



Suplementación con selenio, respuesta superovulatoria y recuperación de embriones en bovinos lecheros tratados con eCG¹

Marcelo Ratto², Alejandro Ceballos-Márquez³, Roberto Matamoros², Fernando Wittwer⁴, Helga Böhmwald⁴, Marcelo Wolter²

²Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. Casilla 15-D. Temuco, Chile.

³Departamento de Producción Animal, Universidad de Caldas, AA 275. Manizales, Colombia.

⁴Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Casilla 567. Valdivia, Chile.

aceballos@groupwise.upei.ca

(Recibido: 5 agosto, 2008; aprobado: 27 octubre, 2008)

RESUMEN: Con el objeto de evaluar el efecto de una suplementación con Se sobre la respuesta superovulatoria y la recuperación de embriones, se seleccionaron 23 vacas Frisón Negro. Se tomaron 5 ml de sangre heparinizada 20 días pre-tratamiento superovulatorio para determinar la actividad sanguínea de GSH-Px. En el grupo control (n=11) se administraron 5 ml i.m. de agua destilada y en el tratado (n=12) se administraron 5 mg de Se/100 kilos de peso. La superovulación se realizó entre el día 9 y 11 del ciclo administrando 2500 UI i.m. de eCG, se inseminó en dos oportunidades 48 horas después de la aplicación de 750 µg i.m. de tiaprost. La respuesta ovárica fue evaluada mediante ultrasonografía y la recuperación de embriones se realizó mediante una técnica no quirúrgica. Los resultados se analizaron mediante una prueba “t” de Student. La suplementación con Se no produjo cambios significativos en la actividad sanguínea de GSH-Px (P>0,05). Se observó un mayor número de folículos en el grupo suplementado (P<0,05) pero no se encontraron diferencias en el número de cuerpos lúteos, ova-embriones y embriones congelables (P>0,05). La tasa de recuperación de ovas fue del 63% y 59% en el grupo control y suplementado, y la tasa de embriones congelables fue del 33% y 61% para los grupos control y suplementado, respectivamente. La suplementación con Se produjo un aumento en el número de folículos pero no en la tasa de ovulación y en la recuperación de embriones en vacas productoras de leche.

Palabras clave: antioxidantes, estrés oxidativo, minerales, superovulación.

Selenium supplementation, superovulatory response and embryo recovery in dairy bovines treated with eCG

ABSTRACT: This study was designed to evaluate the effect of Se supplementation on the superovulatory response and embryo recovery in dairy lactating bovines treated with eCG. Twenty—three Black Friesian lactating cows were selected, from which heparinized blood was taken 20 days prior to the superovulatory treatment in order to determine the blood activity of GSH-Px. The control group (n=11) received 5 ml i.m. of distilled water, and the treated group (n=12) received 5 mg Se/100 kpw i.m. The superovulatory treatment was given between the 9th and 11th day after the estrous cycle, with each cow receiving 2500 UI i.m. of eCG. Prior to insemination, the cows were injected with 750 µg i.m. of tiaprost, and inseminated twice after 48 hours. The ovarian response was evaluated by ultrasonography, and the embryos were recovered by a non-surgical method. The results were analyzed by a “t” test. The use of Se did not produce significant changes on the GSH-Px activity (P>0.05). The number of follicles found in the treated group was higher than in the control group (P<0.05); however, the number of corpus luteum, ova—embryos and freezable embryos was similar in both groups (P>0.05). The recovery rate of ova—embryo was 63% and 59% for the control and treated group, and the rate of freezable embryos was 33% and 61% for the control group and treated group, respectively. Accordingly, the use of Se in lactating dairy bovines increased the number of follicles, but it did not affect the rate of ovulations and embryo recovery.

Key words: Antioxidant, oxidative stress, minerals, superovulation.

¹ Proyectos: DIUCT 96-3-07 y FONDECYT-Chile 195 1062.

Introducción

El desbalance entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros conduce en el organismo a un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Miller et al., 1993). Esta condición ha sido asociada con la presentación de diferentes enfermedades y estados patológicos en el hombre y los animales (Ceballos & Wittwer, 1996), pudiendo causar alteraciones de la fertilidad, entre otras (NRC, 1983).

El selenio (Se) forma parte de la estructura proteica de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9), reconocida como uno de los principales responsables de la defensa contra los prooxidantes en el organismo (Gutteridge & Halliwell, 1994). La deficiencia de Se puede producir una disminución en la capacidad de defensa antioxidante en el organismo, alterando en consecuencia diferentes vías metabólicas, entre ellas la esteroideogénesis (Miller et al., 1993).

El Se no sólo está relacionado con la formación de hormonas esteroides sino también con el adecuado funcionamiento del cuerpo lúteo (Kamada & Ikumo, 1997), factores considerados como determinantes en la adecuada respuesta a tratamientos de superovulación (Monniaux et al., 1983; Mapletoft & Pierson, 1995). Así, las deficiencias nutricionales específicas, como un desbalance de Se, podrían conllevar a la alteración no sólo del perfil hormonal en hembras mantenidas en programas de superovulación, sino también de su respuesta al tratamiento (Mapletoft & Pierson, 1995).

Asimismo, se ha señalado que el balance nutricional de Se en bovinos puede estar influenciando la fertilización de ovocitos (Segerson et al., 1977; NRC, 1983). Más recientemente, ha sido reportado que la adición de antioxidantes a los medios para cultivos *in vitro* mejora la posibilidad de desarrollo normal del embrión y con ello el índice de fecundación (Fujitani et al., 1996).

Dado que en el sur de Chile se han reportado deficiencias de Se en bovinos productores de

leche (Wittwer, 1997; Ceballos et al., 1998), el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con un antioxidante sobre la respuesta superovulatoria y la recuperación de embriones en vacas productoras de leche.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron 23 vacas Frisón Negro en el tercio final de la lactancia, previo examen ginecológico por ultrasonografía, en un predio localizado en la X Región de Los Lagos (39° LS y 72° LO), Chile. Ellas presentaban una producción de leche promedio de 15 kilos/día, un peso promedio de 510 kilos y una condición corporal de 3,5 (escala 1-5). Los animales estaban mantenidos en pastoreo, bajo un sistema de producción de leche correspondiente a un modelo con tendencia estacional, concentrando en primavera y otoño el mayor número de partos. La alimentación estaba basada en la utilización de praderas mejoradas, forrajes conservados en la época invernal y alimentos concentrados como suplementación para las vacas lactantes según la cantidad de leche producida. La suplementación con sales minerales era principalmente para las vacas en lactancia, y en el producto empleado aparece el Se como componente de la mezcla mineral en una concentración de 5 ppm.

Tratamientos

Las vacas se separaron al azar en dos grupos, control (n=11) al que se administraron 5 ml i.m. de agua destilada, y tratado (n=12) al que se administraron 5 mg i.m. de selenio como selenito de sodio por cada 100 kilos de peso según la dosis señalada por Oblitas et al. (1996).

Los tratamientos superovulatorios se iniciaron entre los días 9 y 11 del ciclo estral con la administración de 2500 UI i.m. de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Folligon[®])²; asimismo, se administraron 750 µg i.m. de tiaprost (Iilirén[®])³ 48 horas después. Las inseminaciones se efectuaron

² Intervet. Boxmeer, Holanda.

³ Hoechst. Bielefeld, Alemania.

a las 48 horas de la administración del tiaprost; cada vaca se inseminó dos veces con 12 horas de intervalo.

Ocho días, posterior a la primera inseminación, se realizó una evaluación de la respuesta ovárica mediante evaluación por ultrasonografía, y se efectuó la recuperación de embriones mediante una técnica no quirúrgica. Los embriones se clasificaron según el criterio definido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

Toma de muestras

Se obtuvieron 5 ml de sangre heparinizada, 20 días antes de iniciar el tratamiento superovulatorio y 40 días después, mediante venopunción coccígea empleando el sistema de tubos al vacío. Las muestras se llevaron durante las primeras 24 horas al Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

Análisis

La concentración de hemoglobina se determinó mediante el método de la cianometahemoglobina (Jain, 1986). Posteriormente se preparó 1 ml de un hemolizado de la muestra de sangre que se conservó a -25°C en envases plásticos debidamente identificados hasta su posterior análisis. La actividad sanguínea de GSH-Px se analizó mediante la utilización de un juego de reactivos comercial (Ransel[®])⁴, basado en una técnica cinética NADPH-dependiente según una modificación del método descrito por Paglia &

Valentine (1967). Los resultados se expresan en U/g Hb.

Análisis estadístico

El tipo de distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de normalidad descrita por Pearson & Stephens (1964). Se obtuvieron el promedio y la desviación estándar ($x \pm \text{DE}$) para la actividad sanguínea de GSH-Px; la respuesta a la suplementación con Se, así como los resultados obtenidos en la superovulación y recuperación de embriones, se analizaron mediante una prueba “*t*” de Student fijándose un nivel de significancia de 0,05 (Zar, 1996).

Resultados y Discusión

La suplementación con Se no produjo cambios significativos en la actividad sanguínea de GSH-Px ($P > 0,05$), y se observó una actividad enzimática promedio antes de la suplementación de 118 ± 42 U/g Hb y 106 ± 31 U/g Hb para los grupos control y tratado con Se, respectivamente; la actividad enzimática 40 días post-suplementación fue 99 ± 51 U/g Hb en el grupo control y 99 ± 29 U/g Hb en el grupo que recibió el Se.

Con respecto a la respuesta superovulatoria, se observó un mayor número de folículos en el grupo tratado ($P < 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el número cuerpos lúteos, ova-embriones recuperados y embriones congelables (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta ovárica, recuperación de ova – embriones y embriones congelables ($x \pm \text{DE}$) en vacas control y tratadas con selenio (5 mg/100 kpv).

| Grupo | Folículos | Cuerpos lúteos | Ova – embrión | Embriones congelables |
|----------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|
| Control (n=11) | $0,9 \pm 1,6^a$ | $7,8 \pm 4,5$ | $4,9 \pm 3,3$ | $1,6 \pm 1,9$ |
| Tratado (n=12) | $2,5 \pm 1,9^b$ | $5,6 \pm 3,6$ | $3,3 \pm 3,4$ | $2,0 \pm 2,7$ |

Letras diferentes ($P < 0,05$)

⁴ Laboratorios Randox. Crumlin, Irlanda del Norte.

La tasa de recuperación de ova-embriones con respecto al total de cuerpos lúteos, fue mayor en el grupo control, mientras que en el grupo tratado la tasa de recuperación de embriones congelables fue mayor (Figura 1).

El promedio de la actividad sanguínea de GSH-Px en los dos grupos, era superior a 60 U/g Hb, tanto antes como después de la suplementación, valor que corresponde a la actividad enzimática mínima esperable cuando el balance metabólico

nutricional de Se es adecuado (Ceballos & Wittwer, 1996).

El número de folículos fue mayor en el grupo suplementado, mientras que no se observaron diferencias entre los grupos para los demás parámetros evaluados (Tabla 1). Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, es posible señalar que en el grupo suplementado con Se la tasa de recuperación de embriones congelables fue mayor con respecto al grupo que no recibió la suplementación (Figura 1).

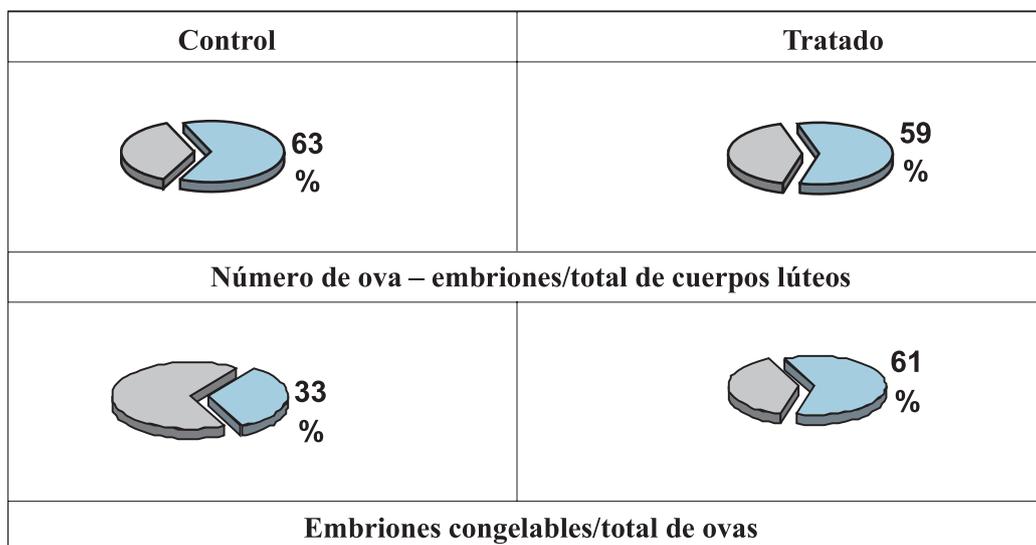


Figura 1. Tasa de recuperación de ovas y embriones congelables respecto al número total de cuerpos lúteos y total de ovas recuperadas en vacas control y tratadas con selenio (5 mg/100 kpv).

Lo anterior concuerda con los resultados reportados por Segerson et al. (1977), quienes obtuvieron un aumento en la tasa de fecundación y calidad de embriones provenientes de vacas superovuladas con eCG y suplementadas con Se/vitamina E. En otro estudio se señala que no se observaron diferencias entre grupos control y suplementado con Se/vitamina E en relación al número de cuerpos lúteos, número de ova-embriones recuperados y tasa de fertilización; no obstante, se observó un mayor número de espermatozoides por ova fertilizado en el grupo suplementado (Segerson & Libby, 1982). Este aumento se debe probablemente a una mayor actividad eléctrica del miometrio, lo que facilita

el transporte de los espermatozoides en el útero para alcanzar el ovocito (Segerson et al., 1980; Segerson & Libby, 1982). Lo anterior podría estar explicando por qué se obtuvo una mayor tasa de fertilización en el grupo suplementado con Se.

El número de cuerpos lúteos y embriones congelables obtenidos en este estudio es similar al valor reportado por Mapletoft et al. (1995), quienes administraron dosis de eCG entre 1500 y 3000 UI en vacas no suplementadas con Se, a diferencia de los valores obtenidos por Monniaux & Chupin (1983), los cuales fueron mayores a los encontrados en este trabajo.

La respuesta a los tratamientos superovulatorios con eCG está caracterizada por poseer una alta variabilidad. Ya han sido descritos varios factores que regulan dicha respuesta, entre otros se cuentan las diferencias en la foliculogénesis entre individuos, el perfil endocrino de la hembra antes y después del tratamiento, los factores inherentes al animal en sí, los aspectos relacionados con la nutrición y el medioambiente y los factores inherentes a la droga utilizada (Mapletoft & Pierson, 1995).

Se ha señalado que las deficiencias nutricionales específicas pueden afectar negativamente la respuesta superovulatoria en bovinos (Mapletoft & Pierson, 1995). En este estudio las vacas presentaban un balance metabólico nutricional de Se adecuado, caso en el que la suplementación con Se no siempre produce una respuesta benéfica (Ceballos & Wittwer, 1996). Además, las vacas estaban mantenidas en pastoreo y en el tercio final de la lactancia, lo que hace que el requerimiento nutricional de Se sea inferior respecto a otros grupos etarios o productivos (Ceballos, 1996). Igualmente, se ha indicado que en bovinos mantenidos bajo sistemas de pastoreo, la respuesta a la suplementación con Se evaluada en función de la fertilidad no siempre es beneficiosa, lo cual confirma que la disfunción reproductiva no es un indicador importante de la deficiencia de Se en bovinos a pastoreo (Wichtel et al., 1996).

Conclusiones

En consideración con lo anterior y bajo estas condiciones, es posible señalar que la suplementación con Se produjo un aumento en el número de folículos, si bien no fueron observadas diferencias en la tasa de ovulación y en la recuperación de embriones congelables en vacas productoras de leche.

Referencias bibliográficas

- Ceballos, A. **Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa como indicador del estado metabólico nutricional de selenio en rebaños lecheros**. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, 1996. Tesis (M.Sc).
- Ceballos, A.; Wittwer, F. Metabolismo del selenio en rumiantes. **Arch. Med. Vet.**, v.28, p.5-18, 1996.
- Ceballos, A.; Wittwer, F.; Contreras, P.A. et al. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. **Arch. Med. Vet.** v.30, (en prensa), 1998.
- Fujitani, Y.; Kasai, K.; Ohtani, S. et al. Effects of oxygen tension, free radicals, and hypotaurine on development of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.45, p.210, 1996.
- Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B. **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- Jain, N.C. **Schalm's Veterinary hematology**. 4th.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.
- Kamada, H.; Ikumo, H. Effect of selenium on cultured bovine luteal cells. **Anim. Repr. Sci.**, v.46, p.203-211, 1997.
- Mapletoft, R.J.; Pierson, R.A. **Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations**. En: Delcampo, C.H., Patiño, M.; Del Campo, M. Relaciones embrio-maternas y biotecnologías reproductivas. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1995. p.36-58.
- Mapletoft, R.J.; Bo, G.; Alkewade, S.J. **The effect of biological activity of gonadotrophins on superovulation in the cow**. En: Del Campo, C.H.; Patiño, M.; Del Campo, M. Relaciones embrio-maternas y biotecnologías reproductivas. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1995. p.16-35.
- Miller, J.K.; Brzezinska-Slebozinska, E.; Madsen, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.2812-2823, 1993.
- Monniaux, D.; Chupin, D.; Saumande, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.55-81, 1983.
- National Research Council. Selenium in nutrition. **Rev. Ed., National Academy Press**. Washington, D.C. 1983.
- Oblitas, F.; Wittwer, F.; Contreras P.A. et al. **Efecto de la suplementación con selenio en la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y**

- ganancia de peso de vaquillas.** En: XXI Reunión anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Coyhaique. p.143-144, 1996.
- Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. and Clin. Med.**, v.70, p.158-169, 1967.
- Pearson, E.S.; Stephens M.A. The ratio of range to standard deviation in the same normal sample. **Biometrika**, v.51, p.484-487, 1964.
- Segerson, E.C.; Murray, F.A.; Moxon, A.L. et al. Selenium/vitamin E: role in fertilization of bovine ova. **J. Dairy Sci.**, v.60, p.1001-1005, 1977.
- Segerson, E.C.; Riviere, R.; Bullock, T.R. et al. Uterine contractions and electrical activity in ewes treated with selenium and vitamin E. **Biol. Repr.**, v.23, p.1020-1028, 1980.
- Segerson, E.C.; Libby, D.W. Ova fertilization and sperm number per fertilized ovum for selenium and vitamin E-treated Charolais cattle. **Theriogenology.**, v.17, p.333-341, 1982.
- Wichtel, J.J.; Craigie, A.L.; Thompson, K.G. et al. Effect of selenium and A-tocopherol supplementation on postpartum reproductive function of dairy heifers at pasture. **Theriogenology**, v.46, p.491-502, 1996.
- Wittwer, F. **Antecedentes del balance nutricional de selenio en Chile y su suplementación en el ganado.** En: Wittwer, F.; Ceballos, A. Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1997. p.27-35.
- Zar, J.H. **Biostatistical analysis.** 3.ed. Upper Saddle River, USA: Prentice Hall, 1996.