

# **EFFECTOS DE LA MASTITIS CLÍNICA EN LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES DE VACAS HOLSTEIN FRIESIAN**

**Autor/es:** Guerrero GHZ<sup>1</sup>, Leyva OC<sup>1</sup>, Morales CJL<sup>1</sup>, Mellado BM<sup>1</sup>, Pedroso SR<sup>2</sup>, Gaytan ALR<sup>1</sup>.<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna 2 Centro de Investigaciones para la Mejora Animal de la Ganadería Tropical. Contacto: Periferia y carretera a Sta. Fe, Torreón Coahuila, México.

## **Resumen**

La mastitis es la enfermedad más común que afecta a todas las vacas de alta producción de leche en todo el mundo. Y ha sido una de las principales causas de desechos prematuros de vacas elite, afectando directamente en la economía de las explotaciones lecheras, por la pérdida de calidad y desecho de la leche, además se ha relacionado esta inflamación con una pérdida del rendimiento reproductivo de las vacas afectadas.

Una de las causas por la que la mastitis tiene un efecto negativo en el desarrollo embrionario, es la liberación o secreción de mediadores de la inflamación como lo es el TNF $\alpha$ , IL-1, NO y hormonas como PGF2 $\alpha$ . A pesar de ser un tema conocido las causas no están del todo confirmadas. En el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la ocurrencia de mastitis clínica sobre la producción de ovocitos y de la PIVE en vacas Holstein altas productoras.

El estudio se llevó a cabo en un establo lechero comercial de la región lagunera, encontrándose en las coordenadas 103° 13' 42" longitud Oeste y 25° 31' 41" latitud Norte, con una n de 36 vacas Holstein, 18 con mastitis clínica y 18 sin mastitis. Teniendo como resultados que las vacas sin mastitis se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los ovocitos colectados de calidad G1, y en el total de ovocitos viables y los colectados comparados a las enfermas.

En cuanto a la PIVE no se encontró efecto negativo y no hubo diferencia significativa en comparación a las sanas, presuntamente por el uso de medios de maduración, descartando el fluido folicular como medio de maduración, fertilización y desarrollo embrionario.

**Palabras clave:** Mastitis, ovocitos, TNF $\alpha$ , PGF2 $\alpha$ , Citoquinas, *In vitro*.

## **Introducción**

La última década del siglo pasado se caracterizó por ser un periodo relevante en lo que se refiere al desarrollo de biotecnologías directas para la reproducción asistida en humanos y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de animales elite (Fernandez *et al.*, 2007). Una de estas biotecnologías es la producción *in vitro* de embriones (PIVE) en bovinos (Urrego *et al.*, 2008). La producción *in vitro* de embriones representa un importante avance tecnológico en

la reproducción de las especies domésticas de alto valor genético y también es una interesante alternativa comercial (Chong *et al.*, 2016).

Una de las limitantes para lograr buenos resultados en un programa de producción-reproducción en las biotecnologías reproductivas, son las infecciones o enfermedades crónicas que aparecen en la vida productiva de la hembra, provocando el desecho prematuro involuntario de las hembras afectadas (Schrick *et al.*, 2001). La mastitis es una enfermedad muy importante en las vacas altas productoras de leche en todo el mundo, lo que provoca grandes pérdidas económicas debido a la reducción de la producción, calidad y composición de la leche (Asaf *et al.*, 2014, Roth *et al.*, 2013 y Seegers *et al.*, 2003). Las pérdidas reproductivas asociadas a enfermedades inflamatorias en la industria de carne en los estados unidos tiene un costo estimado de \$500 millones de dólares anuales (Scenna, 2006). Así mismo en la industria de leche en los Estados Unidos por causa de la mastitis se tiene un costo estimado de 2 mil millones de dólares anuales con pérdidas que oscilan entre 150.0 y 300.0 USD/vaca/año (Roth *et al.*, 2013).

La mastitis y otras infecciones inflamatorias que ocurren en el ganado bovino lechero, tienen una gran influencia en la fertilidad y tienen un efecto negativo en el comportamiento reproductivo y no solo en la producción de leche (Jackson *et al.*, 2012 y Asaf *et al.*, 2014). Por ejemplo el tiempo desde el parto a la primera inseminación es más largo, y el número de servicios por concepción es mayor en vacas con mastitis (Morales *et al.*, 2016). Además se ha demostrado en estudios recientes que la tasa de concepción y la tasa de preñez son más bajas en vacas con mastitis comparado a las sanas (Asaf *et al.*, 2014).

Por todo lo anterior se podría llegar a pensar que los efectos de esta enfermedad pueden afectar las células o gametos sexuales en el desarrollo del embrión.

La relación que existe entre la mastitis (inflamación de la glándula mamaria), la reproducción y la producción *in vitro* de embriones no ha sido ampliamente estudiada, especialmente en vacas Holstein Friesian altas productoras (Schrick *et al.*, 2001; Lavon *et al.*, 2010).

La mastitis conduce a la producción de una variedad de moléculas bioactivas fuera del tracto reproductivo que pueden potencialmente interrumpir tejidos del aparato reproductivo aumentando los niveles de producción de citoquinas como el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la prostaglandina-F2-alfa (PGF2 $\alpha$ ), y el óxido nítrico (NO) que tienen un efecto negativo en la foliculogénesis y en el eje-hipotalamo-hipofisis-gonadas (Roth Z, y Wolfenson D, 2016, Soto *et al.*, 2003, 2003b).

Por primera vez en condiciones de clima semidesértico en México, se determinó el efecto que tiene en el comportamiento reproductivo y en la eficiencia en la PIVE de embriones. Los posibles mecanismos por los que la mastitis afecta negativamente la reproducción aún no está muy claros y documentados. Por lo tanto la comprensión de los mecanismos y efectos perjudiciales que tienen los mediadores de la inflamación (TNF $\alpha$  y la PGF2 $\alpha$ ) en el desarrollo del embrión *in vitro* en las diferentes etapas de división, permitirá la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar o contrarrestar estos efectos deletéreos en la calidad, desarrollo y supervivencia del embrión para lograr una mejor eficiencia reproductiva en las vacas de alto potencial genético con enfermedades inflamatorias como la mastitis.

## **Materiales y Métodos**

El estudio de campo se realizó en un establo lechero comercial localizado en Torreón Coahuila, con una Latitud 24° 22' Norte y 102° 22' Oeste de Longitud, con 1,120 metros sobre nivel del mar. Con condiciones climáticas: región semiárida, seca, precipitación pluvial anual 250 mm. humedad relativa del 20-25 %, Temperatura media anual de 25 °C, con máximas de 45 y mínimas de -5 °C.

El estudio se llevó a cabo en el mes de mayo para eliminar el posible efecto adicional del estrés calórico sobre la población folicular. Todos los animales utilizados en el experimento fueron sometidos a un examen ginecológico y solo se seleccionaron aquellas sin trastornos reproductivos perceptibles.

Estos animales fueron sometidos bajo vigilancia veterinaria según lo dispuesto en el programa sanitario y en producción normal de su lactancia.

Las vacas al momento del experimento tenían:

Mismo tipo de mastitis (clínica y no crónica).

Mismos días en leche (60-90 DEL).

3 - 5 partos.

Mismo nivel de producción (10,000 kg/lactancia)

Se seleccionaron 36 vacas Holstein Friesian altas productoras de leche, 18 con mastitis Clínica y 18 sin mastitis, de las cuales todas fueron donadoras de ovocitos para el programa de Producción *In vitro* de embriones, se buscó la homogeneidad de todas estas con los mismos parámetros reproductivos y tipo de alimentación. Los ovocitos se colectaran por el método de aspiración folicular transvaginal "Ovum Pick UP" (OPU).

## **Alimentación**

Todas las vacas fueron alimentadas mediante forraje (55%) concentrados (45%) y los suplementos minerales y vitamínicos que están incluidos en la ración totalmente mezclada (RMT) y con agua a libre acceso.

Los ingredientes de la dieta ofrecida a los animales en el periodo de lactancia fue en base a forrajes como la alfalfa, ensilaje de sorgo, ensilaje de maíz y avena, así como de concentrados con maíz rolado, semilla de algodón y canola.

Todos los registros productivos y reproductivos fueron almacenados en el software especializado Dairycom®.

## **Proceso de aspiración folicular.**

La aspiración folicular fue realizada *in vivo* empleando el método de aspiración folicular transvaginal (OPU). Para este propósito, las hembras fueron sedadas con Xilacina (Prosin, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2% (0.3 ml/vaca IM) y anestesiadas de forma local con Lidocaína (Pisacaina, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2 % (3 ml/vaca) para prevenir contracciones rectales y facilitar la manipulación de los ovarios, el recto de los animales fue vaciado manualmente y se higienizó todo el tren posterior mediante un lavado con agua y yodo.

El equipo utilizado fue un equipo de ultrasonografía (CHISON, Digital Ultrasound System, Model: 8300 VET. 5.0 MHz Sectorial conectado a un transductor vaginal de

7.5 MHz acoplado a una guía de aspiración folicular con cánula de 20 G x 2", la cual está unida mediante un sistema de aspiración folicular equipado con tubo

cónico de 50 ml. para la recolección a una bomba de vacío (Pionner Pro Pump, Pioneer Pro Pump Single – 115v, Single Foot Pedal, PS 653, Canada).

Se introdujo el transductor por vía vaginal, cubierto con un protector con gel para ultrasonografía.

Los ovarios se manipularon rectalmente de forma tal que se colocaron estos contra el transductor y se visualizaron los folículos en la pantalla del ecógrafo. Con la aguja se atravesó la pared vaginal, puncionando de esta forma los folículos de entre 3 y 10 mm de diámetro, al momento que se aplicó la presión de vacío de 50 a 65 mm Hg y se recogió el aspirado folicular en los tubos de recolección, que contenían medio de aspiración (PBS + heparina, en relación 50:1).

Los ovocitos colectados se dividieron en dos grupos de acuerdo a la condición de la vaca donante, fueron evaluados y clasificados morfológicamente de acuerdo a Loos *et al.*, (1989) en la escala de 1 a 4 (1, 2, 3 aptos y 4 no aptos para la PIVE):

Grupo 1: Ovocitos de vacas sanas

Grupo 2: Ovocitos de vacas con mastitis clínica

Durante el desarrollo del experimento se realizó una repetición de aspiración de los Ovocitos de los ovarios de las 36 vacas.

### Proceso de producción *In vitro*.

El proceso para la producción de embriones *In vitro* se realizó en un laboratorio acreditado y con personal capacitado en el desarrollo de esta biotecnología, siguiendo los estándares y protocolos del laboratorio.

Una vez localizados y clasificados los ovocitos se juntaron todos en una placa de Petri redonda 35 mm. y se trasladaron al medio de maduración (50 ovocitos / pozo con 500 microlitros de medio). Se cerró la placa de maduración y se equilibró en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y con 100% de humedad relativa, a una temperatura de 39°C por 24 h.

### Resultados y Discusión

En el cuadro 1, se muestran los resultados de la aspiración folicular de vacas Holstein sanas y enfermas de mastitis clínica. De acuerdo con estos datos, hubo diferencias significativas en algunas variables medidas en la aspiración folicular.

**Cuadro 1. Resultados de la aspiración folicular de vacas Holstein sanas y enfermas de mastitis clínica.**

	<b>Sanas (%)</b>	<b>Mastitis (%)</b>	<b>P&lt;0.05</b>
n	18	18	
Vacas que produjeron ovocitos	18 (100)	16 (88.88)	<b>NS</b>
GI	44 (17.67)	16 (8.12)	<b>0.05</b>
GII	100 (40.16)	88 (44.67)	<b>NS</b>
GIII	82 (32.93)	61 (30.96)	<b>NS</b>
Ovocitos viables	226 (90.76)	165 (83.75)	<b>0.05</b>
GIV (Descartados)	23 (9.23)	32 (16.24)	<b>0.05</b>
Total de ovocitos colectados	249 (13.83)	197 (10.94)	<b>0.05</b>

n= Número de vacas. GI, GII, GIII, GIV= clasificación de la calidad de los ovocitos.

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en las vacas sanas con respecto a las enfermas en los ovocitos colectados de calidad GI, en el total de ovocitos viables y los colectados. El número de ovocitos descartados fue mayor ( $P < 0.05$ ) en las vacas con mastitis.

Uno de los hallazgos más significativos de este estudio fue que en el grupo de vacas con mastitis en dos de ellas no se obtuvieron ovocitos y se evidenció la falta de estructuras ováricas en la visión ecográfica (folículos y CL).

En este estudio del total de las vacas con mastitis (18), dos de ellas no produjeron ovocitos, lo que es un aspecto de singular importancia ya que fue encontrado por primera vez un número de vacas en las cuales no se apreciaron estructuras ováricas ni fue factible recuperar ovocitos mediante la punción intrafolicular a pesar de haber sido aspiradas exactamente de la misma forma que las otras vacas.

Estos datos se asemejan a los reportados por Rahman et al. (2012) y Roth et al. (2013), donde ellos encontraron menor población folicular y menor tasa de recuperación de ovocitos, sin embargo, no hay reportes previos de no haber encontrado estructura alguna al momento de la aspiración en vacas enfermas con mastitis clínica.

Durante la infección de la glándula mamaria, hay un aumento en la cantidad de leucocitos y macrófagos en la circulación sanguínea y estos producen citocinas proinflamatorias. Afectando la composición del fluido folicular, desarrollo de los ovocitos y la expresión de genes específicos en los ovocitos como el factor GDF-9 (Rahman et al., 2012) y en la células del cúmulus (Santos et al., 2018).

Interfiriendo negativamente en la capacidad de desarrollo de ovocitos de buena calidad y como consecuencia una falla en el crecimiento y maduración de estos, siendo en mayor parte dependientes de hormonas gonadotrópicas y de la presencia y cantidad de genes y sustancias presentes en el fluido folicular.

El mecanismo fisiopatológico mediante el cual la mastitis de origen infeccioso perturba las funciones ováricas o la calidad de los ovocitos aún no está del todo claro, pero, de acuerdo con los estudios de Soto et al. (2003) y Scenna (2006), posiblemente el que haya diferencia para el caso de las vacas enfermas vs sanas se deba a la presencia de citocinas, que son moléculas bioactivas presentes en enfermedades infecciosas o procesos inflamatorios como la mastitis.

Otro posible mecanismo por el cual hay un menor número en la cantidad y calidad de ovocitos en vacas con mastitis clínica, podría ser la producción de algunos mediadores de la inflamación como el TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , NO y PGf2 $\alpha$ , que causan bajos niveles de hormonas gonadotrópicas como la GnRH, FSH y LH (Okuda et al., 2006; Roth et al., 2013; y Asaf et al., 2014).

Y en consecuencia, un insuficiente desarrollo folicular (Santos et al., 2018), maduración del ovocito, producción de estrógenos y por lo tanto, la falta o intensidad de estro, así como una anovulación e insuficiencia de la concepción (Kumar et al., 2017).

**Cuadro 2.** Resultados de la producción in vitro de embriones de vacas Holstein.

<b>Categoría</b>	<b>Sanas</b>	<b>Mastitis Clínica</b>	<b>P&lt;0.05</b>
Total de ovocitos a laboratorio	226	165	NS
Ovocitos cultivados	205 (90.70)	152 (92.12)	NS
Ovocitos clivados	90 (39.82)	76 (46.06)	NS
Total de blastocistos	13 (5.75)	15 (9.09)	NS
Viabilidad de embriones (%)	76.92	60.00	NS

En la producción in vitro de embriones (cuadro 2), la presencia de mastitis no ejerció efecto en la competencia de los ovocitos para su maduración, fertilización y desarrollo *in vitro*. En cuanto a los resultados de este estudio hacia la competencia de los ovocitos en la PIVE no se encontró influencia por la presencia de la mastitis contra las sanas (cuadro 3), ni en la producción de embriones totales, pero se encontró una mayor viabilidad de los embriones de las vacas sanas contra las enfermas con mastitis clínica. El mecanismo fisiopatológico mediante el cual la mastitis de origen natural perturba la calidad y competencia de los ovocitos para la PIVE, aún no está del todo claro. En la actualidad se introducen diversos métodos para mejorar la eficiencia de los procesos de PIVE asociado al efecto negativo que ejerce la TNF $\alpha$  y PGF2 $\alpha$  sobre el crecimiento y el desarrollo embrionario (Scenna, 2004, 2006; Moore et al., 2005). Una de las hipótesis en los procesos de maduración de ovocitos, fertilización y desarrollo embrionario temprano, se ven alterados por los metabolitos de los microorganismos que colonizan la glándula mamaria como las citocinas y otras moléculas bioactivas producidas por la vaca en respuesta a la infección (TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL6, IL8, IL12, PGF2 $\alpha$ , NO) (Barker et al., 1998; Hockett et al., 2000 y Soto et al., 2003) que pueden comprometer el desarrollo de los embriones.

Estos hallazgos experimentales en primer lugar muestran que puede ser posible producir embriones mediante la técnica de fertilización in vitro con ovocitos provenientes de vacas altas productoras enfermas de mastitis y en segundo lugar, que los procesos inflamatorios fuera del tracto reproductor pueden afectar la fertilidad y eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida (Santos y Ribeiro, 2014; Ribeiro et al., 2016).

### **Conclusiones**

En vacas Holstein con mastitis clínica disminuyó significativamente ( $P > 0.05$ ) la tasa de ovocitos colectados de calidad G1 y ovocitos viables con respecto a las vacas no afectadas por esta enfermedad.

La mastitis clínica afecta las funciones del ovario reduciendo las estructuras ováricas y disminuyendo la cantidad y la calidad de ovocitos viables, pero no afectó la producción in vitro de embriones con respecto a vacas sin mastitis.

Referencias Bibliográficas

Fuente.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/efectos-mastitis-clinica-produccion-t43411.htm>

[Clic Fuente](#)



**MÁS ARTÍCULOS**