RENDIMIENTO DE VACAS SECAS NO ESTIMULADAS SOMETIDAS A OPU EN LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS PARA LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

S. Ruiz, J. Zaraza[1], A. De Ondiz y D. Rath[1]
Dpto. Fisiología (Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia). España.
[1] Institut für Nutztiergenetik (Friedrich-Loeffler-Institut. FLI Mariensee). Alemania.
E-mail: sruiz@um.es http://www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (*Ovum pick up,* OPU) fue originalmente desarrollada para la reproducción asistida en la especie humana (Lenz & Lauritsen, 1982) y posteriormente usada en ganado vacuno en Holanda al final de la década de los 80 (Pieterse et al., 1988). Es una técnica de gran versatilidad y flexibilidad que puede ser usada en animales en varios estados fisiológicos (ej. animales cíclicos, no cíclicos, al primer tercio de la gestación y en los que no responden a estímulos hormonales), pero también en animales viejos con desórdenes reproductivos de origen no genético (Galli et al., 2001), y en terneras y novillas prepúberes a partir del 6-8 mes de edad (Taneja et al., 2000). La recuperación repetida de ovocitos mediante OPU permite la producción de un mayor número de embriones que los obtenidos mediante protocolos estándares de transferencia embrionaria (TE) (Santl et al., 1988).

En la actualidad, la producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos mediante el empleo de ovocitos procedentes de matadero está bien establecida (De Roover et al., 2005). Sin embargo, la OPU se presenta como una oportunidad para trabajar con ovocitos obtenidos de vacas vivas lo que permite el uso de material genético de origen conocido. Así, la combinación de OPU y PIV es una alternativa a la producción de embriones in vivo tradicional (Faber et al., 2003). El objetivo de este trabajo fue evaluar el rendimiento de vacas secas sin estimulación hormonal sometidas a OPU en la obtención de ovocitos para ser empleados en sistemas de PIV. Se determinó el número de ovocitos obtenidos por sesión de OPU por animal y los porcentajes de ovocitos viables, no viables, degenerados, maduros e inmaduros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 18 vacas no lactantes (secas) con actividad cíclica normal de las razas *Holstein Friesian* y *Schwarzbunterind*, con edad aproximada de 4 años, procedentes de la granja experimental del *Institut für Nutztiergenetik* de Mariensee (Alemania). Los animales se seleccionaron previamente por palpación rectal de genitales y ovarios para evaluar su normalidad reproductiva. Todos los animales presentaban una condición corporal media (BCS) de 6 en escala de 1-10.

Se realizaron 84 sesiones de OPU con intervalos de 3-4 días. Se siguió la metodología descrita por Oropeza et al. (2004). A los animales se les administró, 4-6 ml de procaína (Procasel 2%) vía epidural. Después del vaciamiento del recto y la limpieza de vulva y área perineal, se insertó el transductor en la vagina, protegido por cubierta sanitaria de látex. Los ovarios fueron visualizados con un ecógrafo (Picker, CS 9000) equipado con un transductor de 6.5 MHz y un “handgrip” de 60 cm de longitud, en donde se colocó la guía de punción. Se aspiraron todos los folículos antrales visibles de más de 3 mm de diámetro, usando una aguja descartable (20 G, 0.9 x 70 mm) colocada en el dispositivo intravaginal y conectada a un tubo estéril de 50 ml mediante una conducción de Teflón y a una bomba de aspiración (Cook, IVF Ultra Quiet) ajustándose la presión de vacío a 50 mm Hg (20 ml/min).

Después de la aspiración de cada 3-4 folículos, se lavó exhaustivamente el fluido folicular de la aguja de aspiración y del tubo de recolección con medio PBS, suplementado con suero bovino fetal inactivado (1%), penicilina (50 UI/ml), estreptomicina sulfato (50

μg/ml), piruvato (36 μg/ml), glucosa (1 mg/ml), $CaCl_2 \cdot 2H_20$ (133 μg/ml) y heparina sódica (2.2 UI/ml) para prevenir la coagulación sanguínea. El fluido de cada animal fue inmediatamente filtrado (50 μm ∅) y los restos de sangre fueron eliminados por continuos lavados en PBS fresco. Los complejos cúmulos-oovocito (COCs) se visualizaron bajo estereomicroscopio y se dispusieron en microgotas, en medio TCM-air a 37ºC, para su evaluación morfológica.

Los COCs obtenidos se clasificaron en cinco categorías, según la homogeneidad, morfología del citoplasma y la compactibilidad de las células del cúmulo (Oropeza et al., 2004): Categoría I (ovocitos con al menos tres capas de células de cúmulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado); Categoría II (ovocitos con menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo; Categoría III (ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras); Categoría IV (ovocitos denudados) y Categoría V (ovocitos con cúmulo expandido). Los COCs de las categorías I-III fueron considerados aptos para MIV, los ovocitos de categorías IV y V no se usaron en MIV, siendo considerados ovocitos no viables.

Los COCs fueron lavados 3 veces en TCM199 y dispuestos en medio de maduración consistente en TCM199, con L-glutamina y 25 mM Hepes y complementado con cisteamina (10 μl/ml), eCG (10 UI/ml), hCG (5 UI/ml) (Suigonan, Intervet), piruvato (22 μg/ml), $NaHCO_3$ (350 μg/ml), gentamicina (50 μg/ml) y BSA libre de ácidos grasos (0.1%). Los ovocitos fueron madurados en atmósfera saturada de humedad (5% CO_2 en aire) a 39ºC durante 24 h. Después del periodo de maduración, los ovocitos fueron fijados en etanol:ácido acético (3:1, v/v), teñidos con colorante lacmoid (1%) y examinados bajo microscopía de contraste de fases (400 x, Olympus). Aquellos ovocitos en estadío de vesícula germinal o metafase I fueron considerados inmaduros, la presencia de ovocitos en metafase II con corpúsculo polar determinó que se había alcanzado el grado de madurez necesario para su uso en PIV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de COCs viables obtenidos por sesión de OPU por animal (4.24. Tabla 1) resultó similar a los reportados por Bungartz et al. (1995) para vacas secas (4.4) y por Liang et al. (2008) en búfalas cíclicas (4.6) y superior a los obtenidos por Chaubal et al. (2006) para vacas secas (3.9), Rust et al. (1999) en vacas gestantes (2.0) y Kniep (2001) en vacas en puerperio (3.8), aunque inferiores al referido por Oropeza et al. (2004) en vacas lactantes (5.7). Nuestros resultados también son inferiores a los obtenidos por Chaubal et al. (2006) para vacas estimuladas con FSH (4.9) en iguales condiciones (2 sesiones semanales de OPU/animal) y a los obtenidos por De Roover et al. (2005) con valores que van desde 6.1 a 7.1 ovocitos dependiendo de la dosis de FSH aplicada. En relación al porcentaje de COCs viables obtenidos (categorías I, II y III), nuestros datos (82.98%) son similares a los reportados por estos mismos autores, con un 81% de COCs disponibles para cultivo. Según nuestros resultados, el porcentaje de ovocitos competentes en MIV y que por lo tanto, resultarían aptos para su procesamiento en técnicas de PIV es superior al 80% de los COCs viables. Podemos concluir que la OPU en vacas secas sin estimulación hormonal es competente en combinación con la PIV para su uso en la producción de embriones bovinos.

Tabla 1. Rendimiento de OPU en vacas secas sin estimulación hormonal.

Nº vacas	Nº sesiones OPU	Nº COCs obtenidos (media)	Nº COCs viables (media)	% COCs viables	% COCs en cultivo* (n)	% ovos deg (n)	% ovos maduros** (n)
18	84	429 (5.11)	356 (**4.24**)	**82.98**	88.48* (315)	5.40 (17)	**80.87**** (241)

(*): Referido al total de ovocitos viables.
(**): Referido al total de ovocitos viables descartando ovocitos degenerados (n: 298).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, Niemann H. Theriogenology. 43: 667-675. 1995.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X, Yang X. Theriogenology. 65: 1631-48. 2006.
- De Roover R, Genicota G, Leonarda S, Bols P, Dessy F. Anim Reprod Sci. 86: 13-25. 2005.
- Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CO, Vander Zwaag DF, Ferre LB. Theriogenology. 59: 125-138. 2003.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Theriogenology. 55: 1341-57. 2001.
- Kniep G. Dissertation Thesis. Hannover Tierärztliche Hochschule. 2001.
- Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH. Theriogenology. 69: 822-826. 2008.
- Lenz S, Lauritsen JG. Fert Steril. 38: 673. 1982.
- Oropeza A, Wrenzycki, C, Herrmann D, Hadeler KG, Niemann H. Biol Reprod. 70: 1634-43. 2004.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Taverne MAM. Theriogenology. 30: 751-62. 1988.
- Rust JM, Eikelmann E, Frank KU, Niemann H. Theriogenology. 51: 329. 1999.
- Santl B, Wenigerkind H, Schernthaner W, Modl J, Stojkovic M, Prelle K, Holtz W, Brem G, Wolf E. Theriogenology. 50: 89-100. 1988.
- Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW. Biol Reprod. 62: 206-213. 2000.

Agradecimientos: Ayudas Movilidad MEC. Estancias Centros de Investigación (PR2007-0445 y PR2008-0323).

OPU PERFORMANCE IN DRY AND NON STIMULATED COWS IN OOCYTES RECOVERY FOR *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION

ABSTRACT: *Ovum Pick-up* (OPU) in cattle can be used in animals at various physiological states (cyclic, noncyclic, early pregnancy), and also for older cows with non genetics reproductive disorders, juvenile calves and prepubertal heifers. The repeated recovery of oocytes permits production of more embryos than might be possible by standard ET protocols. The combination of OPU and IVP techniques could be a potential alternative to traditional embryo production. The aim of this work was to determine OPU performance in dry and non stimulated cows to value recovery and competence of oocytes to using in IVP systems. The number of oocytes recovery by OPU session and animal and the percentages of viable, not viable, degenerate, mature and immature oocytes were obtained.

84 OPU sessions were carried out at 3-4 days intervals in 18 normal cyclic, dry and non stimulated cows from *Holstein Friesian* and *Schwarzbunterind* breeds. We followed the methodology described by Oropeza et al. (2004) for OPU technique. Viable oocytes obtained by OPU session and animal (4.2) was similar to bibliography in same conditions. Maturation rate was higher than 80% of viable ovocytes. OPU in dry and non stimulated cows is competent in combination with PIV for production of bovine embryos.

KEYWORDS: *Ovum pick up*, dry cows, oocytes, IVM