

Evaluación de la capacidad de desarrollo de embriones producidos *In vitro* a partir de ovocitos provenientes de Subespecie *Bos indicus* y *Bos Taurus*

Giovana Yalili Bustamante Saldaña¹ Erika Paola Alayo Aguirre¹ Maricelia Alvarado Bazan¹ Ivan Roberto Mesia Lizaraso²

¹ Laboratorio Biotecnológico Sembryo – Lactea S.A.

² Gerente General Lactea S.A.

Resumen

El presente trabajo se realizó a partir de los registros de datos de embriones producidos *in vitro* en el laboratorio SEMBRYO – LACTEA S.A ubicado en el km 531 de la carretera panamericana en la provincia de Virú, departamento de La Libertad - Perú, estos estudios se realizaron con datos pertenecientes al periodo comprendido entre marzo del 2018 y agosto del 2018, en los cuales se colectaron ovocitos de las subespecies *Bos Taurus* y *Bos indicus* en los mismos periodos y épocas para así obtener datos más uniformes y así estudiar si existe una diferencia en la producción de embriones a partir de ovocitos provenientes de la subespecie *Bos Taurus* comparado con embriones producidos a partir de ovocitos de subespecie *Bos indicus*.

Dependiendo de la raza, se buscó determinar si existe una influencia de la donante. Para dicho análisis las donadoras estuvieron en las mismas condiciones de manejo, tanto sanitarias como nutricionales. Para la comparación entre el porcentaje de ovocitos viables y el porcentaje de embriones producidos por ambas subespecies se realizó la prueba F de Fisher para determinar la varianza, determinada la varianza se trabajo la prueba T de student con varianzas desiguales con un intervalo de confianza del 95% utilizando un nivel de significancia del 5% y un valor de ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de embriones (28.6% vs 38.6%) para *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente. Se concluye, que las donadoras de la subespecie *Bos indicus*

producen un mayor número de embriones que la subespecie *Bos Taurus*.

Introducción

El ciclo reproductivo natural en el bovino conduce al nacimiento de una cría por año en el mejor de los casos. Para mejorar la eficiencia reproductiva de animales de alto mérito genético se utilizan técnicas de reproducción asistida¹. Este procedimiento permite multiplicar la descendencia de animales de alta calidad genética, acortando simultáneamente el intervalo generacional y facilitando diferentes actividades de mejoramiento genético, como la evaluación de la progenie y la comparación entre grupos de animales².

La biotecnología ha experimentado un gran auge en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos, o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones.

Un objetivo valioso del desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, como base para otras biotecnologías, que aseguren una alta tasa de preñez cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables³.

La fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos

bovinos es una técnica beneficiosa que permite obtener embriones, lo que representa grandes ventajas en reproducción animal garantizando un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo, clonación mediante transferencia nuclear y producción de animales transgénicos⁴, biotecnologías que permiten el mejoramiento genético necesario para vencer las limitaciones impuestas por las condiciones ambientales⁵. Además, las técnicas de FIV son la única opción disponible para producir crías de hembras valiosas, que por causas no genéticas son estériles y por lo tanto son eliminadas de los sistemas productivos⁶. Esta técnica tiene muchas posibilidades. Puede ser usada en vacas cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y en las que no responden a estímulos hormonales; también, en animales con desórdenes reproductivos de origen no genético⁷, y en terneras y novillas prepúberes a partir del 6^o-8^o mes de edad⁸.

Cada vez es más evidente la importancia del componente racial sobre los eventos fisiológicos del embrión y los gametos que le dan origen y dada la importancia de la ganadería en el país, es importante caracterizar la influencia de dicho componente sobre la capacidad de desarrollo embrionario en bovinos. La realización de estudios donde se compare la capacidad de desarrollo embrionario entre las subespecies *B. Taurus* y *B. indicus*, permitirá contribuir a fortalecer los conocimientos relacionados con las diferencias biológicas existentes entre estas dos especies⁹.

Los animales con mayor herencia cebuina (*B. indicus*), además de ser menos exigentes en alimentación debido a su menor producción lechera, poseen características anatómicas y funcionales que los hacen más aptos para resistir las condiciones ambientales adversas.

El ganado *B. taurus* es muy sensible a las condiciones climáticas, experimentando grados variables de infertilidad. Los animales con mayor herencia cebuina (*B. indicus*), además de ser menos exigentes en alimentación debido a su menor producción lechera, poseen características anatómicas y funcionales que los hacen más aptos para resistir las condiciones ambientales adversas, mayor resistencia a enfermedades por lo cual mantienen tasas de fertilidad más elevadas a lo largo del año¹⁰. La subespecie *B. indicus* (ganado cebú) es predominante en las regiones tropicales, debido a su mejor tolerancia al estrés térmico y la resistencia a los parásitos que las razas europeas (*B. taurus*), las cuales son predominantes en climas templados¹¹.

En comparación con las razas europeas, el ganado cebú experimenta una menor reducción en el consumo de alimento, en la tasa de crecimiento, la producción de leche y la función reproductiva, en respuesta al estrés térmico¹⁰.

En los últimos años se han desarrollado diversos programas de producción *in vitro* de embriones bovinos y son numerosos los profesionales que están dedicados a esta biotecnología. Estos programas dependen en gran medida las razas que se trabajen tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*, sin embargo dependiendo de las condiciones ambientales varían. Por consiguiente es importante registrar los detalles de trabajos locales, que sirvan como soporte técnico para el personal que se desempeña en esta actividad¹².

Se espera que el conocimiento generado de la selección de una de las subespecies predominantes, *B. taurus* o *B. indicus*, sea utilizado como fuente de gametos femeninos, que muestren la mayor capacidad de producción embrionaria *in vitro*, para la FIV. Esto tenderá a mejorar la eficiencia de la PIV de embriones bovinos.

El presente estudio expone el resultado del trabajo realizado en el laboratorio biotecnológico SEMBRYO en LACTEA S.A, ubicado en el departamento de La Libertad – Perú, en el cual se realizó una evaluación de la capacidad de desarrollo embrionario producidos *in vitro* a partir de ovocitos provenientes de subespecies de vacas *Bos taurus*, vs *Bos indicus*, ambas especies de hembras fueron manejadas bajo las mismas condiciones medio ambientales y usando el mismo protocolo para la

producción de los embriones *in vitro*.

El objetivo de este estudio fue presentar datos de producción de embriones *in vitro* a gran escala, basado en el trabajo de campo y el laboratorio SEMBRYO, con el fin de analizar la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* y por medio de los promedios de producción comparar los resultados entre embriones producidos a partir de subespecies de vacas *Bos taurus* y *Bos indicus* sobre la producción de blastocistos.

Materiales y métodos.

Búsqueda y selección de ovocitos

En el laboratorio el día de la colecta se procedió a preparar el medio de aspiración y medio de enjuague a base de PBS + Antibiotico + heparina + BSA, los cuales se enviaron a las instalaciones donde se realizó la colecta del ovocitos, colectando de esta manera en tubos con los datos necesarios, identificando de esta manera el código de vaca, para poder de esta manera diferenciar las vacas entre subespecies *Bos Taurus* y *Bos indicus*, una vez realizada la colecta, los tubos fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 38°C.

Una vez en el laboratorio el contenido de los tubos fue pasado por medio de un filtro y lavado con medio de enjuague para posteriormente depositarlos en placas de 100mm y realizar la observación bajo estereoscopio para su respectiva búsqueda, selección y clasificación.

Maduración de ovocitos

Para la maduración se utilizó medio

B-199 suplementado con hormonas como LH, FSH, estradiol, FCS (Suero fetal bovino), factor de crecimiento epidermal. Los complejos cumulus- ovocito fueron cultivados en grupos de 10, en microgotas de medio y mantenidos en un incubador de CO₂ durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire saturado de humedad.

Capacitación espermática

Para llevar a cabo la FIV se utilizó semen congelado de un toro Brahman puro (*B. indicus*) para las vacas de raza pura *Bos indicus* y un toro *B. taurus* puro para las vacas de raza pura Holstein previamente probada la fertilidad de dichos toros. La capacitación espermática se realizó con la técnica de gradiente de PERCOLL, el semen a trabajar se depositó sobre un tubo cónico de 15 mL que contenía 1 mL de Percoll 45 y 1mL de percoll de 90, se llevó a la centrifuga a 3000 rpm por 30 minutos. Se retiró cuidadosamente el pellet y se homogenizó con 1 ml de Talp 1x, se centrifugó por segunda vez a 1500 rpm por 20 min. Se retiró el sobrenadante y este se homogenizó con medio Talp IVF. Se calculó la concentración y motilidad ajustando la concentración a 1.5 millones de espermatozoides/mL.

Fecundación *in vitro*

Una vez transcurrido el tiempo de maduración, los COC (Complejo Ovocito Células) previamente se desnudaron parcialmente y se trasladaron en grupos de 10 ovocitos a microgotas conteniendo Talp IVF, posteriormente se procedió a fertilizar con la mezcla de la suspensión de semen a cada gota conteniendo los ovocitos. Luego



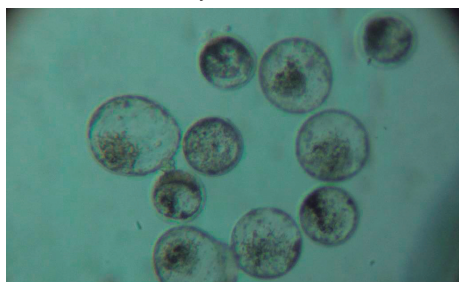
Estudios recientes, han señalado que, el estrés calórico ejerce un efecto nocivo retrasado sobre el desarrollo folicular, los niveles de progesterona y sobre la competencia ovocitaria en vacas del género *Bos indicus*.

se colocaron en la incubadora durante 18 a 24 horas a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad, bajo 5% CO₂ [23].

Cultivo embrionario

Aproximadamente 18 horas post inseminación, se denudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron medio de lavado antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo temprano cubiertas. Las placas de cultivo fueron incubadas a 38,5°C en incubadora de mezcla de gases (5% CO₂, 88% de Nitrógeno, 7% de Oxígeno a >85% de humedad). Al día 4 post cultivo se realizó el cultivo tardío, realizando la renovación de medio de cultivo CIV y la evaluación de división embrionaria, así mismo se retiró el restante de las células del cúmulus. Posteriormente para el día 7 se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido, como se muestra en la Figura 01.

Figura 01: Blastocistos obtenidos al día 7 en el laboratorio Sembryo – Lactea S.A



Resultado y Discusión

Se colectaron, un total de 2366 ovocitos en el periodo comprendido entre marzo del 2018 y agosto del 2018, de los cuales 1424 ovocitos pertenecieron a la subespecie *Bos taurus*, y 1,442 ovocitos de la subespecie *Bos indicus*, los resultados se resumen en la Tabla N° 01.

Tabla N° 01. Número total de ovocitos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*

SUBESPECIE	N° Ovocitos Colectados
<i>Bos Taurus</i>	1424 ^a
<i>Bos indicus</i>	1442 ^a

Letras iguales significa que no existe diferencia estadística significativa (p>0.05).

Tabla N° 02: Porcentaje total de ovocitos fertilizados y porcentaje de Blastocistos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*

SUBESPECIE	Ovocitos encontrados (n)	Ovocitos madurados (n)	Ovocitos fertilizados (n)	Ovocitos fertilizados (%)	Blastocistos producidos (n)	Blastocistos producidos (%)
<i>Bos Taurus</i>	1424	1310	1248	87.6404494a	357	28.605692a
<i>Bos indicus</i>	1442	1282	1130	78.3633842a	414	36.6371681b

Letras diferentes en las casillas, corresponden a que existe diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).
Letras iguales en las casillas corresponden, que no hay diferencias esta estadísticamente significativas (p>0.05).

Del total de ovocitos colectados fueron a maduración 1,310 para la subespecie *Bos Taurus* y 1,282 para la subespecie *Bos indicus* respectivamente, de estos últimos pasadas 24 horas solo fueron fertilizados 1,248 para la subespecie *Bos Taurus* y 1,130 para *Bos indicus* respectivamente. Los análisis se resumen en la Tabla N° 02, de los datos obtenidos, se realizó el análisis estadístico del número de ovocitos colectados, observándose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las colectas de las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus* (Tabla 1). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa (p< 0.05) entre la producción de blastocistos (28.6% vs 36.6%) entre las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente (Tabla 2).

Estos resultados obtenidos concuerdan con los resultados los reportados en el 2010, por Báez et al (2010), en los cuales se reportaron que el ganado con predominancia fenotípica *Bos indicus* presentó mejores tasas de desarrollo embrionario debido a que sus ovocitos son más competentes al tener genes termo tolerantes, con capacidad para resistir las condiciones ambientales del trópico, y que pueden llegar a desarrollarse estos ovocitos luego de la fecundación en mayor porcentaje de embriones que los del ganado *Bos Taurus*⁹.

Resultados contrarios se obtuvieron en estudios reportados por Bryant (2007), donde reportó mejores tasas de desarrollo embrionario en *Bos taurus* que en *Bos indicus*, quien reportó que se obtienen mejores tasas de desarrollo embrionario en *Bos taurus* que en *Bos indicus*, este autor expone que los ovocitos de la raza Brahman (*Bos indicus*) presentan una mayor concentración de lípidos comparado con las razas Europeas (*Bos taurus*) lo que resulta en una menor respuesta a la fertilización *in vitro*, por consiguiente menores tasas de preñez¹³. Este mismo autor reportó resultados de la evaluación de los niveles

séricos de colesterol y triglicéridos en las hembras donadoras bajo las mismas condiciones dietarias, encontrándose un nivel circulante más elevado de colesterol y de triglicéridos en la raza Brahman (*Bos indicus*) comparada con las razas inglesas (*Bos taurus*)¹⁴.

Esta mayor circulación de colesterol y triglicéridos afectan directamente la influencia de la cantidad de lípidos encontrados en los ovocitos de ambas subespecies¹³; esto podría respaldar la menor tasa de producción de embriones *in vitro*, del ganado *Bos indicus* frente a las razas *Bos Taurus*.

Nuestros resultados también tienen relación con investigaciones previas Chávez et al, 2010 el cual encontró que, en vacas Holstein (*Bos taurus*), el estrés calórico parece reducir la competencia ovocitaria y las tasas de fecundación, reduciendo el desarrollo del embrión y contribuyendo a una mala fertilidad durante los meses de verano; a diferencia de ganado cebú (*Bos indicus*) que está bien adaptado a los ambientes tropicales, demostrando una máxima tolerancia al calor, mostrando mejor rendimiento reproductivo que *Bos taurus* en regiones tropicales y subtropicales, concluyendo que en ambientes tropicales el ganado *Bos indicus* presenta mejores índices de reproducción que el ganado *Bos taurus*¹⁵.

Estudios recientes, han señalado que, el estrés calórico ejerce un efecto nocivo retrasado sobre el desarrollo folicular, los niveles de progesterona y sobre la competencia ovocitaria en vacas del género *Bos indicus*, a diferencia del *Bos taurus*, donde el estrés calórico causa un inmediato deterioro sobre el desarrollo folicular¹⁶.

No se conoce concretamente el mecanismo por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito que se produce un daño en la

Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran que si existe una influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones obtenidos en la fertilización *in vitro*.

comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulus y el ovocito. Se afecta la competencia del ovocito para ser fecundado¹⁷, la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, y se producen cambios en la esteroidogénesis¹⁸.

Por tanto, algunos folículos pudiesen ser afectados aún antes de su reclutamiento lo que se traduce en la prolongación de los efectos del estrés térmico aún en los meses con condiciones más confortables¹⁹.

Visintin et al, señalo que existen diferencias ultraestructurales importantes, si se comparan embriones de Nelore (*Bos taurus indicus*) y Holstein Freisian (*Bos taurus taurus*)²⁰; y que por estas diferencias existe la posibilidad de una mejor respuesta en la obtención de embriones *in vitro*. Sin embargo existen otros estudios en los cuales no se encontraron diferencia de embriones producidos *in vitro*, sugiriendo que el porcentaje de fertilización *in vitro* no es afectado por la raza o el estado fisiológico²¹.

Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran que si existe una influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones obtenidos en la fertilización *in vitro*, existen otros factores asociados importantes que se deben tener en cuenta tales como: etapa de producción de la donadora (están en producción láctea o están secas), la temperatura del medio ambiente o estación del año²².

Conclusiones

- La producción de blastocisto fue mejor en la subespecie *Bos indicus* comparado con los blastocistos producidos por *Bos Taurus*.
- No hubo diferencia significativa entre los ovocitos recuperados de las subespecies *Bos indicus* y *Bos Taurus*.

Referencias bibliográficas

1. Plourde D, Vigneault C, Laflamme I, Blondin P, Robert C. 2012. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 77: 1767-1778. doi: 10.1016/j.theriogenology. 2011.12.021
2. Satori R, Sartor-Bergfelt R, Guenther JN, Parrish JJ, Wilthbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*; 85 (11): 2803-2812.
3. Hansen, P.J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle an overview. *Theriogenology*, 65:119-125.
4. GADEA, J.; RUIZ, P.S.; COY, A.; POTO, A.; PEINADO, B.; ROMAR, R.; CAMPOS, I.; ZUBILLAGA, O. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. *Arch. Zoot.* 47: 299-304. 1998.
5. GUTIÉRREZ, C.; CIFUENTES, E.; PÉREZ, R.; ROMERO, L.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, M. Transferencia de embriones fecundados *in vitro* en ganado bovino de doble propósito. *Med. Vet. Zoot. Córdoba.* 6: 52-57. 2001.
6. RATTO, M.; BERLAND, M.; WOLTER, M.; MATAMOROS, R. Bovine embryo development produced by *in vitro* fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. *Arch. Med. Vet.* 31 (1). 1999.
7. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55: 1341-1357. 2001.
8. Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod.* 62: 206-213. 2000.
9. Baez F, Chávez A, Hernandez H, Villamediana P. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista científica. Venezuela.* 20: 3. 2010.
10. BARROS, C.; PEGORER, M.; MORAES, J.; EBERHARDT, B.; MONTEIRO, F. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenol.* 65: 210-218. 2006.
11. DUBUC-MARCHIANI, W. Animales Tropicales. Zebuinos y Azebuados. Espesantes S.R.L (Ed). Caracas-Venezuela. 3era Ed. 21-25 pp. 1984.
12. Van Wagtenonk de Leeuw AM. 2006. Ovum Pick-Up and in-vitro Production in the bovine alter several generations: a 2005 status. *Theriogenology*; 65 (5): 914-925.
13. Bryant BC. 2007. Intracellular lipids in *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes. A postgrade thesis. B.S., Texas A&M University. College Station. 158 pages.
14. Camargo, L.; Viana, J.; Ramos, A.; Serapiao, R.; De Sa, W.; Ferreira, A.; Guimaraes, M.; Vale-Filho, V. (2007). Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenol.* 68: 626-632. 2007.
15. Chávez, A.; Baez, F.; Hernandez, H.; Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancias fenotípicas de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev. Cientif. de Vet.* 20(3): 259-267. 2010.
16. Sun, Q.Y. (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc. Res. Tech.* 61:342-348. 2003.
17. Al-Katanani, Y.; Paula-Lopes, F.; Hansen, P. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85: 390-396. 2002.
18. Roth, Z.; Meidan, R.; Shaham-Albalancy, A.; Braw-Tal, R.; Wolfenson, D. (2001). Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reprod.* 121: 745-751. 2001.
19. Lozano, R. R.; Vásquez, C. G.; González-Padilla, E. (2005). Effect of heat stress and its interaction with other management and productive variables on pregnancy rate in dairy cows in aguascalientes, Mexico. *Vet. Méx.* 36 (3): 245-260. 2005.
20. Visintin JA, Martinus JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicacio AC, Assumpcao ME. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different. *Theriogenology*; 57 (1): 345-359.
21. Leroy JLMR, Opsomer G, De Vliegher S, Vanholder T, Goossens L, et al. 2005. Comparison of embryo quality in high-yield dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*; 64 (9): 2022-2036.
22. Tobón J, 2004. Repoblamiento ganadero. EDITORIAL MARIN VIECO LTDA.