



PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES EN NOVILLAS FELCKVIEH BAJO
CONDICIONES TROPICALES

Alex Solís-Corrales^{1*}, Reinaldo de Armas¹, Juan Morales², Marcos Ferrante³, Ramón Denis García⁴

¹Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia. Centro de Investigaciones en Biotecnologías Agropecuarias (CIBA). Chiriquí, Panamá

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Centro de Biotecnología de la Reproducción (CBR). Torreón Coahuila, México.

³Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. Minas Gerais, Brasil.

⁴Ministerio de la Agricultura, Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT). La Habana, Cuba.



* alex.solis@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0002-1764-2654> , reinaldo.dearmas@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0003-2488-0113>, moralesnarro@hotmail.com <https://orcid.org/0000-0002-9118-7290>, marcos.ferrante@ufla.br <https://orcid.org/0000-0001-6979-2956>, denis@cima-minag.cu <https://orcid.org/0000-0002-1764-2654>

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo comparar dos frecuencias de aspiración folicular in vivo (OPU) en novillas Fleckvieh bajo condiciones tropicales, tomando como variables de respuesta las tasas de maduración, clivaje y producción de blastocistos in vitro. Para ello se emplearon 16 novillas, ocho fueron aspiradas a intervalos de una vez a la semana (T1); y ocho a intervalos de dos veces a la semana (T2); dos sesiones de aspiración por animal, 16 sesiones por tratamiento. Se realizó un análisis de comparación de proporciones (Chi cuadrado) para analizar las variables y se utilizó la *t* de student para $P < 0.05$, considerando como efecto, la frecuencia de aspiración. Los resultados indicaron que el T2 ostentó una tasa de producción de blastocistos (58,82%), significativamente mayor ($P < 0,05$) que el T1 (41,17%). Se concluye que la frecuencia de aspiración dos veces a la semana aplicada en novillas Fleckvieh bajo condiciones de clima tropical, permite obtener mayores tasas de producción de blastocistos y por tanto, mejores resultados en un programa continuo de Producción In vitro de Embriones (PIVE).

PALABRAS CLAVES: OPU, transvaginal, in vivo, ecografía, ovocito, cúmulus, fertilización in vitro, maduración in vitro, clivaje, blastocisto.

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN FLECKVIEH HEIFERS UNDER TROPICAL CLIMATE

ABSTRACT

Objective: Comparison of two frequencies of follicular aspiration in vivo (OPU) in Fleckvieh heifers under tropical conditions, taking as variable responses rates of maturation, cleavage and production of blastocysts in vitro. **Material and Methods:** Sixteen heifers were used, eight aspirated at once a week intervals (T1); and eight at twice-weekly intervals (T2); two sessions of aspiration per animal, 16 sessions per treatment. An analysis of proportions comparison (Chi square) was carried out in order to analyze the variables and the student's t test was used at significance level $P < 0.05$, considering as main effect the frequency of aspiration. Results: T2 showed a blastocyst production rate (58.82%), significantly higher ($P < 0.05$), than T1 (41.17%). Conclusions: The frequency of aspiration twice a week applied in Fleckvieh heifers under conditions of tropical climate, allows to obtain higher rates of blastocysts production and therefore, better results in a continuous program of In Vitro Embryo Production (PIVE).

KEYWORDS: OPU, transvaginal, in vivo, ultrasound, oocyte, cumulus, in vitro fertilization, in vitro maturation, cleavage, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

La técnica de Producción *In vitro* de Embriones (PIVE) representa un importante avance tecnológico en la reproducción de las especies domésticas y también una interesante alternativa comercial a tener en cuenta al momento de considerar la reproducción intensiva de hembras de alto valor genético, por ello, su empleo ha incrementado de manera vertiginosa en los últimos años, particularmente en la especie bovina.

Según el informe anual de la International Embryo Technology Society (IETS), durante el año 2018 se reportaron a nivel mundial un total de 740.002 transferencias de embriones producidos *in vitro* (Viana, 2019), en contraste con los resultados del año 2000, en donde se reportaron 41.691 transferencias (Perry, 2013). Esto representa una cantidad 17,75 veces superior de embriones transferidos, demostrando una creciente demanda de esta biotecnología.

Es importante señalar que este incremento en la PIVE ha sido impulsado principalmente por el subcontinente suramericano (Perry 2018), empleando mayormente animales *Bos indicus*; debido a sus mejores resultados en cuanto al aporte de ovocitos viables para PIVE (Carvalho *et al.*, 2008 y Gimenes *et al.*, 2015), ya que la dinámica folicular ovárica puede variar en función del genotipo animal empleando y de las condiciones ambientales (Ginther, 2015). En todo caso, se ha evidenciado la necesidad de realizar investigaciones que permitan mejorar los resultados de la PIVE en animales *Bos Taurus*.

Una de las razas *Bos taurus* de mayor importancia para los sistemas ganaderos doble propósito en el trópico es la raza Fleckvieh. Recientemente se ha demostrado que hembras de esta raza, adaptadas a condiciones de clima tropical, permiten colectar un mayor número de Complejos Cúmulus Ovocitos (CCOs) morfológicamente viables para PIVE, cuando se emplea una frecuencia de aspiración folicular dos veces a la semana en lugar de una vez a la semana (Solís *et al.*, 2019a).

Aunque se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el número de folículos disponibles para la aspiración folicular, el número de CCOs disponibles para PIVE (Sartori y Barros, 2011) y la calidad morfológica de los mismos (de Loos *et al.*, 1989), sobre el éxito de la

PIVE, resulta indispensable corroborar estos resultados en el laboratorio; pues la competencia del ovocito es un proceso multifactorial difícil de evaluar utilizando solo parámetros morfológicos (Blondin *et al.*, 2012).

Por lo antes mencionado, el presente trabajo investigativo tiene como objetivo evaluar el efecto de la frecuencia de aspiración folicular, sobre las tasas de maduración, clivaje y estadio de blastocistos en la producción *in vitro* de embriones en novillas de la raza Fleckvieh bajo condiciones tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización regional y condiciones geoclimáticas. Este estudio se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología Agropecuaria, 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. Dicho centro se encuentra ubicado dentro de una zona climática tropical de sabana, con una temperatura mínima de 22,1 °C y máxima de 32,0 °C, una precipitación pluvial anual con promedio de 2856,9 mm anuales y una humedad relativa de 80%.

Animales empleados y definición de los tratamientos. En este experimento fueron evaluados dos tratamientos tomando en consideración la frecuencia de aspiración con que fueron colectados los ovocitos. Se emplearon 16 novillas de la raza Fleckvieh Simmental, con edades entre 18 y 20 meses, cíclicas, sin presencia de patologías en el aparato genital y pesos entre los 400 a 450 Kg, divididas en dos grupos de ocho. El primer grupo fue aspirado con una frecuencia de una vez por semana (tratamiento uno, T1), en tanto que el segundo (tratamiento dos, T2), con frecuencia de dos veces por semana (84 horas de intervalo entre aspiraciones).

En ambos grupos, la primera aspiración fue considerada como un método de sincronización de la onda folicular por lo que sus datos no fueron tomados en cuenta para el estudio. Las aspiraciones fueron realizadas durante dos semanas consecutivas en el T1 y durante una semana en el T2, lo que permitió igualar el número de observaciones en cada tratamiento (n=16 por tratamiento). Los procedimientos de aspiración folicular fueron los descritos por Solís *et al.* (2019a).

Métodos de laboratorio. Para la producción *in vitro* de embriones, se empleó una incubadora de CO₂ marca SANYO®, modelo MCO-5AC que permitió mantener un ambiente a temperatura estable de 38,5 °C y 5,5% de CO₂ en aire con atmosfera saturada de humedad. Una cámara de flujo laminar horizontal marca ESCO®, modelo LHC-4A, que mantuvo un ambiente estéril para los ovocitos y embriones, fuera de la incubadora.

En una placa petri de selección (35 mm) se prepararon gotas de 70 µL de medio de maduración (TCM 199), cubiertas con aceite mineral y se colocaron a equilibrar en la incubadora de CO₂ una hora antes de iniciar la aspiración. Durante el proceso de búsqueda y clasificación, los ovocitos fueron mantenidos en medio de colecta de ovocitos (OCM). Se realizó cultivo individual por animal en microgotas (máximo 20 CCOs por gota de cultivo). La maduración fue realizada durante 24 horas.

Dos horas antes finalizado el tiempo de maduración, se colocaron a equilibrar gotas de 70 µL de medio de fertilización, rodeadas con aceite mineral en placas petri de 35 mm y aparte 500 µL de medio de fertilización en un vial de 2 mL. Al cabo de las 24h de maduración, los ovocitos fueron colocados en el medio de fertilización ya equilibrado.

El semen fue capacitado empleando el método de gradientes de percoll, donde en un vial de 2 mL, se dejó caer lentamente 250 µL de percoll al 45% sobre 250 µL de percoll al 90%, hasta crear un gradiente. El semen congelado contenido en pajillas francesas de 0,25 mL fue descongelado en un termo con agua a 35°C por 30 segundos para posteriormente ser depositado con cuidado sobre el gradiente.

El vial con el percoll y el semen se sometió a una centrifugación a 3500 rpm/min durante 10 minutos, permitiendo la formación de un pellet de semen en el fondo. Con ayuda de una micropipeta Pasteur el pellet de semen fue tomado y colocado en un vial de 2 mL que contenía 600 µL de medio de lavado de semen previamente temperado y resuspendido el semen. Se realizó una segunda centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, que dio lugar a la formación de otro

pellet de semen. El sobrenadante fue retirado y se dejó únicamente el pellet en el fondo del vial, que se pipeteo para resuspenderlo.

Una dosis de 5 μL de semen fue diluida en 45 μL de agua destilada y de esta mezcla se tomó 10 μL y se colocaron en un hematocitómetro, para determinar la concentración del pellet. En función de la concentración encontrada se adicionó la cantidad adecuada del medio de fertilización ya equilibrado para lograr una concentración de 1×10^6 espermatozoides por mL. Los ovocitos con los espermatozoides fueron colocados en medio de fertilización por un periodo de 22h bajo las mismas condiciones ambientales descritas anteriormente.

Dos horas antes de transcurrido el tiempo de fertilización el medio de cultivo para desarrollo embrionario (SOF), fue puesto a equilibrar en gotas de 70 μL cubiertas con aceite mineral, al igual que 900 μL de OCM en un vial de 2mL. Al cabo de las 22 horas de fertilización, los presuntos cigotos fueron colocados en el medio OCM equilibrado en el vial de 2mL y las células del cúmulo fueron removidas empleando un Vortex, por espacio de 3 minutos. Los presuntos cigotos ya desnudos se colocaron en las gotas de medio de cultivo, no sin antes haber sido lavados 2 o 3 veces en gotas de OCM previamente equilibradas.

La tasa de clivaje se observó por visión estereoscópica 48 horas posteriores a la fertilización y en ese momento se reemplazó el 50% del medio de cultivo por medio nuevo, previamente equilibrado, repitiéndose este procedimiento nuevamente el día 6. Durante los 6, 7 y 8 días después de la fertilización se realizó observación de los embriones donde se evaluó las tasas de desarrollo y producción de embriones (blastocistos).

Parámetros evaluados:

- Expansión de las células de cúmulus (indicador de la maduración)
- Tasa de clivaje
- Tasa de producción de blastocistos.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de comparación de proporciones (Chi cuadrado) para comparar los tratamientos en las variables estadíos de desarrollo embrionario. Se utilizó la dódima t de student para $P < 0,05$, considerando como efecto la frecuencia de aspiración.

Se realizó análisis de varianza a través de tablas de contingencia, para probar la interacción tratamiento por estadíos de desarrollo embrionario, la cual fue no significativa, por lo que se tomó en cuenta el tratamiento y el estadío de forma independiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede apreciar en la Tabla 1, un total de 268 ovocitos de grados 1, 2 y 3 se colocaron en cultivo de los cuales 148 lograron madurar, un 56,08% pertenecía al T1 y un 43,92% pertenecía al T2. En las hembras aspiradas una vez a la semana (T1) se observó una tasa de maduración ovocitaria más alta ($P < 0,05$), que las hembras aspiradas dos veces por semana (T2).

A nuestro criterio este hallazgo puede ser explicado por la mayor proporción de ovocitos grado 3 encontrados en el tratamiento dos, pues la valoración de la maduración se realizó de forma visual, determinando la expansión de las células de cúmulus, donde muchos de los ovocitos de grado 3 con muy pocas células del cúmulus muchas veces son contabilizados como no madurados.

Por su parte, Matorras y Hernández (2007), indicaron que la evaluación de la madurez de los ovocitos basada en la expansión y el aspecto del Complejo Cumulus-Corona que rodea al ovocito, aunque se acerca bastante a la maduración del ovocito, no es del todo fiable debido a la disparidad que puede existir en el proceso de maduración del ovocito y del cúmulus.

Tabla 1. Estadíos de desarrollo embrionario obtenidos en con las frecuencias de aspiración una vez a la semana (T1) y dos veces a la semana (T2).

Tratamientos	Total de Ovocitos (n)	Estadíos de Desarrollo Embrionario					
		Maduración		Clivaje		Blastocistos	
		n	%	n	%	n	%
T1	128	83	56,08	52	48,15	28	41,17
T2	140	65	43,92	56	51,85	40	58,83
EE y Significación		±4,11 $P < 0,05$		±4,81 $P = 0,1522$		±6,06 $P < 0,05$	
Total	268	148	100	108	100	68	100

Valores en la misma columna con $P < 0,05$ difieren entre sí.

En cuanto a la tasa de clivaje no se observó diferencias entre tratamientos ($P > 0,05$), lo que coincide con Viana *et al.* (2004), quienes no encontraron diferencias en la tasa de división cuando las hembras fueron aspiradas una o dos veces a la semana.

La tasa de producción de blastocistos fue significativamente mayor ($P < 0,05$), cuando la obtención de los ovocitos se realizó con una frecuencia de dos veces por semana (T2) en lugar de una (T1).

Chaubal *et al.* (2006) con hembras mestizas Angus, no obtuvieron diferencias en la tasa de producción de blastocitos cuando se compararon los resultados entre sesiones de aspiración con frecuencias de una y dos veces a la semana. No obstante, Viana *et al.* (2004), con hembras Gir ya habían reportado mayor porcentaje de blastocistos cuando las hembras fueron aspiradas dos veces a la semana que cuando se realizó una sola aspiración semanal.

Consideramos que este resultado se debió a la formación de folículos dominantes funcionales en el tratamiento de aspiración una vez a la semana, que afectan negativamente el desarrollo de los folículos subordinados y por ende la competencia meiótica de los CCOs colectados.

Viana *et al.* (2004) al encontrar mejores tasas de producción de blastocistos empleando frecuencias de aspiración dos veces a la semana *versus* una vez a la semana, indicaron que las aspiraciones realizadas dos veces a la semana pueden no tener folículos subordinados negativamente afectados. Esta hipótesis fue corroborada al observar que el segundo folículo de mayor tamaño aumentó su crecimiento a intervalos de dos aspiraciones semanales y la redujo a intervalos de una aspiración semanal.

La aspiración de los contenidos foliculares a intervalos más cortos aumentó el número de emergencia de ondas por unidad de tiempo, con una disminución de la inhibina y los mecanismos de retroalimentación negativa de estradiol y el consiguiente aumento en el periodo de elevadas concentraciones de FSH (Viana *et al.*, 2004).

Por otro lado, al realizar la aspiración de todos los folículos visibles en el ovario (Surjus *et al.*, 2014), se estimula al desarrollo de una onda de folículos más pequeños tres días después de la

aspiración (Bacelar *et al.*, 2010), lo que implica que al realizar aspiraciones dos veces a la semana se obtengan en cada sesión folículos más pequeños que cuando se realiza la aspiración una vez a la semana.

Blondin y Sirard (1995) al emplear ovarios de matadero señalaron que el tamaño del ovocito esta correlacionado con la capacidad de desarrollo del folículo, y cuanto mayor sea el tamaño folicular mayor será la capacidad del ovocito de alcanzar el estado de ruptura de la vesícula germinal (expulsión del primer cuerpo polar) o de maduración, la fecundación y el desarrollo embrionario.

No obstante, más recientemente Segura *et al.* (2015), igualmente con ovarios de matadero, reportaron mayor competencia meiótica a partir de ovocitos extraídos de folículos pequeños (1 a 4 mm) que con ovocitos procedentes de folículos de mayor tamaño (5 a 6 mm).

Los resultados de estas investigaciones también nos llevan a interpretar que la competencia meiótica de los ovocitos varía en función de las características de la dinámica del desarrollo folicular, que como ya es de conocimiento general puede variar entre razas, entre individuos del mismo genotipo, e incluso, en el mismo animal, como fue demostrado por Solís *et al.*, (2019b).

CONCLUSIONES

Basados en la expansión de las células del cúmulus, la frecuencia de aspiración una vez a la semana permite alcanzar porcentajes superiores en la maduración.

La frecuencia de aspiración no afecta la tasa de clivaje.

La aspiración dos veces a la semana permite obtener mayores tasas producción de blastocistos y por tanto, mejores resultados en un programa continuo de Producción *In vitro* de Embriones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacelar, D., Max, M. C., Padilha, L. C., Barreiros, T. R. R., & Seneda, M. M. (2010). Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(1), 163-171. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744095015.pdf>
- Blondin, P., Vigneault, C., Nivet, A. L., & Sirard, M. A. (2018). Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far?. *Animal Reproduction (AR)*, 9(3), 281-289. Recuperado de <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6058f7783717068b46e7/pdf/animreprod-9-3-281.pdf>
- Blondin, P., & Sirard, M. A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 54-62. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Carvalho, J. D., Carvalho, N. D., Reis, E. L., Nichi, M., Souza, A. 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. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.035>
- Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E. J., ... & Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65(8), 1631-1648. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
- 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. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.030>
- Ginther, O. J., Siddiqui, M. A. R., Baldrighi, J. M., Wolf, C. A., & Greene, J. M. (2015). Differences between follicular waves 1 and 2 in patterns of emergence of 2-mm follicles, associated FSH surges, and ovarian vascular perfusion in heifers. *Theriogenology*, 84(6), 853-861. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.023>
- Matorras, R. y Hernández, J. (2007). Estudio y tratamiento de la pareja estéril. Adalia, Madrid España: Adalia farma, S. L. Recuperado de <https://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/completo.pdf>
- Perry G. (2013). 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. International Embryo Technology Society. Doi:

<http://doi.org/10.13140/RG.2.2.24719.18086>

- Perry G. (2018). 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *International Embryo Technology Society*. Doi: <http://doi.org/10.13140/RG.2.2.24793.42087>
- Sartori, R., & Barros, C. M. (2011). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 244-250. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006>
- Segura, G., Cortez, J., & Cayo, I. (2015). Capacidad de maduración in vitro de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. *Spermova*, 5, 106-109. Doi: http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.5Vol.1/corregidoo%202018/Segura_2015_0002_24.pdf
- Solis-Corrales A, de Armas R, Morales J, Denis R. (2019a). Influencia de la frecuencia de aspiración folicular sobre la cantidad y calidad de ovocitos colectados en vaquillonas Fleckvieh Simmental bajo condiciones tropicales. *Taurus*. 21(82):18-24. Recuperado de <https://www.revistataurus.com.ar/revistas/taurus-82-14/>
- Solis-Corrales A, de Armas R, Morales J, Denis R. Estudio de la dinámica folicular en novillas Simmental Fleckvieh: Segunda parte. *Revista Investigaciones Agropecuarias*. 2019b; 1(2): 55-66.
- Solis-Corrales, A., de Armas, R., Morales, J., & García, R. D. (2019b). Estudio de la dinámica folicular en novillas simmental fleckvieh: Segunda parte. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 1(2), 55-66. Recuperado de http://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones_agropecuarias/article/view/497/406
- Surjus, R. S., Prata, A. B., Borsato, M., Mattos, F. C., da Silveira, M. C. M., Mourão, G. B., ... & Sartori, R. (2014). In vivo embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(4), 527-532. Doi: <https://doi.org/10.1071/RD12398>
- Viana J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*. 2019; 36(4):8-25. Recuperado de https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2018.pdf
- Viana, J. H. M., de Almeida Camargo, L. S., de Moraes Ferreira, A., de Sa, W. F., de Carvalho Fernandes, C. A., & Junior, A. D. P. M. (2004). Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal reproduction science*, 84(1-2), 1-12. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.002>