

# PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES SEXADOS, MEDIANTE ASPIRACIÓN DE OVOCITOS POR LAPAROSCOPIA, A PARTIR DE BECERRAS DE 3 MESES DE EDAD

Horacio Álvarez Gallardo

Álvarez-Gallardo H1, Velázquez-Roque A2, Martínez-Sandoval JR3, Ochoa-Estrada E3, Arenas-Sánchez LJ3, Villaseñor-González F4, Kjelland ME5,6, Romo S7. 1Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México.

2H&A Biotecnologías en Reproducción Animal, Tepatitlán, Jalisco, México.

3Práctica Privada, Querétaro, México

4Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México.

5Conservation, Genetics & Biotech, LLC, Valley City, North Dakota, USA.

6Mayville State University, North Dakota, USA.

7Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán, México, México

## Introducción

En la actualidad la producción in vitro de embriones (PIV) y la transferencia de embriones (TE) han tenido un gran impacto en la producción animal. Esta tecnología ha tenido tanta aceptación que se está aplicando en escala comercial alrededor del mundo y ha venido creciendo a un porcentaje de alrededor del 12% anual, de acuerdo con las estadísticas de la Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones (Viana, 2021). En el caso del ganado bovino la PIV es ampliamente aplicada y la mayoría de los embriones producidos a nivel mundial son generados por esta tecnología. La PIV ha desplazado de forma importante a la superovulación (producción in vivo de embriones) debido a muchos factores, siendo los más importantes el uso del semen sexado de forma más eficiente, así como poder utilizar diferentes toros con ovocitos de la misma donadora al mismo tiempo. Otra de las razones de la amplia aplicación de la PIV, es el avance en otras tecnologías reproductivas como el sexado espermático y la aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU), esta última, ha permitido la colección eficiente de ovocitos a partir de animales vivos, además de ser mínimamente invasiva y altamente repetible sin afectar el bienestar animal de las donantes. Sin embargo, en especies de menor tamaño como los ovinos, caprinos y cérvidos la colección de ovocitos no se puede realizar mediante OPU. Para ello se desarrolló en la década de los 90's la aspiración de ovocitos por laparoscopia (LOPU), desde entonces se ha perfeccionado y adaptado para su aplicación en una gran variedad de animales domésticos y silvestres (Pierson et al., 2004; Locatelli et al., 2006).

La técnica de LOPU tiene muchas ventajas sobre la técnica de OPU, como la visualización del ovario, lo cual permite que se pueda discrepar entre los folículos a aspirar, reduciendo el daño al estroma ovárico. La repetición de los procedimientos LOPU en la misma hembra no causa secuelas con impacto en la vida reproductiva de la hembra,

incluso cuando se realiza en animales prepúberes o salvajes (Alecho et al., 2018). Una de las principales aplicaciones de la LOPU es en animales prepúberes, existen reportes de colección de ovocitos de becerras de 2 meses de edad. Mediante la aspiración de hembras prepúberes, se disminuye el intervalo generacional y con esto se acelera el mejoramiento genético (Baldassarre et al., 2018).

El primer reporte de PIV a partir de becerras prepúberes fue reportado en 1992 (Amstrong et al.), en este trabajo colectaron ovocitos por LOPU de becerras de 3 a 8 semanas de edad, consiguiendo 1 cría nacida después de las transferencias. Sin embargo, los resultados PIV a partir de ovocitos de becerras prepúberes habían sido bajos, alrededor de 10% de blastocistos (Currin et al., 2017; Velázquez et al., 2019). En la actualidad existen protocolos de estimulación ovárica para la eficiente PIV a partir de hembras prepúberes. Estos tratamientos consisten en la aplicación de gonadotropinas exógenas a diferentes intervalos de tiempo entre aplicaciones. El protocolo que mejores resultados ha tenido requiere de 5 inyecciones de FSH cada 8 horas acompañadas de una dosis de eCG (Baldassarre et al., 2018), este protocolo tiene el inconveniente de requerir muchos manejos, lo que lo hace muy laborioso e incómodo para las donadoras, por lo que se requiere de un protocolo con menor número de aplicaciones de FSH, lo cual facilitaría la aplicación de la selección genómica de donadoras, la LOPU, la PIV y el sexado espermático para acelerar el mejoramiento genético en el ganado bovino (Currin et al., 2021).

## Objetivo

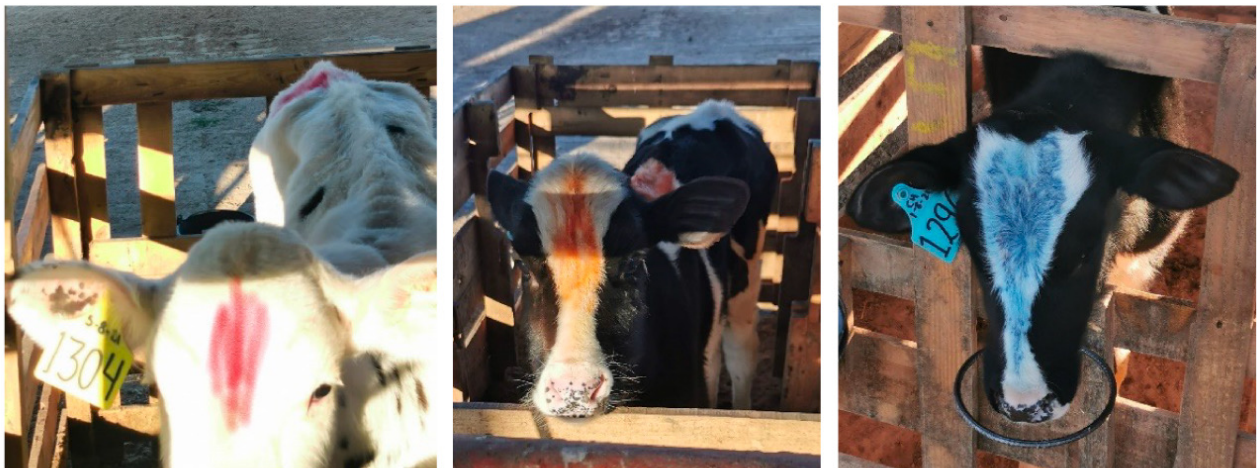
Evaluar la PIV con semen sexado de última generación, a partir de becerras de 3 meses de edad, mediante la aplicación de 3 protocolos de estimulación ovárica.

## Materiales y métodos

### Animales

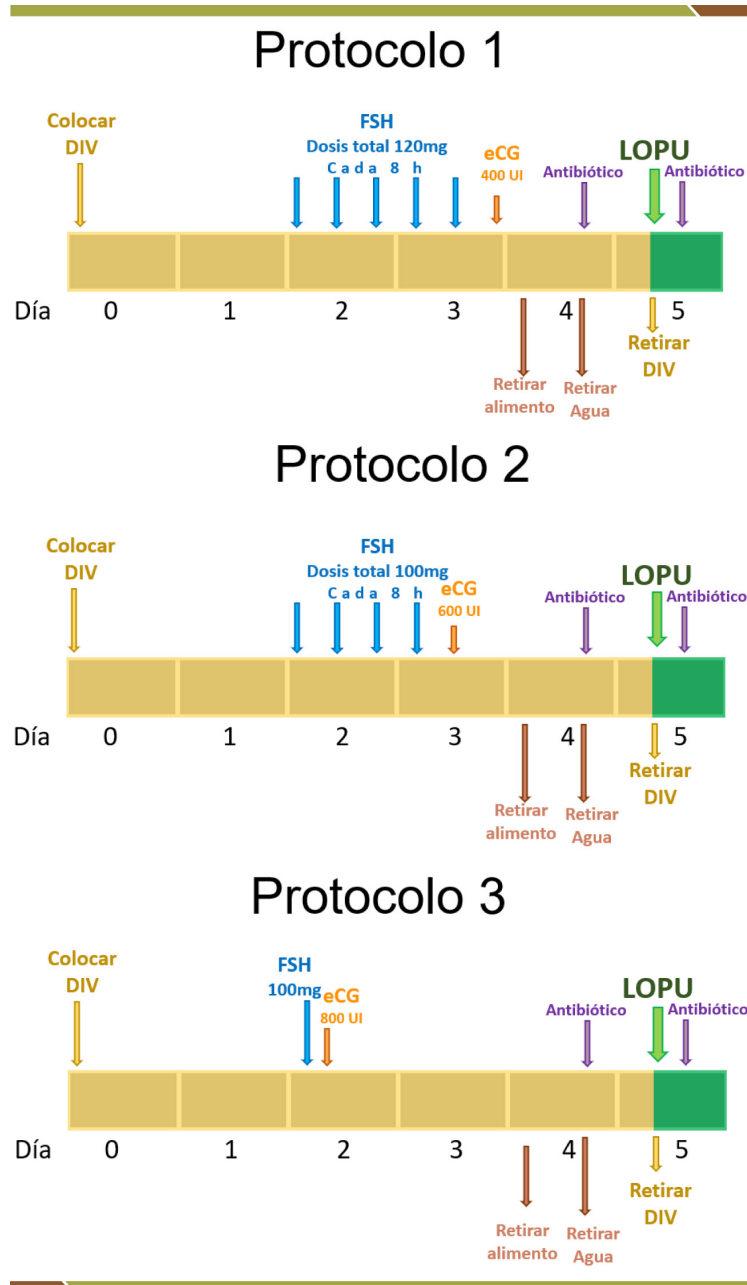
Se utilizaron 15 becerras de 3 meses de edad de la raza Holstein, clínicamente sanas, las cuales se dividieron en tres grupos de 5 becerras cada uno, y fueron marcadas con crayón de diferente color por cada grupo (Imagen 1).

Imagen 1: Identificación de donadoras según el protocolo de estimulación ovárico utilizado.



## Estimulación ovarica

Se evaluaron tres protocolos de estimulación (5 hembras por cada protocolo): 1) el día 0 se colocó un dispositivo intravaginal para borregas (DIV) de 0.3 g de progesterona, el día 2 se inició con la aplicación de FSH (purificada) cada 8 horas en 5 aplicaciones + eCG en la sexta aplicación (8 h después de la aplicación 5 de FSH) y en el día 5 se retiró el DIV y se realizó la LOPU; 2) de la misma forma que en el protocolo 1 con la diferencia de que se realizaron 4 aplicaciones de FSH cada 8 horas + eCG en la quinta aplicación; 3) de la misma forma que en el protocolo 1, solo que aquí se realizó una aplicación de FSH + eCG en el día 2. Los protocolos se ejemplifican a continuación:



## Aspiración de ovocitos por laparoscopia (LOPU)

La LOPU se realizó bajo anestesia a nivel de campo, se utilizó ketamina (5 mg/kg IM) más xilazina (0.2 mg/kg IM) previo ayuno de sólidos de 24 horas y agua de 12 horas. Una vez anestesiada, la donadora se colocó en decúbito dorsal en una camilla laparoscópica para rasurar y desinfectar la zona abdominal inmediatamente craneal a la ubre.

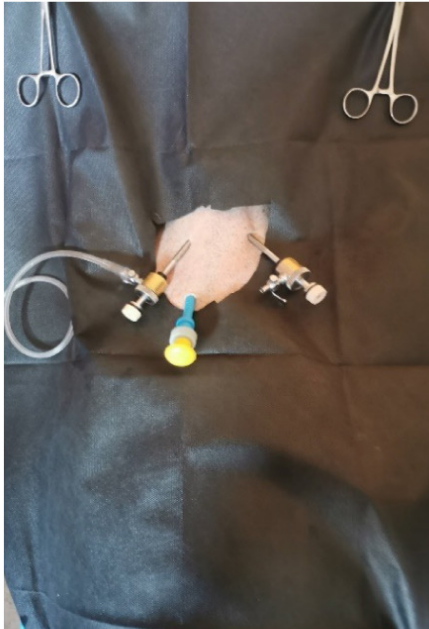


Imagen 2: Posición de los trócares



Imagen 3: Equipo de aspiración folicular por laparoscopia

Imagen 4: Proceso de aspiración folicular por laparoscopia de becerras prepúberes en campo.



Posteriormente, se levantó la camilla con la cabeza hacia abajo en un ángulo aproximado de 45-60 grados, de tal modo que los órganos digestivos descansen sobre el diafragma para permitir aislar el útero y los ovarios. Se procedió a colocar un campo quirúrgico dejando un área aproximada de 15 x 15 cm y se colocaron tres trocares de 5 mm cada uno (un trocar para el endoscopio, otro para una pinza atraumática y otro para el mandril de aspiración) (Imagen 2). Se realizó un neumoperitoneo, insuflando la cavidad abdominal con CO<sub>2</sub>. La visualización se llevó a cabo mediante un endoscopio rígido de 5mm y 0°, asociado con el mandril de aspiración de 5 mm de diámetro, unido a una aguja de 20G de bisel corto, la cual se conecta a una manguera siliconada que desemboca en un tubo de colección de 50 mL el que a su vez está conectado con la bomba de vacío (Imagen 3). La presión de vacío se reguló a una velocidad de 50-70 gotas por minuto. La punción folicular se realizó sujetando el ovario con la pinza atraumática y girando en diferentes direcciones para ver toda la superficie del ovario y así puncionar todos los folículos de más de 5 mm de diámetro (Imagen 4). El procedimiento se repitió en ambos ovarios, y al término se lavaron los ovarios con solución salina fisiológica adicionada con 20 UI de heparina sódica por mL.

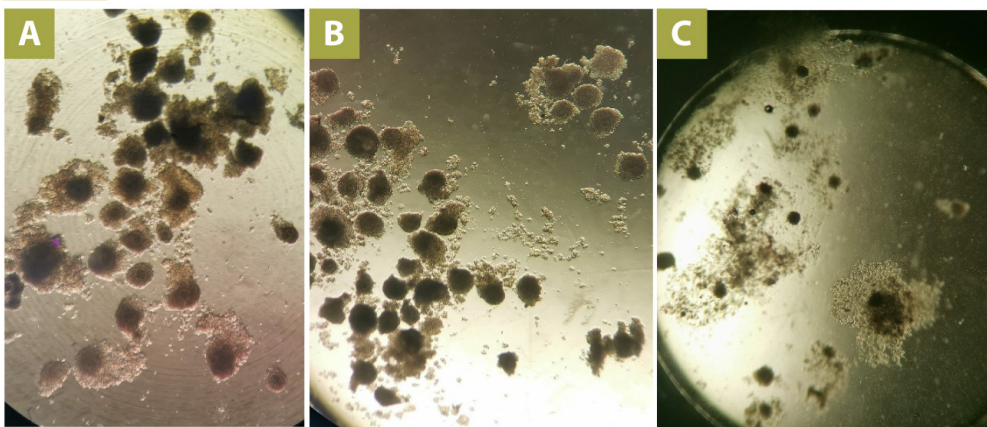
## Producción in vitro de embriones (PIV)

### Maduración in vitro (MIV).

Los ovocitos colectados (se mezclaron los ovocitos de las donadoras de cada grupo para bloquear el efecto de la hembra) fueron madurados in vitro (Protocolo 1 n=120; Protocolo

2 n = 115; Protocolo 3 n=96) en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, a 38.5°C y humedad de 100% por 24 horas.

Imagen 5: Ovocitos colectados por LOPU: A) Protocolo 1, B) Protocolo 2, C) Protocolo 3



### Fertilización in vitro (FIV).

Para la fertilización in vitro se utilizó semen sexado de

última generación con cromosoma "X" de 4 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (SS-4M) del mismo toro, de la raza Holstein probado para PIV. El semen fue separado mediante la técnica de MiniPercoll y ajustado a una concentración de 0.5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por mL. Para la FIV de los ovocitos madurados se utilizaron gotas de 80 µL de medio de fertilización en una caja de Petri para cultivo embrionario en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, a 38.5°C y con humedad del 100% por 18 horas. Los ovocitos maduros fueron fertilizados en gotas independientes según el protocolo de estimulación utilizado.

### Cultivo in vitro (CIV).

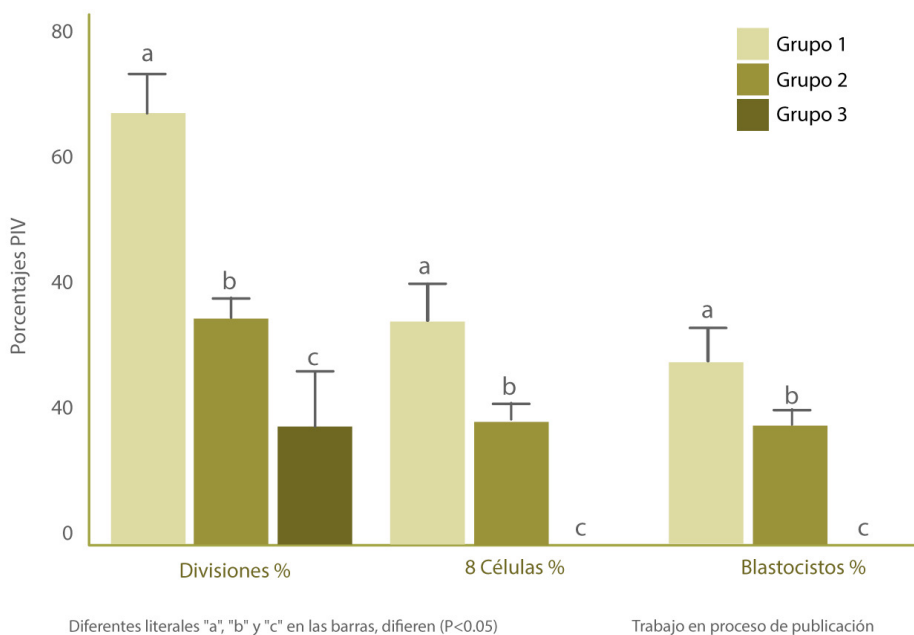
Después de 18 horas de iniciada la FIV, los presuntos cigotos fueron desnudados y cultivados in vitro en pozos con 500 µL de medio de cultivo en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> a 38.5°C y con humedad del 100%. A las 56 horas de

iniciado el CIV se evaluaron los porcentajes de embriones divididos y de embriones de 8 células y permanecieron hasta el día 7 de CIV donde se evaluó el porcentaje de blastocistos obtenidos.

## Análisis estadístico.

Para cada grupo se evaluaron los porcentajes de divisiones, embriones de 8 células y blastocistos. Los datos fueron evaluados con el procedimiento ANOVA del paquete estadístico SAS versión 9.2. Las diferencias se consideraron significativas con un valor  $P < 0.05$ .

Grafica 1: Resumen de PIV en becerras prepúberes Holstein de 3 meses de edad utilizando semen SS-4M



## Resultados

Los porcentajes de divisiones fueron  $63.33\% \pm 2.12$ ,  $38.03\% \pm 2.8$  y  $14.28\% \pm 1.4$  para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. Para los embriones de 8 células los resultados para el grupo 1 fueron del  $33.33\% \pm 1.4$ , para el grupo 2 fue  $19.09\% \pm 0.7$  y para el grupo 3 fue  $0\% \pm 0$ . El porcentaje de blastocistos al día 7 para el grupo 1 fue de  $30\% \pm 2.4$ , para el grupo 2 fue  $19\% \pm$

$1.06$  y para el grupo 3 fue  $0\% \pm 0$ . Todos los grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para todas las variables analizadas (Gráfica 1).

## Discusión

En el caso del protocolo 1 podemos observar cómo al dar una estimulación continua durante dos días es suficiente para que los ovocitos de hembras prepúberes adquieran la competencia y logren resultados similares a los de un animal adulto tanto en el porcentaje de divisiones como en la producción de blastocistos. Esto puede deberse a que si bien las hembras prepúberes presentan ondas foliculares que llegan hasta el folículo antral, no tienen el estímulo de las gonadotropinas endógenas, ya que no tienen activo el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO), por lo que al ser estimulados con gonadotropinas exógenas pueden adquirir la competencia ovocitaria para generar blastocistos (Michalovich et al., 2018; Currin et al., 2021).

Con respecto al protocolo 2, se puede observar cómo al quitar una aplicación de FSH repercutió en reducir prácticamente a la mitad la tasa de fertilización del protocolo 2 con respecto al protocolo 1, esto indica que los ovocitos de animales prepúberes requieren de una estimulación continua para adquirir competencia y poder llegar a formar un blastocisto

(Currin et al., 2017), pese a cambiar una aplicación de FSH por una dosis más alta de eCG.

El protocolo 3 presenta los peores resultados, aproximadamente la mitad del porcentaje de divisiones con respecto al protocolo 2 y prácticamente la cuarta parte de lo obtenido con el protocolo 1, lo cual repercute directamente en el porcentaje de embriones de 8 células y en el porcentaje blastocistos, que para ambos casos fue de 0%. Estos resultados pueden deberse a que cuando se colectaron los ovocitos, estos se veían expandidos, lo cual indica que esos ovocitos ya habían iniciado el proceso de maduración, tal vez con este protocolo se deba aspirar en el día 4 en vez del día 5.

## Conclusiones

En conclusión, bajo las condiciones de este trabajo, el protocolo 1 utilizando becerras de 3 meses tuvo resultados similares de PIV comparado con lo que se obtiene con animales adultos con SS-4M. Se requiere de más investigación para desarrollar un protocolo de estimulación ovárica con menos aplicaciones, que lo haga más práctico, pero con eficiencia similar a la del protocolo 1.

## Referencias Bibliográficas

Fuente.

<https://www.ganaderia.com/destacado/produccion-in-vitro-de-embriones-sexados-mediante-aspiracion-de-ovocitos-por-laparoscopia-a-partir-de-becerras-de-3-meses-de-edad>

**Clic Fuente**

