

## VARIACIÓN INTERRACIAL E INDIVIDUAL EN NOVILLAS DONANTES DE OVOCITOS RECOLECTADOS EMPLEANDO ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL

### VARIATION BETWEEN AND WITHIN BREEDS IN DONORS HEIFERS OF OOCYTES COLLECTED BY TRANSVAGINAL OVUM PICK-UP

*Alex Solís-Corrales<sup>1</sup>\*, Cesar Vigil<sup>1</sup> y Reinaldo De Armas<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia, Centro de Investigaciones en Biotecnología Agropecuaria (CIBA). Chiriquí, Panamá. ([alex.solis@up.ac.pa](mailto:alex.solis@up.ac.pa) <https://orcid.org/0000-0002-1764-2654>, [cesar.vigil@up.ac.pa](mailto:cesar.vigil@up.ac.pa) <https://orcid.org/0000-0002-7793-275X>, [reinaldo.dearmas@up.ac.pa](mailto:reinaldo.dearmas@up.ac.pa) <https://orcid.org/0000-0003-2488-0113>)

\*Correo de Correspondencia: [alex.solis@up.ac.pa](mailto:alex.solis@up.ac.pa)

Recibido: 16/05/2022

Aceptado: 28/08/2022

**RESUMEN.** Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la variación interracial e individual entre donantes de ovocitos recolectados por Aspiración Folicular Transvaginal (AFT). Las variables evaluadas fueron número total de ovocitos recuperados y número de ovocitos viables para Producción *In Vitro* de Embriones (PIVE). Se emplearon ocho novillas de la raza Gyr y ocho novillas de la raza Fleckvieh. Las condiciones ambientales fueron similares dentro de raza y variadas entre raza. Los datos fueron analizados mediante un Diseño de Bloques Aleatorizado. Se empleó el test de Duncan para realizar las comparaciones de medias entre los tratamientos. No se encontró diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ) para en el número de ovocitos totales recolectados entre las hembras Gyr (9.81 EE 1.04) y Fleckvieh (9.00 EE 1.04). Tampoco se encontró diferencias ( $P>0.05$ ) en cuanto al número de ovocitos viables (Gyr: 5.94 EE 0.76 vs Fleckvieh: 6.63 EE 0.76). Se encontró variación individual estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) dentro de las dos razas evaluadas, tanto para total de ovocitos como para el número de ovocitos viables recolectados. El número de ovocitos viables recolectados fue la variable con el mayor porcentaje de variación individual. Se concluye que la superioridad demostrada en múltiples investigaciones por animales *Bos Indicus* como los de raza Gyr sobre animales *Bos Taurus* como los de raza Fleckvieh, en cuanto al número de ovocitos recolectados por AFT, puede ser alterada por las condiciones ambientales. Existe variación individual para el número total de ovocitos recolectados y número de ovocitos viables para PIVE obtenidos por AFT entre individuos con condiciones similares de raza, edad, peso, etapa biológica, condición corporal, estatus reproductivo y ambiente.

**PALABRAS CLAVE:** Fleckvieh, folículos, Gyr, OPU, respuesta individual, Simmental.

**ABSTRACT.** This research was aimed to evaluate the individual variation among oocyte donors, collected by Transvaginal Ovum Pick-Up (OPU). The variables evaluated were the total number of collected oocytes and the amount of viables for *In Vitro* Embryo Production (IVEP). Eight Gyr heifers and eight Fleckvieh heifers were used in the study. Environmental conditions were similar within breed and varied between breed. Data were analyzed using a Randomized Block Design and Duncan's test was employed to compare means between treatments. No statistical differences ( $P>0.05$ ) were found in the number of total collected oocytes between females Gyr (9.81 SE 1.04) and Fleckvieh (9.00 SE 1.04). No differences were found ( $P>0.05$ ) in terms of number of viable oocytes (Gyr: 5.94 SE 0.76 vs Fleckvieh: 6.63 SE 0.76). Significant statistically individual variation ( $P<0.05$ ) was found within the two evaluated breeds, both for total number of oocytes and viable ones. However, the number of viable collected oocytes was the variable with the highest percentage of individual variation. It is concluded that the superiority shown in multiple investigations by *Bos indicus* animals such as those of the Gyr breed over *Bos taurus* animals such as those of the Fleckvieh breed, in terms of the number of oocytes collected by OPU, can be altered by environmental conditions. There is individual variation for the total number of oocytes collected by OPU and viable ones selected for IVEP, obtained from donors with similar conditions of breed, age, weight, biological stage, body condition, reproductive status and environment.

**KEYWORDS:** Fleckvieh, follicles, Gyr, OPU, individual response, Simmental.

## INTRODUCCIÓN

Existen diferentes biotecnologías reproductivas que se encaminan a reproducir a gran escala animales genéticamente superiores. Actualmente se conoce que la Producción *In Vitro* de Embriones Bovinos (PIVE), a partir de ovocitos obtenidos por medio de la técnica de aspiración folicular transvaginal (AFT), ostenta los mejores resultados en este sentido.

Se estima que solo entre un 50 y 70 por ciento de los ovocitos obtenidos mediante AFT son aptos para fertilización *in vitro*; alrededor del 72.2% de estos logran clivar, pero solo un aproximado de 27.8 por ciento alcanzan el estadio de blastocito (Watanabe *et al.*, 2017). Es por esto que obtener el mayor número posible de ovocitos aptos para la fertilización *in vitro*, representa una ventaja para la técnica, pues permite obtener mejores resultados.

El número, así como la calidad de los ovocitos recolectados, la cual se traduce fundamentalmente en la mayor presencia de células del cumulo que rodean al mismo, se ve influenciada según Grajales *et al.*, (2018), por diferentes factores, entre los cuales se mencionan los de carácter biológico y los de carácter técnico. Los aspectos técnicos son controlados por el operador del equipo de AFT. No así, los aspectos biológicos que se encuentran vinculados a la biología del animal, como la raza, edad, fertilidad, categoría, estado fisiológico y condición corporal de la donante.

Un aspecto biológico que ha sido considerado de gran importancia en la reproducción animal es la variación en la respuesta. La raza juega un rol importante en este sentido. Los animales de la raza Nelore, o las vacas en general cebuínas normalmente tienen un mayor número de folículos reclutados, en comparación con las vacas de razas europeas (Seneda *et al.*, 2002, Baruselli *et al.*, 2012). Sin embargo, autores como Seneda *et al.* (2002), señalan que, a pesar del potencial similar entre los individuos de la misma raza, la variabilidad entre las distintas donantes para producir una población viable de folículos puede influir en los resultados de la AFT.

Del mismo modo, los factores ambientales como localidad, alimentación y manejo en general pueden jugar un rol determinante en los resultados de la AFT, en nuestra experiencia hemos encontrado en distintas localidades animales *Bos indicus* con pobres resultados y animales *Bos taurus* ostentando buenos resultados. En la especie bovina se sabe que la cantidad de folículos primordiales se desarrolla durante la vida fetal (Aerts y Bols, 2010) y tiene una fuerte correlación con el estado nutricional de la madre, sobre todo en el primer tercio de la gestación (Evans *et al.*, 2010). Por lo tanto, las vacas que sufrieron alguna restricción alimentaria durante la preñez producen hijas con una población folicular menor, comparado con hijas de vacas que no sufrieron ninguna deficiencia en la alimentación en dicha etapa (Evans *et al.*, 2010).

Estos factores de variación no han sido tomados en cuenta en muchas de las investigaciones sobre AFT-PIVE, lo cual supone un error experimental en los resultados de los estudios realizados. Del mismo modo, una respuesta individual significativa en este estudio sugeriría considerar la misma como criterio de selección de hembras donantes de ovocitos en los sistemas de producción *in vitro* de embriones. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo evaluar la variación interracial

e individual entre novillas donantes de ovocitos recolectados por AFT de las razas Gyr y Fleckvieh sometidas a distintas condiciones ambientales.

## **METODOLOGÍA**

### **Ubicación Geográfica**

Se realizó AFT de novillas Fleckvieh en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agropecuarias (CIBA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, República de Panamá; ubicado en el corregimiento de Chiriquí, Provincia de Chiriquí; localizado a los 8°23'15,12" de latitud norte y 82°19'47.48" de longitud oeste, con una elevación de 26 msnm. Paralelamente, se realizó AFT de novillas Gyr en la Hacienda Agua Fría en el Distrito de Penonomé provincia de Coclé, localizada a los 8° 24` 58`` de latitud norte y 80° 20` 51`` de longitud oeste, con una elevación de 29 msnm.

### **Sujetos Experimentales**

En esta investigación se emplearon un total de 16 novillas, ocho (8) de la raza Fleckvieh y ocho (8) de la raza Gyr, las cuales fueron sometidas a AFT. Dentro de cada raza, las novillas eran homogéneas entre sí para las siguientes variables:

- Raza: Fleckvieh y Gyr
- Etapa biológica: Novillas
- Edad: 18 a 26 meses
- Peso: 330 a 375 kg.
- Condición corporal: 3 a 3.75 en escala de 1 a 5
- Estatus reproductivo: Cíclicas
- Alimentación: Sal mineral ad libitum

Entre razas las mismas eran heterogéneas en las siguientes variables:

- Manejo
- Alimentación
- Condiciones climáticas

### **Aspiración Folicular Transvaginal**

Previo al inicio de la recolecta de ovocitos, la onda folicular de las novillas fue sincronizada empleando el método de ablación de folículos mayores a 10 mm con AFT. Esto permitió el desarrollo armónico de los folículos en todas las novillas utilizadas. Cuatro días después de efectuada la ablación de los folículos se realizó la primera sesión de aspiración a todos los animales y una segunda sesión cuatro días después de la primera.

Para el desarrollo del procedimiento de AFT, las hembras fueron anestesiadas de forma regional con Lidocaína al 2% (3 a 5 mL/vaca, vía epidural), lo cual evitó las contracciones rectales y facilitó la manipulación de los ovarios.

Se empleó un ultrasonido marca SIUI®, el cual consta de un transductor convexo de 6.5 MHz, acoplado a un sistema de guía de agujas marca WTA®. El sistema de guía de agujas fue equipado con agujas de 20G x 2" unidas a líneas para aspiración folicular (mangueras de silicona), y estas a su vez a un tubo cónico de 50 mL (tubo de recolecta), mediante un tapón metálico para aspiración folicular marca WTA®. El tapón metálico se une a una bomba de vacío (Pioneer® pro pump) mediante una manguera de silicona de 8 mm de diámetro.

A cada tubo cónico empleado en el procedimiento le fue adicionado aproximadamente 5 mL de solución salina más heparina a razón de 10000 UI de heparina por cada 100 mL de solución salina. El transductor acoplado al sistema de guía de agujas se introdujo por vía transvaginal en dirección dorso-craneal hasta localizar el cuello del útero.

Los ovarios fueron manipulados con la mano libre del operador por vía transrectal, de forma tal que se colocaron contra el transductor, permitiendo así visualizar los folículos en la pantalla del ultrasonido. Con la aguja se atravesó la pared vaginal hasta llegar a los ovarios, aspirando de esta forma todos los folículos visibles ( $\varnothing \geq 5\text{mm}$ ).

Se aplicó una presión de vacío aproximada de 80 mmHg (previamente calibrada a 26 mL de agua/min), de manera que el licor folicular junto con el medio y los ovocitos llegaron hasta el tubo cónico, que fue llevado hasta el laboratorio para realizar la búsqueda y selección de los ovocitos.

### **Clasificación de los ovocitos recolectados por AFT**

El contenido del tubo cónico de recolecta fue depositado en filtros para embriones EmCon™ con maya de 75  $\mu\text{m}$ . Seguidamente se adicionó solución salina dejando pasar líquido a través del filtro, hasta aclarar el contenido y facilitar la búsqueda de los ovocitos, la cual fue realizada bajo visión estereoscópica en placas Petri de búsqueda ( $\varnothing = 100 \times 100 \text{ mm}$ ).

Los ovocitos recolectados en cada sesión de aspiración fueron contabilizados, evaluados morfológicamente y clasificados, tomando como referencia los criterios propuestos por De Loos *et al.* (1989), donde los ovocitos de grado 1: se consideraron como excelentes, grado 2: buenos, grado 3: regulares y grado 4: malos.

Los ovocitos de grado 1, 2 y 3 son considerados viables para PIVE, en tanto que los ovocitos grado 4 son considerados no viables. Dicha escala de clasificación se describe a continuación en la tabla uno.

**Tabla 1.** Clasificación de los ovocitos recolectados por AFT.

---

<b>Grado 1</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Cúmulos con capas múltiples (entre 3 y 5)</li><li>• Cúmulus compacto</li><li>• La totalidad del cúmulus es clara y transparente</li><li>• Citoplasma homogéneo</li></ul>
<b>Grado 2</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Cúmulus como en el grado uno o algo más oscuro y menos transparente.</li><li>• Citoplasma con granulación más gruesa y más oscura en la periferia que en grado uno.</li></ul>
<b>Grado 3</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Cúmulus menos compacto (menos de 3 capas de células), más oscuro que en uno o dos.</li></ul>
<b>Grado 4</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Sin cúmulus o con cúmulus expandido.</li></ul>

---

Adaptada de De Loos *et. al.*, (1989).

### **Análisis Estadístico**

Las hembras empleadas fueron los tratamientos (16 tratamientos). Cada hembra fue aspirada dos veces (dos replicas por tratamiento) lo que dio un total de 32 observaciones.

Los datos fueron evaluados empleando un Diseño de Bloques Aleatorizado (DBA) tomando como criterio de bloque la raza de las hembras empleadas. Se trabajó con un nivel de significancia de  $\alpha$ : 0.05 y un nivel de confianza de 95%. Se empleó el test de Duncan para realizar las comparaciones de medias entre los tratamientos. Los datos fueron analizados empleando el software estadístico Infostat versión 2020.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En contraposición con múltiples investigaciones que sustentan que las razas cebuinas suelen tener mayor número de folículos reclutados por onda, por tanto, disponibles para AFT en comparación con las razas europeas (Seneda *et al.*, 2002; Blaschi *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2008; Sartori y Barros 2011; Baruselli *et al.*, 2012; Gimenes *et al.*, 2015), en esta investigación no encontramos diferencia estadísticas significativas ( $P>0.05$ ) para en el número de ovocitos colectados, entre las hembras Fleckvieh y Gyr como se aprecia en la tabla dos.

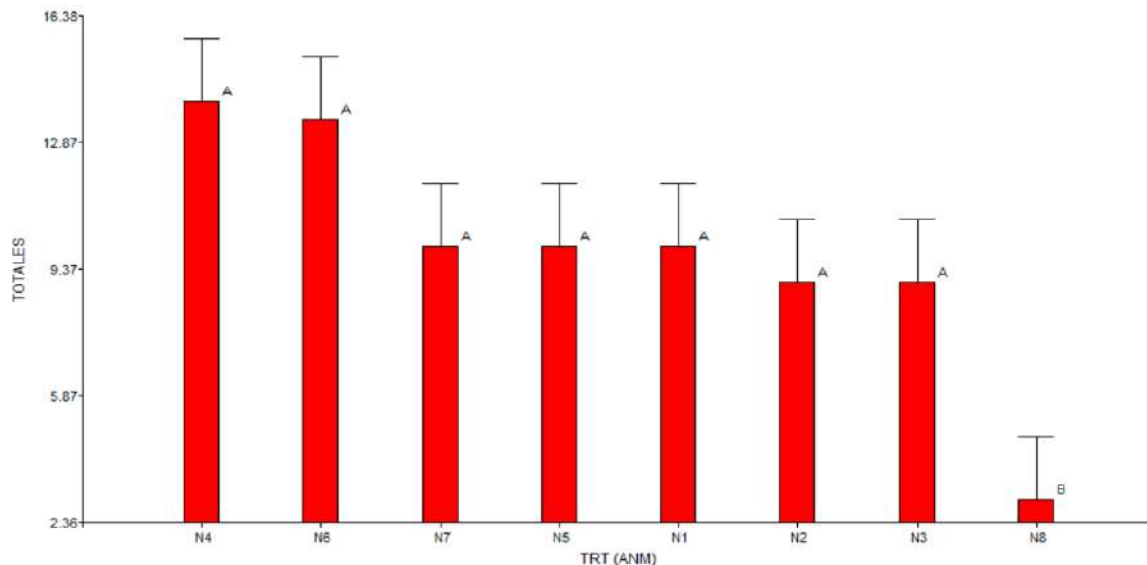
**Tabla 2.** Promedios de ovocitos colectados en las razas evaluadas.

Raza	n	Pomedio de Ovocitos Viables	Promedio Total de Ovocitos
Gyr	16	5.94 <sup>a</sup> EE0.76	9.81 <sup>a</sup> EE1.04
Fleckvieh	16	6.63 <sup>a</sup> EE0.76	9.00 <sup>a</sup> EE1.04

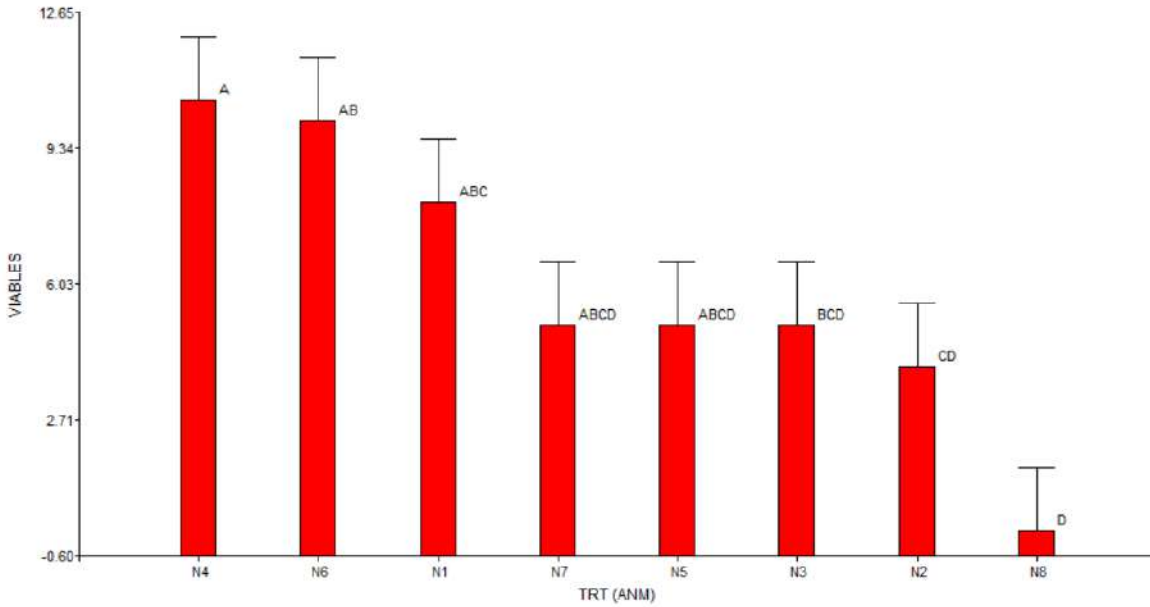
Columnas con letras distintas difieren significativamente

Silva-Santos *et al.* (2011), no encontraron diferencias significativas en el número de folículos pre-antrales (primordiales, primarios o secundarios) en ovarios de fetos de novillas *Bos taurus* o *Bos indicus*, y sugirieron que el número superior de folículos y mayor rendimiento en los programas OPU de los animales cebuínos, puede estar asociado a una tasa de atresia folicular inferior en los mismos. Como hemos señalado, en este ensayo, las razas evaluadas se encontraban en distintas localidades, razón por la cual nuestros resultados sugieren que dicha tasa de atresia folicular, además de estar asociada a factores genéticos diferenciados entre subespecies o entre razas, también está influenciada por factores ambientales como la localidad, alimentación y manejo en general.

Cuando se analizó la variable número de ovocitos totales colectados por AFT en hembras de la raza Gyr, se encontró que un animal manifestó diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al resto, como se aprecia en la figura uno, en cambio, al analizar el número de ovocitos viables colectados por AFT se encontró mayores diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre los animales empleados en el estudio, cómo se aprecia en la figura dos.

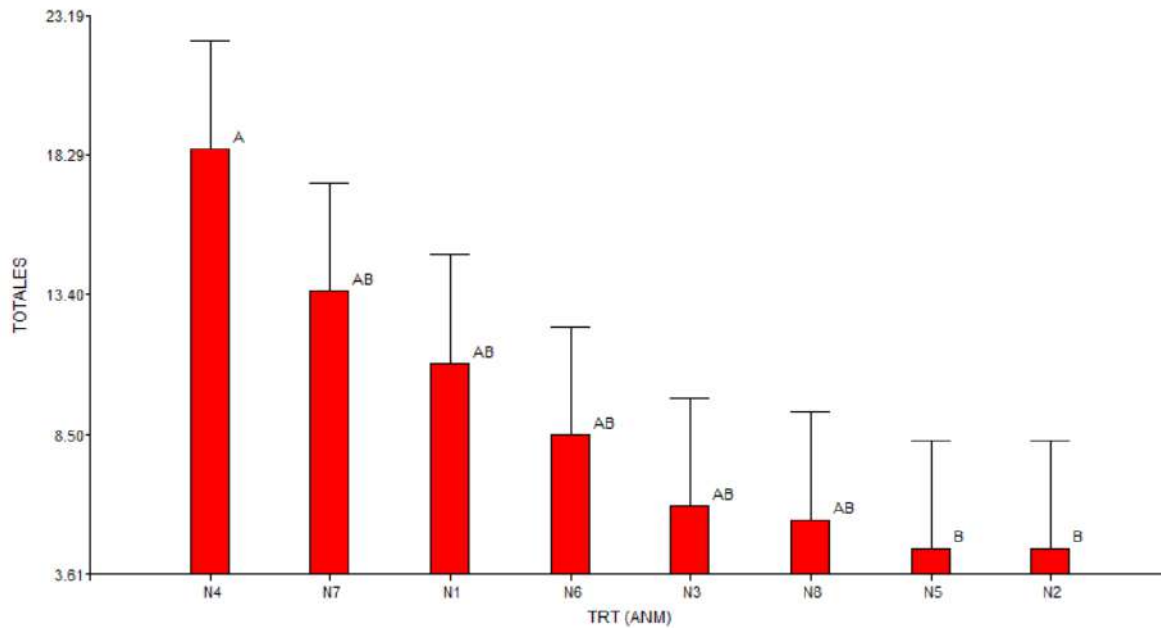


**Figura 1.** Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Gyr.

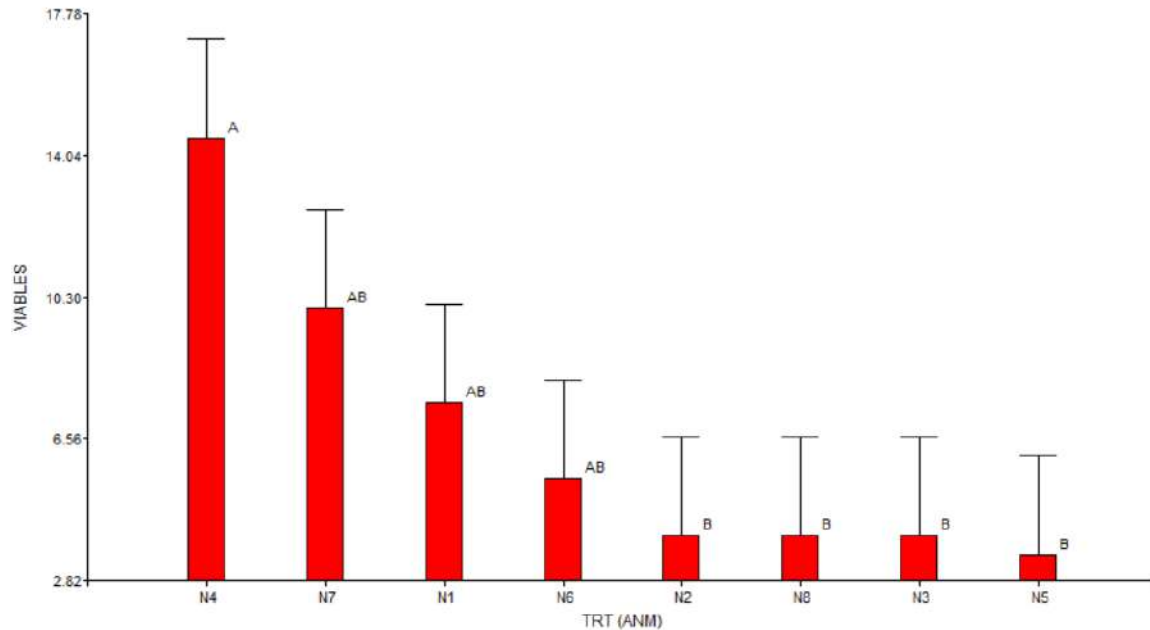


**Figura 2.** Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Gyr.

Al estudiar los resultados ostentados por las novillas Fleckvieh se encontró diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre las hembras evaluadas, tanto para el número total de ovocitos colectados como para el número de ovocitos viables para PIVE, como se aprecia en las figuras tres y cuatro.



**Figura 3.** Promedios de ovocitos totales colectados por AFT en las novillas Fleckvieh.



**Figura 4.** Promedios de ovocitos viables para PIVE colectados por AFT en novillas Fleckvieh.

Los resultados ostentados en las figuras uno, dos, tres y cuatro sugieren que existe variabilidad individual para el número y viabilidad de ovocitos recolectados por AFT dentro de las hembras Gyr y Fleckvieh, incluso cuando son homogéneas en variables como la edad, la etapa biológica, condición corporal, peso, estatus reproductivo y condiciones ambientales. Estos resultados son coincidentes con las apreciaciones de Seneda *et al.*, (2002), quienes indicaron que, a pesar del potencial similar entre los individuos de la misma raza, la variabilidad entre las distintas donantes para producir una población viable de folículos puede influir en los resultados de la AFT.

Dentro de cada grupo racial se encontró mayor variabilidad en la viabilidad que en el número total de ovocitos recolectados. Respaldao una vez más las apreciaciones de Silva-Santos *et al.* (2011), es preciso señalar que este fenómeno puede estar influenciado por la tasa de atresia de los folículos antrales, que como señala Fernández (2003), está mediada por algunos factores que tienen efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotrofinas, entre los que destacan la inhibina, folistatina (Fernández, 2003) y el estradiol (Bó 2002) y por las proteínas ligadoras de calcio (IGFBP) que secuestran los Factores de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF) responsables en gran medida por el desarrollo ovocitario.

## CONCLUSIONES

No se encontró diferencias entre las razas evaluadas por lo cual concluimos que la superioridad demostrada en múltiples investigaciones por animales *Bos Indicus* como los de raza Gyr sobre animales *Bos Taurus* como los de raza Fleckvieh, en cuanto al número de ovocitos recolectados por AFT, puede ser alterada por las condiciones ambientales.



Existe variación individual para el número total de ovocitos colectados y número de ovocitos viables para PIVE obtenidos por AFT entre individuos con condiciones similares de raza, edad, peso, etapa biológica, condición corporal, estatus reproductivo y ambiente.

## AGRADECIMIENTO

A la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (**SENACYT**) de la República de Panamá, por su valioso aporte financiero, administrativo e intelectual para desarrollo de la presente investigación. A los propietarios de la Finca Aguas Frías por permitirnos el empleo de sus valiosos animales de la raza Gyr.

## REFERENCIAS

- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 180-187.
- Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F. D., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., Vieira, L. M; ... & Bó, G. A. (2012). Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 134-141.
- Blaschi, W., Andrade, E. R., Nonato Junior, I., Pontes, J. H. F., Ereno Junior, J. C., Uvo, S., & Seneda, M.M. (2008). Utilização prévia do Pluset na aspiração follicular: impacto na produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32, 186.
- Bó, G. A. (2002). Dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela.
- Carvalho, J. B. P. D., Carvalho, N. A. T. D., Reis, E. L., Nichi, M., Souza, A. H. D., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69(2), 167-175.
- De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., & Kruij, T. A M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24, 197-204.
- Evans, A. C. O., Mossa, T. F., Lonergan, P., Smith, G. W., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., & Ireland, J. J. (2010). Variation in the number of ovarian follicles in cattle: possible causes and consequences. *Reproduction in Domestic Ruminants*, 67(1), 421-9.

- Fernández, A. T. (2003). Dinámica folicular: funcionamiento y regulación (en línea). Departamento de reproducción animal. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Montevideo–Uruguay. Consultado 26 de nov. 2010. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/23-ondas\\_foliculares.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.htm)
- Gimenes, L. U., Ferraz, M. L., Fantinato-Neto, P., Chiaratti, M. R., Mesquita, L. G., Sá Filho, M. F., & Baruselli, P. S. (2015). The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, 83(3), 385-393.
- Grajales, J., De Armas, R., & Solís, A. (2018). Efecto de factores técnicos y biológicos sobre la tasa de recuperación y calidad de ovocitos obtenidos por aspiración folicular en bovinos. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/343050604\\_Effect\\_of\\_some\\_technical\\_and\\_biological\\_factors\\_on\\_the\\_recuperation\\_rate\\_and\\_oocyte\\_quality\\_obtained\\_by\\_follicular\\_aspiration](https://www.researchgate.net/publication/343050604_Effect_of_some_technical_and_biological_factors_on_the_recuperation_rate_and_oocyte_quality_obtained_by_follicular_aspiration)
- Sartori, R., & Barros, C. M. (2011). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3), 244-250.
- Seneda, M. M., Esper, C. R., García, J. M., & Andrade, E. R. (2002). Aspectos técnicos e biológicos da obtenção oócitos bovinos: Revisão de literatura. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 23(1), 101-110.
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo-Sterza, F. A., & Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76, 1051–1057.
- Watanabe, Y. F., de Souza, A. H., Mingoti, R. D., Ferreira, R. M., Batista, E. O. S., Dayan, A., ... & Baruselli, P. S. (2017). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction (AR)*, 14(3), 635-644.