

Evaluación del proceso de fertilización *in vitro* en ganado bovino (*Bos taurus*) en el altiplano del municipio de Batallas

Gisela Chambi Rojas; Saúl Quisbert Chambilla

Universidad Católica Boliviana “San Pablo”

E-mail de contacto: gisela.chambi.rojas@gmail.com

Resumen. El trabajo de investigación fue desarrollado sobre el proceso de fecundación *in vitro* para la obtención de embriones, en la región del altiplano del departamento de La Paz. El trabajo fue realizado con dispositivos no convencionales, con incubadoras de CO₂ portables, comprobadas para la obtención de embriones. Se realizó desde la colección de ovarios obtenidos del matadero, hasta la selección, maduración, fertilización y cultivo *in vitro*. Se colectaron 276 ovarios y se recuperó 652 ovocitos, 298 óvulos maduraron y se fertilizaron 155 denominándolos *presuntos cigotos*. El desarrollo de los embriones fue de 21 células viables para su transferencia, estos se desarrollaron con las características deseadas. El análisis de los resultados fue descriptivo, determinando un 66.26% de ovocitos viables, de los cuales maduraron 68.98% y se fertilizaron un 62.01%, logrando un 38.18% de embriones viables, en estado de blastocito.

Palabras clave: Maduración; Fertilización, Cultivo *in vitro*; Embriones

Introducción

Se estima que las regiones altiplánicas los cambios climatológicos han limitado el desarrollo del avance productivo en la ganadería bovina.

Por otra parte, se conoce que existen factores que no limitan el desarrollo de biotecnologías reproductivas, las cuales van desarrollándose con el transcurso del tiempo, dando un beneficio al desarrollo productivo en Sudamérica. Al igual que la variedad de biotecnologías reproductivas, la fertilización *in vitro* se va desarrollando desde el punto de vista investigativo en zonas altiplánicas en América Latina.

En el Altiplano Boliviano existe un desarrollo en la producción ganadera y es evidente la importancia de la crianza de animales de producción.

La ganadería que existe en la región, está conformada por animales mestizos adaptados a climas fríos, donde se considera su rusticidad como ventaja para el avance reproductivo, por lo cual es importante rescatar el material genético de padres adaptados a las condiciones ambientales con características productivas, vigor híbrido, adaptabilidad y fertilidad, esto da lugar, al mismo tiempo, a que se logre enfrentar el *mal de altura* que es una limitante para la expresión de estos animales, dando paso sobre el desarrollo de la fertilización *in vitro*, con el propósito de obtener la multiplicación de embriones viables, con una evaluación sobre su desarrollo, desde su origen de colecta, obtención, desarrollo y resultado de las células cultivadas *in vitro*.

La fertilización *in vitro* (FIV), es una metodología realizada dentro de un laboratorio, donde una vez obtenido el mate-

rial biológico y colectadas las células, se inicia el desarrollo, donde el ovocito maduro se expone al espermatozoide previamente capacitado para que se produzca la fecundación, proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural (Lorenzo 1994; García y Martínez 2013).

En el desarrollo permite evaluar eficazmente la capacidad de desarrollo embrionario, que es evaluado en estadios de mórulas y blastocito, para posteriormente transferirlos a vacas sincronizadas y seleccionadas (Quintana *et al.* 2012).

Materiales y métodos

Localización

El trabajo de investigación se desarrolló en la *Universidad Católica Boliviana "San Pablo"*, Unidad Académica de Batallas, Laboratorio de Reproducción Animal (Centro de Mejoramiento Genético del Altiplano), en la tercera sección municipal de la provincia Los Andes del departamento de La Paz, a una altura de 3.860 msnm.

La recolección de muestras se tomó en el *Matadero Municipal "Los Andes"* de la ciudad de El Alto.

Procedimiento

El material biológico se obtuvo directamente después del sacrificio de los animales en el matadero, realizando una incisión transversal de los ovarios. Para su transporte, éstos se almacenaron a una temperatura constante de 34°C a 38.5°C.

Medio de lavado y manipulación de ovarios

Para el lavado se preparó una solución con los siguientes componentes:

- Solución salina estéril (NaCl al 0.9 %)
- Antibióticos (penicilamina y estreptomycin)

Estos componentes se combinaron siendo atemperados a 38.5°C, en *baño maría*.

Se depositaron los ovarios en un vaso de precipitados de 250 ml, atemperado en *baño maría* a 38.5°C, donde se incorporó los ovarios con la ayuda de una pinza hemostática curva; se procedió a adherir solución salina estéril. Este procedimiento se aplicó tres veces a fin de tener los ovarios libres de presencias extrañas y restos sanguinolentos, dando a los mismos condiciones asépticas aceptables.

Medio de lavado y obtención de ovocitos

Para la obtención de ovocitos se desarrolló la técnica de *aspiración folicular*, obteniendo el líquido folicular bovino y los ovocitos en su interior. Al obtener dos soluciones viables y propias, se procedió a conservar bajo un *baño maría* teniéndolas un tiempo de 15 minutos para lograr la sedimentación de los ovocitos. Con el sobrenadante se procedió a tratarlo como un medio de conservación y lavado.

El líquido folicular separado se centrifugó a 2500 rpm, obteniendo un compuesto libre de detritos y restos del complejo del óvulo cúmulos presentes en el medio; se agregó 3 µl (microlitros) de gentamicina como medio de barrera protectora de agentes extraños, considerándolo como un medio de lavado.

Armado y preparación de la incubadora portable de CO₂

Se utilizó la metodología, empleada por Suzuki *et al.* 1999, quienes desarrollaron avances con esta metodología en su obtención y desarrollo *in vitro*.

Se acondicionó un taper hermético de 600 ml con una bisagra de silicona de doble agarre, que dio un 100% de sellado y se pudo controlar en su interior el aire y soluciones líquidas.

El medio implementado no permitió la liberación ni el ingreso de gases combinados, evitando cualquier escape del mismo; con la sonda látex, se controló la vía de escape y el ingreso para la combinación de gases que se empleó en el desarrollo de todo el proceso.

Preparación del medio de maduración *in vitro* y evaluación del desarrollo de ovocitos maduros

Para la preparación del medio de maduración se utilizaron los siguientes componentes:

- Líquido folicular bovino (LFB)
- Hormona folículo estimulante (FSH)
- Hormona luteinizante (LH)
- Gentamicina

Los componentes preparados se homogenizaron y equilibraron en placas Petri; se atemperó durante 120 minutos. Posteriormente se trasladó a los ovocitos al medio de maduración, donde se depositaron en la base del interior de la incubadora portátil y se llevó a una temperatura constante de 38.5°C.

Pasadas las 24 horas del medio de maduración, se continuó con la evaluación morfológica del desarrollo de los óvulos maduros, donde se evaluó la expansión de las células de la granulosa y maduración citoplasmática, expresándose con una capa finamente delgada, la misma que da capacidad para la fecundación del ovocito.

Medio de fertilización y evaluación de la fecundación *in vitro*

Para el medio de fertilización se preparó una solución **Fert - Talp** conservada, primeramente nivelando su temperatura para luego agregar albúmina sérica (BSA), piruvato de sodio 1% y gentamicina en (solución stock); se niveló previamente y se preparó las gotas del medio de fertilización; se las cubrió con aceite mineral durante dos horas a una temperatura de 38.5°C, llevándola a la incubadora portable, la cual permite dar las funciones estables para el desarrollo.

Capacitación espermática - Técnica de *swin up* y evaluación

Para la fertilización *in vitro*, se utilizó semen congelado de toros de la raza Holstein. Para el medio de capacitación se procedió de similar manera que para el medio de fertilización, con la diferencia que se utilizó una **solución Sperm - Talp** conservada, primeramente nivelando su temperatura para luego agregar albúmina sérica (BSA), piruvato de sodio 1% y gentamicina en (solución stock). Se niveló previamente y se atemperó en un tubo cónico en el interior de un *baño maría* a una temperatura de 38.5°C.

Se procedió a extraer la pajueta de semen y se sumergió en el interior del *baño maría* con lo que se mantuvo a una temperatura de 38.5°C, por un tiempo de 30

segundos, posteriormente se cortaron ambos vértices de sellado y se depositó en el interior de la solución **Sperm - Talp** (medio de capacitación espermática) y se dejó en reposo de 1 hora en el interior del *baño marí*, protegido de la luz solar. Concluido el tiempo, en el medio **Sperm-Talp**, se retiró el sobrenadante; la solución restante se centrifugó a 25.000 rpm por 15 minutos a una temperatura constante de 38°C. En el sedimento rico de espermatozoides se agregó el medio **Fert-Talp** y se diluyó el componente para la capacitación respectiva, dando un reposo de 10 minutos en *baño maría* a 38°C.

Para la evaluación espermática se tomó una muestra y se observó -en microscopio con platina térmica- la motilidad espermática.

Fertilización in vitro

El medio de fertilización, preparado y acondicionado se extrajo del incubador estando bajo la placa térmica, se agregó el medio PHE (Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina), se volvió a introducir en la incubadora y se dejó acondicionar un tiempo de 10 minutos.

Pasado el tiempo, los ovocitos ya maduros se traspasaron al medio de fertilización, para dar paso a la inseminación y efectuar el encuentro del espermatozoide y ovocito.

El plato de cultivo que contenía el medio de fertilización, con los ovocitos maduros y espermatozoides capacitados, fue cuidadosamente introducido en la incubadora portátil, y se controló la temperatura a 38.5°C. Se tuvo un tiempo de 72 horas posterior a la fertilización *in vitro* para la formación de los primeros presuntos cigotos.

Medios de cultivo in vitro y su desarrollo

Para el medio de cultivo *in vitro* se utilizaron los siguientes componentes:

- Solución TCM-199 conservado
- Albumina sérica bovina (BSA)
- Piruvato de sodio

La solución del medio de cultivo *in vitro* ya preparada, se equilibró en un tiempo de 1 hora en una incubadora portátil; esto para llevar a cabo el intercambio de las células en desarrollo del medio de fertilización, al medio de cultivo ya equilibrado.

Para proceder con este intercambio y poder capacitar el desarrollo celular, se realizó el siguiente procedimiento:

- En un tubo cónico se vertió la solución TCM-199, y se atemperó en baño maría a 38.5°C durante 15 minutos.
- Posteriormente se tomó la incubadora portátil donde se encontraba la caja Petri de la fertilización donde se desarrollaron las células y con la ayuda de un tip, se tomó a los presuntos cigotos y se los depositó en la base del tubo cónico ya atemperado con la solución TCM-199; se vortizó a velocidad máxima por 45 segundos, para el desprendimiento de las células de la granulosa.
- Los presuntos cigotos ya vortizados se los depositó en un plato de cultivo atemperado y se continuó con la evaluación morfológica.
- Posteriormente se trasladaron los cigotos al medio de cultivo ya equilibrado y se los llevó a la incubadora portátil para continuar con su desarrollo embrionario. El cambio de medio

se realizó a las 48 horas después de su fertilización, y con posterioridad se cambió el medio a las 24 horas durante 7 a 8 días. Los embriones fueron evaluados a las 72 horas post fertilización.

Análisis estadístico

Para el análisis se utilizó estadística descriptiva mediante una hoja de cálculo (en Excel[®]), construyendo tablas y gráficos desarrollados para los porcentajes totales.

Resultados y discusión

a) OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE OVOCITOS

Determinación de los porcentajes de ovocitos rescatados del ovario a partir de vacas post-mortem y seleccionados para la adaptabilidad en el proceso de fertilización in vitro

En el Cuadro 1 se valora la obtención de ovarios y el total de ovocitos obtenidos y seleccionados por categoría.

Cuadro 1. Sumas totales de ovocitos porcentajes y promedio por ovario de acuerdo a su clasificación

Estado	Número
Ovarios	276
Ovocitos categoría A	182
Ovocitos categoría B	250
Ovocitos categoría C	220
Total de ovocitos	652

De los 276 ovarios colectados se recuperó 652 ovocitos que se seleccionaron de acuerdo a sus respectivas categorías (A, B y C). Se obtuvo 182 ovocitos de categoría A, 250 ovocitos de categoría B y 220 ovocitos de categoría C. Estos se

seleccionaron de acuerdo a su evaluación morfológica, logrando obtener por ovario, un promedio de 2.36 ovocitos.

Kandil *et al.* (1999) describen un promedio de 2,3 a 2,4 de obtención de ovocitos por ovario. Gonzales *et al.* (1992) lograron obtener un total de 385 ovocitos considerando como el 100% de su estudio; donde obtuvo 156 ovocitos en la categoría A (48,3%), 186 en categoría B (48,3%) y 42 en categoría C (10,9%), logrando obtener, por ovario, un promedio de 3.8 ovocitos por la técnica de aspiración folicular. En su estudio no se tomó en cuenta folículos primarios ni folículos dominantes, esto por no presentar capacidad de desarrollo para su procedimiento.

Viabilidad de ovocitos seleccionados a partir de vacas post-mortem

Se consideraron viables a los ovocitos de categorías A y B, que juntos expresaron un 66.26%, un 33.74 % se descartó por no presentar desarrollo celular (los de categoría C).

b) MADURACIÓN DE OVOCITOS SELECCIONADOS

Evaluación del porcentaje de ovocitos madurados por el proceso de fertilización in vitro obtenidos con incubadoras portables de CO₂

Se contaron 432 ovocitos de los cuales 298 lograron madurar; los restantes 134 ovocitos manifestaron inmadurez.

En el Cuadro 2 se valora la cantidad -en unidades y porcentaje- de obtención de ovocitos viables para la maduración y los que no fueron viables durante el desarrollo celular.

Cuadro 2. Evaluación total y porcentaje de la maduración *in vitro*

Cantidad	OVULOS VIABLES (MIV)	OVOCITOS MADUROS	OVOCITOS NO MADUROS
Unidad	432	298	134
Porcentajes	100.00%	68,98%	31,02%

En el presente estudio se llegó a un resultado de 68.98% de ovocitos maduros y un 31.02% que no lograron madurar. La obtención de estos resultados fueron desarrollados bajo el efecto de las incubadoras portables de CO₂, que cumplen una función para brindar las condiciones viables para su desarrollo.

Según Suzuki *et al.* (1999), la maduración de ovocitos bovinos en incubadoras portables de CO₂, brinda un porcentaje de maduración del 58.5% bajo el efecto de la presión negativa de las incubadoras portátiles.

c) FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS

Byrd *et al.* (1996) señalan que la fertilización *in vitro* de ovocitos ovinos, en incubadoras portables, fue de 44.09%. Gonzales *et al.* (1992), reportan que realizando la maduración en bolsas gaseadas, lograron un 34.6% de tasa de fertilización. En otro trabajo realizado por Santa Cruz *et al.* (2013) se obtuvo con medio PVP, un 58.4% de fertilización.

Determinación del porcentaje de adaptabilidad del proceso de fertilización in vitro, utilizando incubadoras portables de CO₂

Para el siguiente paso sobre el desarrollo de la fertilización *in vitro*, se consideró su evaluación a base de los ovocitos maduros, de los cuales se obtuvo un 68.98%, de éstos se llegaron a fecundar un 62.01%.

Estos resultados se expresaron en un tiempo de desarrollo posterior a 72 horas, demostrando en el tiempo respectivo, reacciones y cambios morfológicos sobre las células de los presuntos cigotos, esto a partir del encuentro entre el ovocito y espermatozoide.

d) DESARROLLO DEL CULTIVO EMBRIONARIO

Evaluación del porcentaje del desarrollo embrionario bajo el efecto de incubadoras portables de CO₂

Se consideró viables a aquellas células que llegaron a desarrollarse hasta la fase de mórulas, alcanzando éstas una proporción de 57.89% que lograron dividirse, llegando a un 38.18% que concluyeron su viabilidad hasta la fase de blastocito, considerándolas aptas para la transferencia.

Similares resultados son reportados por Kandil *et al.* (1999) quienes obtuvieron un 48.8% de células en división celular (mórulas) llegando a colectar una tasa de 37.1% de viabilidad de embriones, en fase de blastocitos.

Asimismo, un trabajo realizado por Suzuki *et al.* 1999, con incubadoras portables de CO₂, señala un porcentaje de 29.6% de viabilidad de blastocitos, esto con el fin de probar el efecto del desarrollo de las incubadoras portables de CO₂. Los resultados obtenidos, demuestran la efectividad de la utilización de incubado-

ras portables de CO₂, en la obtención de embriones viables para la transferencia correspondiente.

Conclusiones

- Se alcanzó un elevado porcentaje de recuperación de ovocitos en las categorías A y B, llegando a un 66.26%. Los ovocitos de ambas categorías seleccionadas (A y B), mostraron las características deseadas de acuerdo a su expresión viable ante la respuesta para su desarrollo.
- Se consideró como el 100% al total de ovocitos seleccionados, siendo de categorías (A y B) quienes tuvieron un desarrollo en la maduración *in vitro*, logrando obtener un 68.98%, donde expresaron una expansión de las células de la granulosa con características morfológicas homogéneas. Por tanto, se expresó una respuesta del 62.01% del desarrollo sobre el encuentro del espermatozoide con el ovocito; el cual se evaluó a través de la respuesta en la división celular que se efectuó con posterioridad a las 72 horas.
- Los embriones viables respondieron con un 38.18%, los cuales fueron aptos para la transferencia a animales óptimos, para su implantación y posterior desarrollo de la gestación.
- Los resultados obtenidos con la utilización de incubadoras portables de CO₂, lograron obtener un desarrollo celular que permite visualizar esta técnica, como una opción viable para apoyar al mejoramiento genético de bovinos en el Altiplano Boliviano.

Referencias citadas

- Byrd S., Flores F., Aplewhite A., Westhusin M. 1996. *In vitro* maturation of ovine oocyte in a portable incubator. Department of Veterinary Physiology and Pharmacology. Texas A&M University. *Theriogenology* 47:857-854.
- García J., Martínez J. 2013. Implementación de un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Universidad Zamorano, Carrera de Agronomía y Veterinaria. Francisco Morazán, Honduras. 34 p.
- Gonzales, R.; E. Soto; N. Delgado; G. Portillo; A. Ondiz; J. Velarde. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovino mestizos sacrificados. *Revista Científica FCV de LUZ*. Vol II N° 2. 3 p.
- Kandil O., Abdoon A., Murakami M., Otoi T, Suzuki T. 1999. New technique, using a portable incubator, for the production of *in vitro* fertilized egyptian buffalo embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 45(5), 1-6. *En línea*. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_13
- Lorenzo P. 1994. Fecundación y desarrollo embrionario temprano. **En:** Reproducción de los animales domésticos. Cap 6. Madrid: Ed. Aedos. p 182-187. *En línea*. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/36_Evaluacion_fertilidad_in_vitro.pdf

- Quintana M., Campos P., Herrera P., Gallego C., Padrón E. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* (FIV) obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. Revista de Salud Animal vol. 34 Nro. 1: 53-56. La Habana, Cuba. *En línea*. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n1/rsa08112.pdf>
Consultado en enero de 2023.
- Santa Cruz C., Huanca W., Condori P., Ampuero B. 2013. Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos. Rev. Inv. Vet. Perú. 25(4): 487-493.
- Suzuki T., Sumantri C., Khan N., Murakami M., Saha S. 1999. Development of a simple portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. Animal Reproduction Science. 54 (3) 149-157. *En línea*. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00134-1)