos ováricos más por vaca fueron encontrados en aquellos animales superestimulados hormonalmente, respecto a aquellos no superestimulados, lo cual coincide con reportes de otros autores [15], [16]. Dicha respuesta es atribuible principalmente al efecto promotor del reclutamiento y el crecimiento de los folículos por parte de la FSH, dado que es ampliamente aceptado el papel de la FSH en la folículoogénesis, lo cual implica que la variación en el número de folículos en crecimiento durante una onda folicular estaría positivamente asociada al menos durante una parte de la onda, con las concentraciones séricas de FSH [13]. Recientemente se plantea la definición de las hembras bovinas como de "bajo potencial", cuando producen un número limitado de embriones a causa de su limitada población de folículos antrales pequeños presentes en el ovario al momento de iniciar el tratamiento con FSH [17].

Se sugiere que el crecimiento acelerado de los folículos ováricos por la acción de la FSH, altera el ambiente folicular idóneo en donde normalmente los oocitos alcanzan un estado de competencia para el desarrollo [18]. De manera que la maduración del oocito no es directamente proporcional a la maduración folicular, con lo cual sería posible esperar una alteración en la calidad intrínseca del oocito establecida por parámetros morfológicos. Lo cual es acorde a los resultados obtenidos, dado que para el tratamiento con FSH no se encontraron COC's de alta calidad (categoría I), mientras el 40% y 60% de los COC's respectivamente, se encontraron en categorías II y

III, correspondientes a COC's de menor calidad de acuerdo a los criterios morfológicos establecidos.

Para el caso del protocolo de superestimulación FSH-hCG, un 57% de los oocitos estuvieron en la categoría de mayor calidad morfológica (Categoría I), mientras el 43% restante se distribuyó en las otras dos categorías. Con lo cual puede inferirse una acción favorable de la hCG sobre la calidad de los oocitos recuperados por aspiración folicular, ya sea de manera individual o sinérgica con la FSH.

5. CONCLUSIÓN

Se concluye que la inclusión de hCG en un esquema para la superestimulación ovárica con FSH de hembras bovinas posteriormente sometidas a aspiración folicular, ejerce un efecto favorable sobre la calidad de oocitos recuperados.

La superestimulación de los folículos ováricos bovinos con FSH o la combinación FSH-hCG, promueve la adquisición de un mayor tamaño en los folículos ováricos, respecto a aquellos no superestimulados. Sin embargo, el tamaño de los folículos ováricos en vacas superestimuladas con FSH, no presenta diferencia respecto al tamaño los folículos ováricos de vacas tratadas con la combinación FSH-hCG.

6. AGRADECIMIENTOS

Dirección de investigaciones del Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Grupos de investigación en Biotecnología Animal BioA (Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín), y GIBA (Politecnico Colombiano JIC).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Palma, G. A. Biotecnología de la Reproducción, Ediciones INTA, Balcarce, 2001.
- [2] Vos, P.L., De Loss, F., Pieterse, M., Bevers, M., Taverne, M. y Dieleman, S. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluid at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows, *Theriogenology*, 41, 829-840, 1994.

- [3] Driancourt, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction, *Theriogenology*, 55, 1211-1239, 2001.
- [4] Pieterse, M.C., Kappen, K., Kruip, T., y Taverne, M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries, *Theriogenology*, 30, 751-762, 1988.
- [5] Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G. y Durocher, J. *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach, *Theriogenology*, 51, 59-70, 1999.
- [6] Hashimoto, S., Takakura, R., Minami, N. y Yamada, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes, *Theriogenology*, 52, 131-138, 1999.
- [7] Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F. y Sirard M. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol of Reprod.*, 66, 38-43, 2002.
- [8] Hendriksen, P., Vos, P., Steenweg, W., Bevers, M. y Dieleman, S. Bovine Follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes, *Theriogenology*, 53, 11-20, 2000.
- [9] Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M. y Lonergan, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire, *Theriogenology*, 57, 2105-2117, 2002.
- [10] Hillier, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis, *Hum Rep.*, 9, 188-191, 1994.
- [11] Bordigon, V., Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D. y Smith, L. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers, *Theriogenology*, 48, 291-298, 1997.
- [12] D'Occhio, M.J., Jillella, D. y Lindsey, B. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH, *Theriogenology*, 51, 9-35, 1999.
- [13] Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Smith, G., Lonergan, P. y Evans A. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 22(6), 1687-1695, 2007.
- [14] Lindner, G. y Wright R. Bovine embryo morphology and evaluation, *Theriogenology*, 20, 407-416, 1983.
- [15] Looney, C.R., Lindsey, B., Gonseth, C. y Johnson, D. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows, *Theriogenology*, 41, 67-72, 1994.
- [16] Stubbings, R. y Walton, J. Effect of Ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows, *Theriogenology*, 43, 705-712, 1995.
- [17] Durocher, J., Morin, N. y Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation, *Theriogenology*, 65(1), 102-115, 2006.
- [18] P. Lonergan, P., Monaghan, D., Rizos, M., Boland, y Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Rep Dev*, 37, 48-53, 1994.