

Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular

John Jairo Giraldo Giraldo¹, Sebastián Ordoñez Ramirez²,
Jorge Gómez Oquendo³, Giovanni Restrepo Betancur⁴

Recibido: 20 de diciembre de 2016 / Aceptado: 20 de marzo de 2017
DOI: 10.22507/jals.v6n1a2

■ Resumen

Introducción. 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 por esta técnica, es uno de los aspectos que más afecta la eficiencia de obtención de embriones. **Materiales y Métodos.** Esta investigación comparó el desarrollo folicular, y la calidad de los oocitos recuperados por AFGU, en hembras bovinas superestimuladas convencionalmente con FSH, o con FSH y hCG. **Resultados.** Se evidenció una mayor calidad en los oocitos recuperados de animales estimulados con FSH y hCG, respecto a aquellos estimulados solo con FSH. **Conclusiones.** 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.

Palabras claves: estimulación ovárica, folículos ováricos, gonadotropinas.

¹ Zoot, Esp, M.Sc. Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista. jogiraldo@lasallistadocentes.edu.co

² Industrial Pecuario. Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista. golddelf@gmail.c

³ MV. Profesor Titular. Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia. jegomez@elpoli.edu.co

⁴ MV, Zoot, M.Sc, Dr. Sci. Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. grestre0@unal.edu.co



Evaluation of ovarian stimulation and quality of bovine oocytes obtained by follicular aspiration

■ Abstract

Introduction. Ultrasound-guided follicular aspiration (UGFA) coupled with the in-vitro production of embryos is an important alternative for the use of genetic resources of bovine females of high productive potential. However, the reduced quality of oocytes recovered with this technique is one of the aspects with the highest impact on the efficiency to obtain embryos. **Materials and methods.** This research compared follicular development with the quality of oocytes recovered by UGFA, in bovine females conventionally over-stimulated with FSH or FSH and hCG. **Results.** A higher quality of oocytes recovered from animals stimulated with FSH and hCG was seen compared to the ones stimulated with FSH only. **Conclusions.** Inclusion of Hcg in a scheme for the ovarian over-stimulation with FSH of bovine females subject to follicular aspiration becomes a favorable effect on the quality of recovered oocytes.

Key words: ovarian stimulation; ovarian follicles; gonadotropins.

Avaliação da estimulação ovárica e qualidade dos ovócitos bovinos obtidos por aspiração folicular

■ Resumo

Introdução. A aspiração folicular guiada por ultra-som (AFGU) juntamente com a produção in vitro de embriões (PIVE) é uma alternativa importante para a utilização dos recursos genéticos de fêmeas bovinas com alto potencial produtivo. No entanto, a qualidade reduzida dos oócitos recuperados por esta técnica é um dos aspectos que mais afetam a eficiência na obtenção de embriões. **Materiais e métodos.** Este estudo comparou o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos recuperados pela AFGU em fêmeas bovinas superestimadas convencionalmente com FSH, ou com FSH e hCG. **Resultados.** Observou-se maior qualidade nos oócitos recuperados de animais estimulados com FSH e hCG, em comparação com aqueles estimulados apenas com FSH. **Conclusões.** A inclusão de hCG em um esquema de superestimulação ovárica com FSH de fêmeas bovinas posteriormente submetidas à aspiração folicular exerce um efeito favorável sobre a qualidade dos oócitos recuperados

Palavras chave: estimulação ovariana, folículos ováricos, gonadotropinas.

■ Introducción

El ineficiente aprovechamiento de los recursos genéticos de hembras bovinas de alto potencial productivo, es reconocido como una limitante importante en la ganadería de muchos países, inclusive cuando se implementan programas de superovulación y transferencia de embriones (Palma, 2008), dado que el número de embriones transferibles producidos por animal es muchas veces reducido, y altamente variable (Driancourt, et al 2001; Vos et al, 1994). Con el fin de superar estas limitantes se desarrolló la aspiración folicular guiada por ultrasonido (AFGU), una técnica reportada por Pieterse et al (1988), 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 (Bousquet et al, 1999; Hashimoto, 1999).

La utilización de hormona folículo estimulante (FSH) tanto para protocolos de superovulación convencional, como para la superestimulación ovárica previa a la AFGU, es conocida por producir un incremento en el número de folículos ováricos antrales y preovulatorios, sin embargo se plantea que es desfavorable para el logro de una adecuada competencia de los oocitos para desarrollarse en embriones, dado que el acelerado crecimiento folicular podría conducir a una maduración asincrónica entre los folículos y los oocitos (Hendriksen et al, 2000). Un reflejo de esta situación, es que para la mayoría de los reportes un máximo del 40% de los oocitos obtenidos mediante AFGU y sometidos a PIVE alcanzan el estado embrionario de blastocisto (Ward et al, 2002). Se ha sugerido que, en las fases finales del crecimiento folicular, una reducción en la administración de FSH, acompañada de la estimulación con LH exógena, promueven la maduración del folículo pre-ovulatorio y la

maduración de los oocitos (Hillier et al, 1994). Permitiendo la obtención de oocitos de calidad superior (Bordignon, 1997).

Actualmente, es de amplia aceptación que la onda pre-ovulatoria de LH provee la señal para la maduración final del oocito lo cual comprende la progresión meiótica hasta MII, la adquisición de la capacidad para la fertilización y la futura competencia embrionaria para el desarrollo (Driancourt, 2001). La alta variabilidad en la respuesta ovárica a la superestimulación hormonal es conocida como uno de los aspectos que mas 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 de cada onda folicular, de manera que vacas con un relativamente alto número de folículos responden mejor a la estimulación (Ireland et al, 2006).

El objetivo de esta investigación fue comparar dos esquemas de superestimulación hormonal, respecto a la respuesta ovárica y la cantidad y calidad por criterios morfológicos de los complejos oocito-cúmulus (COC`'s) bovinos recuperados por aspiración folicular.

■ Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en la Granja Román Gómez Gómez del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, localizada en el municipio de Marinilla (Antioquia). Para el estudio se emplearon cuatro hembras bovinas F1 (Blanco Orejinegro BON x Holstein) en fase de lactancia temprana, entre segundo y cuarto parto, con una condición corporal de 3.5 (escala de 1-5), sin historial de problemas sanitarios al momento del parto. El ciclo estral de las hembras fue sincronizado mediante el uso de un dispositivo intravaginal bovino (DIB®), impregnado con 1g de progesterona, en un protocolo que consistió en la inserción del DIB® y la administración simultanea de 2mg de



benzoato de estradiol (IM). Siete días después el DIB® fue retirado y se aplicaron a cada animal 0.150mg de D(+)-cloprostenol (Prostal®, IM), y al día siguiente se aplicó 1mg (I.M) adicional de benzoato de estradiol. El celo fue detectado entre las 48 a 72 horas posteriores al retiro del DIB®. Cuatro días después de la aparición del celo, en cada animal, los folículos ováricos de la onda folicular emergente fueron contados y medidos, mediante un equipo de ultrasonografía (Piemedical Aquila Pro®), dotado con un transductor endorectal de arreglo lineal de doble frecuencia 6.0/8.5Mhz y se realizó la ablación del folículo dominante con un transductor transvaginal de doble frecuencia 5.0/7.5Mhz con ángulo de 150°, y un sistema de aspiración folicular con aguja 18G conectado a una bomba peristáltica de vacío a 75mmHg de presión. El tratamiento de superestimulación (FSH-hCG) fue iniciado el día seis del ciclo estral, y consistió en seis dosis de FSH (Folltropin® 50mg I.M.) administradas cada 12 horas. Posteriormente las vacas fueron sometidas a un periodo de privación de FSH "coasting period" de 48 horas entre la última inyección de FSH y la aspiración folicular. Una dosis de gonadotropina coriónica humana hCG (Chorulon®, 1500 UI. IV) fue administrada a cada animal superestimulando seis horas antes del procedimiento de aspiración, momento en el cual los folículos ováricos fueron contados y medidos mediante ultrasonografía transvaginal en diferentes momentos del proceso (4 días y 10 días post-celo). El tratamiento control (FSH) para este experimento, consistió en el mismo protocolo de superestimulación, con excepción

de la administración de hCG.

Aspiración folicular

Las vacas donadoras de complejos oocito-cúmulus (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 (Piemedical Aquila Pro®), dotado con un transductor transvaginal de doble frecuencia 5.0/7.5Mhz con ángulo de 150°, y un sistema de punción con una aguja 18G conectado a una bomba peristáltica de vacío a 75mmHg de presión. Los ovarios fueron manipulados vía rectal con el fin de ubicarlos, fijarlos y direccionarlos hacia transductor introducido vía vaginal. Los folículos ováricos visibles fueron puncionados y aspirados a través de la pared vaginal. El liquido folicular fue recolectado en tubos cónicos con medio PBS suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), heparina 20000UI/L, y gentamicina 0,05 mg/ml. Terminado el proceso de aspiración, los COC's fueron recuperados desde el liquido folicular utilizando un filtro convencional para embriones y medio PBS suplementado para su lavado. Los COC's se clasificaron de acuerdo con la apariencia de su ooplasma y la cantidad y calidad de capas de células del cúmulus, según los parámetros establecidos por De wit et al, (2000) en la Tabla 1.

Tabla 1. Categorías de complejos cúmulus-oocito

Tipo	No. Células del cúmulo	Citoplasma
1 Excelente	Capas multiples y compactas de células (> 4)	Homogéneo y transparente
2 Bueno	Capas múltiples de células de cúmulus (1 a 3)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3 Regular	Denudados	Irregular con zonas oscuras
4 Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

De wit et al, (2000)

Análisis estadístico

La comparación entre los grupos en lo relacionado con el tamaño de los folículos en los diferentes momentos de medición, fue realizada mediante una prueba t de Student (Statistica 10).

■ Resultados

Se encontró un rango entre 10 y 15 folículos ováricos por vaca, en las vacas sincronizadas y evaluadas por ultrasonografía transvaginal, el número de folículos posterior a los procesos de superestimulación hormonal aumentó en

un promedio de 4 folículos ováricos totales por animal. El tamaño folicular aumentó considerablemente con la administración hormonal (Tabla 2).

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

Un promedio de siete COC`s por animal fueron recuperados por aspiración folicular. Los resultados correspondientes a la clasificación de los COC`s recolectados, (De wit et al, 2000) se presentan en la tabla 4. La figura 1, muestra oocitos recuperados del tratamiento FSH-hCG

Tabla 2. Comparación del tamaño folicular \pm desviación estándar DS en los animales sin superestimulación (SS) y con superestimulación (CS).

Tipo	4 días post-celo SS	10 días post-celo SS	10 días post-celo CS
Tamaño folicular promedio (mm)	0.38 \pm 0.14	0.38 \pm 0.14	0.95 \pm 0.34*
Maximo (mm)	0.67	0.8	1.71
Minimo (mm)	0.15	0.2	0.4

* Se encontró diferencia estadísticamente significativa para el tamaño folicular 10 días post-celo entre el tratamiento sin superestimulación (control), y el promedio de los tratamientos con superestimulación hormonal (FSH y FSH-hCG)

Tabla 3. Comparación del tamaño folicular \pm desviación estándar DS entre los tratamientos de superestimulación (FSH vs. FSH-hCG).

Tipo	Tratamiento FSH	Tratamiento FSH-hCG
Tamaño folicular promedio (mm)	0.84 \pm 0.39	1.022 \pm 0.30*
Maximo (mm)	1.71	1.66
Minimo (mm)	0.4	0.57

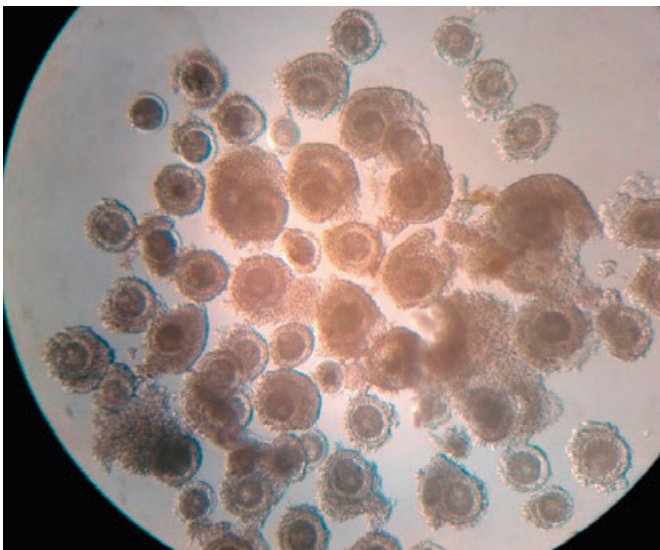
* No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.



Tabla 4. Clasificación de COC`s recuperados por aspiración transvaginal según su calidad, para ambos tratamientos de superestimulación

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

Figura 1. COC`s de vacas superestimuladas con el tratamiento FSH-hCG



■ 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 (Blondin et al, 2002). 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 recuperar los folículos del proceso de 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 (Qui et al, 2013). Lo cual fue corroborado por los resultados de esta investigación, toda vez que se encontró una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) 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) (Barboza et al, 2017), respecto a aquellos animales donde el crecimiento folicular se dio sin superestimulación. No se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) 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 (D'Occhio et al, 1999; Driacourt, 2001).

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 Barboza et al (2017) & Yang et al (2005). 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 (Ireland et al, 2007; Vieira et al, 2014). 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 (Durocher et al 2006; Monteiro et al, 2017). 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 (Monteiro et al, 2017; Qui et al, 2013; Ward et al, 2002). 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.

■ Conclusiones

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.

■ Agradecimientos

Vicerrectoría de Investigación, Corporación Universitaria Lasallista y Dirección de investigaciones del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

■ Referencias

Barboza, JC, Machado, R, Maturana, M, Rezende, J, Santin, T, Pugliesi, G, Hoffmann, E. (2017). Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 90: 65-73

Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F. y Sirard M. (2002). Manipulation of follicular developmental to produce



developmentally competent bovine oocytes. *Biol of Reprod.* 66: 38-43.

Bordigon, V., Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D. y Smith, L. (1997). 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.

Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G. y Durocher, J. (1999). *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach, *Theriogenology*, 51: 59-70.

Durocher, J., Morin, N. y Blondin P. (2006). Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation, *Theriogenology*, 65(1), 102-115.

Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction, *Theriogenology*. 55: 1211-1239.

D'Occhio, M.J., Jillella, D. y Lindsey, B. (1999). 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.

De wit, C; Wurth, Y and Kruij, TH. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Anim. Sci.* 78:1277-1283

Hashimoto, S., Takakura, R., Minami, N. y Yamada, M. (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes, *Theriogenology*, 52: 131-138.

Hendriksen, P., Vos, P., Steenweg, W., Bevers, M. y Dieleman, S. (2000). Bovine Follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes, *Theriogenology*, 53, 11-20.

Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Smith, G., Lonergan, P. y Evans A. (2007). 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.

Looney, C.R., Lindsey, B., Gonseth, C. y Johnson, D. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows, *Theriogenology*, 41, 67-72.

Lonergan, P., Monaghan, D., Rizos, M., Boland, y Gordon I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Rep Dev*, 37, 48-53.

Monteiro, FM, Batista, EO, Vieira, LM, Bayeux, BM, Accorsi, M, Campanholi, SP, Dias, EA, Souza, AH, Baruselli, PS. (2017). Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more *in vitro* embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology* 90: 54-58

Palma, G. A. (2008). *Biología de la Reproducción*. 2 ed. Balcarce. Ediciones INTA.

Qui, M, Yuchang, Y, Hong. M, Jiabo, W, Xiaochuan, Z, Li, L, Xiaodong, T, Lili, Z, Shengli, Z and Fang, S. (2013). Transvaginal Ultrasound-guided *Ovum Pick-up* (OPU) in Cattle. *J Biomim Biomater Tissue Eng*, 18:2, 1-3.

Stubbings, R. y Walton, J. (1995). Effect of Ultrasonically-guided follicle aspiration on



estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows, *Theriogenology*, 43: 705-712.

Vieira, LM, Rodrigues, CA, Castro Netto, A, Guerreiro, BM, Silveira, CR, Moreira, RJ, Sá Filho, M, Bó, GA, Mapletofff, R, Baruselli, PS. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 82: 318–324.

Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M. y Lonergan, P. (2002). 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.

Yang XY, Zhao JG, Li HW, Li H, Liu HF, et al. (2005) Improving *in vitro* development of cloned bovine embryos with hybrid (Holstein–Chinese Yellow) recipient oocytes recovered by ovum pick up. *Theriogenology* 64: 1263–1272.