



# ***Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyr y Holstein sobre la técnica de producción in vitro de embriones bovinos***

Héctor Javier Narváz

Universidad de Santander. Bucaramanga, Colombia  
Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias  
Programa de Medicina Veterinaria

Grupo de Investigación en Ciencias Agropecuarias – GICA.

Publicado en <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/efecto-grupo-genetico-vacas-t48602.htm>

**E**l objetivo del actual estudio fue evaluar el efecto del grupo genético de donadoras de ovocitos de las razas Gyr y Holstein sobre el desempeño en la técnica de producción in vitro de embriones.

Se utilizaron 12 vacas multíparas, no lactantes, seis de la raza Gyr

(*Bos indicus*) y seis de la raza Holstein (*Bos taurus*). Previo a la aplicación de la técnica de aspiración folicular, los animales fueron sometidos a sincronización del estro, mediante la administración de 3 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE, Tecnopec Ltda., Brasil), más la inserción de un implante

auricular de norgestomet (Crestar, Intervet, Brasil). La aspiración fue realizada siete días después del inicio del protocolo de sincronización. Los resultados determinaron que las vacas de la raza Gyr presentaron mayor número de folículos visualizados y de ovocitos recuperados, así como

mayor tasa de clivaje y de blastocistos en el día siete.

Estos resultados permiten considerar que la aplicación de la técnica de *producción in vitro de embriones* en la raza *Gyr* puede presentar mejor desempeño en ciertos parámetros en relación con la *Holstein*.

La utilización de la técnica de *aspiración folicular*, asociada a la *producción in vitro de embriones (ovum pick up-in vitro embryo production (OPU-PIV))*, es una biotecnología altamente difundida en el mundo, que permite aumentar el número de nacimientos por hembra, posibilitando una ganancia genética anual estimada de 2,5 % (*Vishwanath, 2003*).

Según la *Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS)*, en América del Sur fueron producidos, en el 2017, 450.613 embriones por la técnica de *producción in vitro*, consolidándose como la mayor región en el

mundo en producción de embriones por dicha técnica (*Viana, 2018*).

Existen múltiples factores que afectan los buenos resultados de los programas *OPU-PIV*, como la realización de la técnica en fase aleatoria del ciclo estral, la obtención de ovocitos con diferente grado de madurez (*Hendriksen et al., 2000; Vassena et al., 2003*), la variabilidad de la respuesta de los animales, así como la de los sistemas de cultivo *in vitro* empleados (*Loneragan & Fair, 2008*). La influencia de estos factores puede disminuir la competencia de los ovocitos para el desarrollo *in vitro*, afectando la producción y la calidad de los embriones, lo que causa pérdidas del material genético y pérdidas económicas en los programas *OPU-PIV* (*Ealy et al., 2019*). Se han desarrollado diversos trabajos con el objetivo de aumentar la eficiencia de la técnica de aspiración folicular asociada a la producción *in vitro* de embriones, a

través de la sincronización de la onda de crecimiento folicular junto a la aplicación de gonadotrofas; con ello, se busca mejorar la tasa de recuperación, la calidad de los ovocitos colectados y el número de embriones producidos (*Chaubal et al., 2007; Pfeifer et al., 2009; El-Sherry et al., 2010*).

Por esta razón, el objetivo del actual estudio fue evaluar el efecto del grupo genético de donadoras de las razas *Gyr* y *Holstein* sobre su desempeño en la aplicación de la técnica de *producción de embriones in vitro*.

## Materiales y métodos

Para la ejecución del actual trabajo de investigación fue adoptado el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, con la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993, y en el cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 87 de dicha Resolución.

# Este año es tu año. Multiplica tus becerros.

Diseña tus programas reproductivos con nuestros productos hormonales.



zoetis®

Este estudio fue desarrollado conforme los siguientes criterios: brindar los cuidados adecuados a los animales según su etología; evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas; evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos y reducción al mínimo indispensable del número de animales para garantizar la validez del estudio que se ha de realizar (Garcés & Giraldo, 2012).

### Selección de los animales

Fueron seleccionadas 12 vacas (*no lactantes y no gestantes*) de un grupo de donadoras, siendo seis hembras de la raza *Gyr* (*Bos indicus*) y seis de la raza *Holstein* (*Bos taurus*), con edades entre los 3 y los 7 años, con una condición corporal de 3,5 a 4,0 en la escala de 0 a 5 puntos, y tracto reproductivo normal a nivel estructural y funcional.

El estudio fue desarrollado bajo condiciones tropicales, con pasturas a base de *Brachiaria decumbens* Stapf y *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf (*Poaceae*), con suplementación

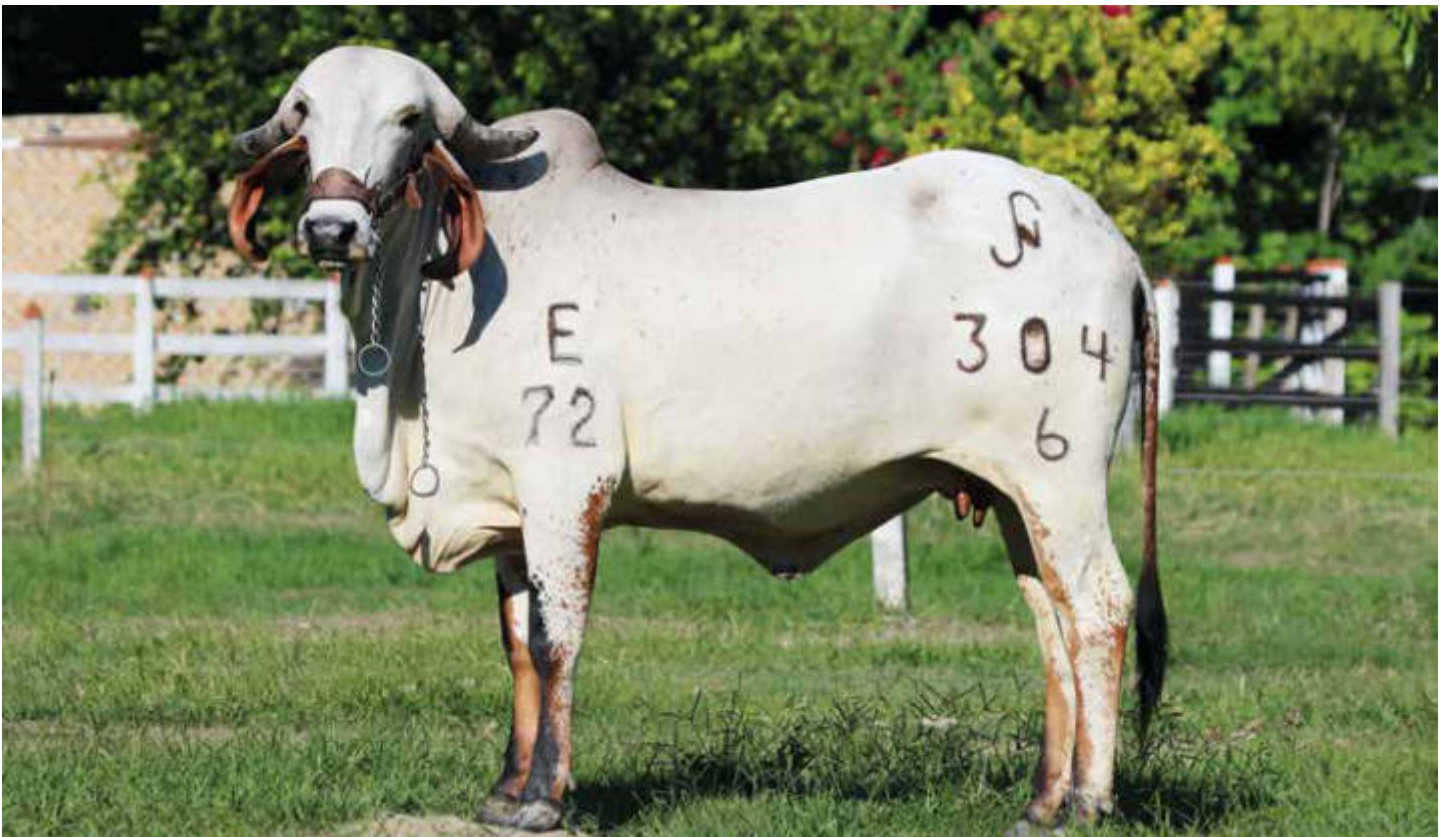
mineral, agua ad libitum y sin suplementación a base de concentrado.

### Aspiración folicular guiada por ecografía

Las donadoras fueron localizadas en dos grupos genéticos: *Gyr* y *Holstein*. Para la sincronización de la onda folicular se aplicó una dosis 3 mg de benzoato de estradiol (*RIC-BE, Tecnopec Ltda., Brasil*), más la inserción de un implante auricular de norgestomet (*Crestar, Intervet, Brasil*). El procedimiento de *OPU* fue realizado 7 días después del inicio del protocolo de sincronización, coincidiendo así con el inicio de la emergencia de la primera onda folicular y previo a la formación del folículo dominante. Los implantes auriculares fueron removidos 24 horas más tarde. La aspiración folicular fue realizada en folículos con un diámetro  $\geq 3$  mm a 5 mm y llevada a cabo con auxilio de una aguja descartable de 20 G (*WTA-Vet, Brasil*), acoplada a una línea de tón con presión negativa de 70 mm/Hg. Previamente al procedimiento

de aspiración se realizó el conteo de los folículos en ambos ovarios y se utilizó un ecógrafo (*Mindray, DP 2200 VET, China*), equipado con transductor microconvexo de 7,5 MHz de frecuencia, acoplado a una guía transvaginal para aspiración folicular.

Inmediatamente después de la punción, el líquido folicular fue transferido para un *lbro EmCom* (*Agtech, USA*), y adicionado 100 mL de D-PBS para remoción de los coágulos y células. Las estructuras fueron lavadas en TCM 199 tamponado con *HEPES* (*TCM-199; Gibco BRL, Grand Island, NY*), más 10 % de suero fetal bovino (*Gibco BRL, Grand Island, NY*), 16  $\mu\text{g/mL}$  de piruvato sódico y 83,4  $\mu\text{g/mL}$  de amikacina (*Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil*). Fueron considerados ovocitos viables para maduración *in vitro* los complejos cúmulo-ovocito (CCO) grado I, II y III, clasificados de acuerdo con la cantidad de capas de células del cúmulo y por el aspecto homogéneo del citoplasma. La clasificación de los CCO fue realizada conforme a lo descrito por *Sato et al.* (1990).



## Producción in vitro de embriones

Los CCO de cada donadora fueron lavados tres veces en gotas de 100  $\mu$ L de medio de lavado (TCM 199 suplementado con HEPES (25 mM) y 10 % de SFB) y transferidos separadamente para gotas de 100  $\mu$ L de medio TCM 199 y suplementado con 10 % de SFB, 1,0  $\mu$ g/mL de FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50  $\mu$ g/mL de hCG (Profasi, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0  $\mu$ g/mL de estradiol, 16  $\mu$ g/mL de piruvato sódico, ITS (5  $\mu$ g/mL de insulina - transferrina - selenio) y 83,4  $\mu$ g/mL de amikacina, cubiertas con aceite mineral estéril (Sigma-Aldrich Co, Estados Unidos). La maduración se realizó por un periodo de 24 horas en una incubadora a 38,5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico y 95 % de humedad.

Fue utilizado semen sexado de *Gyr* y de *Holstein* de una misma partida en ambas razas con fertilidad conocida. Las pajillas fueron descongeladas a 35 °C durante 30 segundos, y el contenido fue vertido cuidadosamente sobre el gradiente de Mini-Percoll 45/90. La dosis inseminante correspondiente para cada gota fue de  $1,0 \times 10^6$  espermatozoides/mL. El semen de la raza *Gyr* fue utilizado para la fertilización de los ovocitos de las vacas *Holstein*, y el semen de *Holstein* fue usado para la fecundación de los ovocitos de las vacas *Gyr*. Este protocolo de fertilización fue llevado a cabo con la finalidad de obtener embriones F1.

Después de la maduración, los CCO fueron lavados tres veces en gotas de 100  $\mu$ L de medio FERT-TALP y transferidos junto con los espermatozoides en gotas de 50  $\mu$ L de medio FERT-TALP, suplementado con 0,6 % de BSA, 10  $\mu$ g/mL de heparina, 18  $\mu$ M de penicilamina, 10  $\mu$ M de hipotaurina, 1,8  $\mu$ M de epinefrina y cubiertos con aceite mineral estéril. Los CCO permanecieron en cultivo junto con los espermatozoides por un periodo de 18 a 22 horas con las mismas condiciones empleadas en la maduración.

Después del periodo de fertilización, los presuntos cigotos fueron

transferidos separadamente por donadora para gotas de 100  $\mu$ L de medio SOF suplementado con 2,5 % de SFB y 5 mg/mL de BSA recubiertas con aceite mineral estéril por un periodo de 7 días. Tras 72 horas posfecundación, fue removido y sustituido el 50 % del volumen de cada gota de cultivo utilizando el mismo medio de cultivo citado anteriormente. En este momento fue evaluada la tasa de clivaje con la formación de dos células de los embriones en cultivo.

Siete días después de la fertilización fue cuantificada la tasa de blastocisto y valuada la calidad de los embriones de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (Stringfellow & Givens, 2010).

## Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ayuda del software *Analysis and Experimentation Group* (SAEG, versión 9.1), a través de la aplicación *Sistema para Análisis Estadísticas y Genéticas*. Fueron obtenidas las medias y error-estándar y analizados por ANOVA, considerando los efectos del grupo genético y, en los casos en que fue obtenido efecto significativo ( $p < 0,05$ ), fueron comparadas las medias por el test de Tukey.

## Resultados y discusión

Conforme a lo observado en la tabla 1, fue posible verificar diferencia

( $p < 0,05$ ) en las variables número de folículos visualizados, número de ovocitos recuperados, tasa de clivaje y número de blastocistos producidos en el día 7.

De acuerdo con estos resultados, fue posible verificar que el número de folículos visualizados fue mayor en las vacas de la raza *Gyr* ( $p = 0,0002$ ) que en las vacas *Holstein* ( $21,1 \pm 0,7$  vs.  $15,7 \pm 0,6$ , respectivamente). Los mecanismos asociados a esta característica están relacionados con mayores concentraciones circulantes de IGF-1 e insulina en razas cebuinas (Alvarez et al., 2000). Sales (2011) relató que vacas *Bos indicus* presentaron mayores concentraciones de IGF-1 en el líquido folicular, siendo esta característica relacionada con mayor calidad ovocitaria y mejor desarrollo embrionario en las fases iniciales de la técnica. Más recientemente, Mossa et al. (2017) y Tavares et al. (2018) correlacionaron que aquellos animales con alta población folicular presentan niveles elevados de la hormona antimülleriana, siendo sugerido que esta hormona es un factor predictivo de la alta población folicular y fertilidad. Otros relatos de literatura indican que la menor población folicular presentada en las razas *Bos taurus* está asociada a las altas tasas de atresia folicular en comparación con hembras *Bos indicus* (Silva-Santos et al., 2011).

En un estudio realizado en vacas *Gyr*, sometidas a una o dos

**Tabla. 1.** Efecto del grupo genético de acuerdo con la aplicación de la técnica de aspiración folicular y producción in vitro de embriones en vacas de las razas *Gyr* y *Holstein*

Variabes	Vacas <i>Gyr</i> (n = 6)	Vacas <i>Holstein</i> (n = 6)	Valor de p
N.º réplicas	6	6	-
N.º folículos visualizados	21,1 <sup>a</sup> ± 0,7	15,7 <sup>b</sup> ± 0,6	0,0002
N.º ovocitos recuperados	12,7 <sup>a</sup> ± 1,1	8,2 <sup>b</sup> ± 0,7	0,0013
Tasa de recuperación (%)	60,1 ± 5,0	52,2 ± 4,4	0,28
Ovocitos grado I (%)	20,3 ± 0,4	22,6 ± 0,3	0,45
Ovocitos grado II (%)	27,2 ± 0,3	23,0 ± 0,3	0,19
Ovocitos grado III (%)	24,6 ± 0,4	19,9 ± 0,3	0,13
Tasa de ovocitos viables (%)	70,8 ± 3,6	67,0 ± 3,7	0,86
Tasa de clivaje (%)	81,8 <sup>a</sup> ± 3,5	68,7 <sup>b</sup> ± 4,5	0,02
N.º blastocistos día 7 (D7)	3,6 <sup>a</sup> ± 0,5	2,3 <sup>b</sup> ± 0,4	0,03
Tasa de blastocisto (%)	40,2 ± 4,7	32,4 ± 5,5	0,28

**Nota.** Los datos están descritos como media ± ESM; a, b: letras minúsculas distintas en la misma línea diferente entre si ( $p < 0,05$ ).

**Fuente:** Elaboración propia

aspiraciones por semana, el número de folículos visualizados en cada sesión de aspiración se mantuvo en rangos de  $14,0 \pm 0,3$  a  $14,5 \pm 0,3$  (Viana et al., 2004). Carvalho et al. (2008) demostraron que novillas *Bos indicus* presentaron mayor número de folículos reclutados ( $33,4 \pm 3,2$ ) en relación con novillas *Bos indicus* x *Bos taurus* y *Bos taurus* ( $29,6 \pm 2,5$  y  $25,4 \pm 2,5$ , respectivamente).

Al llevar a cabo el análisis, fue posible comprobar que el número de ovocitos recuperados en las vacas *Gyr* fue mayor que en la raza *Holstein*. Estos resultados son similares a los descritos en la literatura por Galli et al. (2001), Tamassia et al. (2003), Torres-Júnior et al. (2008) y Viana et al. (2004, 2010).

En un estudio realizado en vacas de raza *Holstein* se recuperaron de media  $4,6 \pm 0,2$  ovocitos por sesión de OPU (Tamassia et al., 2003). No obstante, en un estudio posterior realizado en novillas *Holstein* (Gimenes, 2010), fueron obtenidos resultados divergentes a los observados en el actual trabajo, en el que fueron recuperados  $13,8 \pm 1,8$ ,  $16,2 \pm 2,2$  y  $16,2 \pm 2,3$  estructuras en los días 1, 3 y 5 después de la emergencia de la onda folicular, respectivamente. De manera similar, Pontes et al. (2010) recuperaron  $11,4 \pm 3,9$  ovocitos en promedio en animales del mismo grupo genético.

Contrariamente a todos los resultados citados, Dayan (2001) obtuvo mayor número de ovocitos recuperados en vacas de raza *Holstein* en relación con vacas de la raza *Gyr* ( $8,0 \pm 1,6$  vs.  $4,8 \pm 3,5$ , respectivamente). El autor relata que la técnica de aspiración folicular fue realizada en día aleatorio del ciclo estral, siendo aspiradas vacas cíclicas y acíclicas.

A pesar de que los resultados obtenidos en cuanto a calidad ovocitaria (grados I, II y III) fueron similares en ambos grupos genéticos, es importante destacar que en el actual estudio fueron considerados los grados II y III de calidad para los procedimientos de la producción in vitro de embriones. Estudios recientes han verificado que estas estructuras parecen tener la misma capacidad de desarrollo que los considerados morfológicamente normales (grado I) (Urrego et al., 2015; Velez et al., 2017).

En cuanto al número de ovocitos viables, la raza *Gyr* presentó valores superiores a las vacas *Holstein*, diferencia que probablemente sea una característica inherente de las razas *Bos indicus*, dado que, a mayor número de folículos visualizados, mayor puede ser el número de ovocitos de buena calidad recuperados. Estas observaciones del actual estudio coinciden con lo anteriormente descrito por Gimenes (2010) y Pontes et al. (2010).

Con relación a las tasas de clivaje, fueron obtenidos mejores resultados en las vacas *Gyr* respecto de las vacas *Holstein*. Estas observaciones pueden estar relacionadas con la calidad ovocitaria y con la capacidad de estas estructuras en presentar una adecuada maduración nuclear y citoplasmática, además de la calidad del semen utilizado. No obstante, Tamassia et al. (2003) relataron que las tasas de clivaje presentan una correlación positiva ( $r = 0,39$ ;  $p < 0,01$ ) respecto de las tasas de blastocistos. Estos relatos son divergentes a los observados en el actual estudio, en donde las altas tasas de clivaje presentadas no influenciaron las tasas de blastocistos obtenidas.

Ya en el número de blastocistos producidos siete días después de la fertilización, las hembras de la raza *Gyr* presentaron diferencia respecto a las vacas *Holstein* ( $3,6 \pm 0,5$  vs.  $2,1 \pm 0,4$ , respectivamente). Otros estudios han observado que embriones de razas *B. taurus* presentan mayor estrés térmico en la fase de cultivo in vitro, conllevando mayores tasas de apoptosis frente a las razas *Bos indicus* (Satrapa, 2011). A pesar de que en el actual estudio los embriones de las vacas *Holstein* fueron inseminados con toros *Gyr*, se considera que los ovocitos son más importantes que los espermatozoides en el desarrollo de la termotolerancia (Nabhan et al., 2010). Gimenes (2010) comprobó mejor desempeño de las razas *Bos indicus* en la producción in vitro de embriones, con respecto a las razas taurinas.

## Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que vacas de la raza *Gyr* presentan mejor respuesta en lo referente a número de folículos visualizados, número de ovocitos recuperados y producción de blastocistos siete días después de la fertilización, al ser comparadas con vacas de la raza *Holstein*.

**Referencias bibliográficas en:** <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/efecto-grupo-genetico-vacas-t48602.htm> 6

