

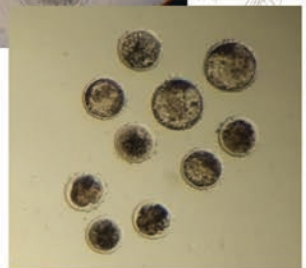
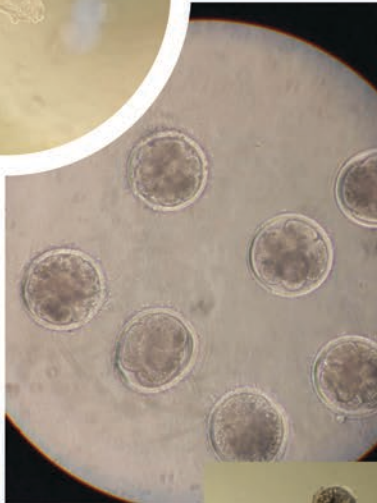
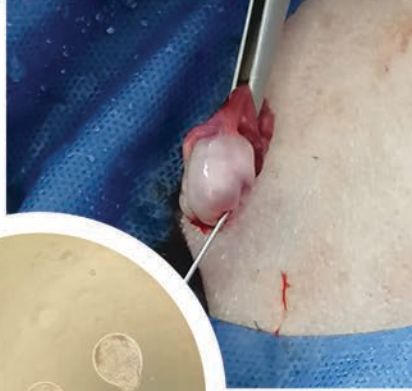
Compiladores

Alfredo Trejo Córdova

Demetrio Ambríz García

María del Carmen Navarro Maldonado

Bárbara Vargas Miranda



Avances en la reproducción y conservación de mamíferos domésticos y silvestres



Avances en la reproducción y conservación de mamíferos domésticos y silvestres

Alfredo Trejo Córdova
Demetrio Ambríz García
María del Carmen Navarro Maldonado
Bárbara Vargas Miranda

Compiladores



Dr. José Antonio de los Reyes Heredia
RECTOR GENERAL

Dra. Norma Rondero López
SECRETARIA GENERAL

UNIDAD IZTAPALAPA

Dra. Verónica Medina Bañuelos
RECTORA DE UNIDAD

Dr. Javier Rodríguez Lagunas
SECRETARIO DE UNIDAD

Dr. José Luis Gómez Olivares
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Dr. Fernando Rivera Cabrera
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Edith Arenas Rios
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Dr. Rodolfo Palma Rojo
COORDINADOR DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
JEFE DE LA SECCIÓN DE PRODUCCIÓN EDITORIAL

Avances en la reproducción y conservación de mamíferos domésticos y silvestres

Primera Edición: 2023
ISBN: 978-607-28-3078-3

© UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1a Sección,
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310 CDMX, México

Impreso en México / *Printed in Mexico*

El contenido total de la obra aquí presentada fue sometida a un proceso riguroso de revisión por pares académicos (doble ciego). Las identidades de los revisores y autores se ocultaron entre sí a lo largo de la revisión.

ÍNDICE

Prólogo	7
Capítulo 1. Aplicaciones moleculares y genómicas con variables reproductivas en ovinos	9
Capítulo 2. División de embriones. Una nueva visión de una biotecnología reproductiva olvidada	31
Capítulo 3. Evaluación de la capacidad de desarrollo de embriones producidos <i>in vitro</i> a partir de ovocitos provenientes de especies <i>Bos taurus indicus</i> y <i>Bos taurus taurus</i>	47
Capítulo 4. Producción <i>in vitro</i> de embriones ovinos en México	61
Capítulo 5. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos con semen SexedULTRA-4M™: Investigaciones realizadas en México	77
Capítulo 6. Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en ovino de Pelo	93
Capítulo 7. Monitoreo hormonal no invasivo como una herramienta dentro de los programas de reproducción en fauna silvestre bajo cuidado humano	111
Capítulo 8. Estado actual de la clonación en ovinos	125

Capítulo 9.

Uso potencial de nanopartículas en la producción animal	143
---	-----

Capítulo 10.

Uso de las técnicas de reproducción asistida para el estudio de la mutación SLICK en el receptor de prolactina (PRLR) – una alternativa para reducir las consecuencias negativas del estrés calórico en ganado bovino	157
---	-----

Capítulo 11.

Investigación sobre la producción de embriones bovinos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana	179
---	-----

Prólogo

Sometido para su publicación en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa, Convocatoria 2022.

El constante crecimiento de la población mexicana y la necesidad de cubrir las demandas de alimentos de origen animal en cantidad y calidad, hacen de la producción animal, una acción prioritaria en los programas nacionales. Diversos organismos gubernamentales, a través de programas de apoyo al campo en materia agropecuaria, fortalecen a los productores y a la ciencia, para incursionar en la aplicación de biotecnologías tradicionales y de vanguardia, encaminadas a garantizar la obtención de productos y subproductos de origen animal para el abasto nacional, con el menor impacto ambiental posible y vinculados al bienestar animal. Tal es el caso de las biotecnologías para la reproducción animal asistida, para las que se otorgan apoyos gubernamentales a instancias de educación superior y centros de investigación, así como a empresas particulares de la ganadería, para avanzar en el conocimiento y en la aplicación de biotecnologías tradicionales y de frontera.

Por otro lado, la inminente extinción masiva de fauna silvestre, especialmente la ocurrida en los años recientes, es seriamente preocupante. Pese al avance en la ciencia y a la gran información generada, no sabemos con precisión muchos de los pormenores de la vida y trascendencia de los organismos con los que compartimos este planeta. Vemos con profunda preocupación, en este país megadiverso, cómo cada vez van siendo clasificados más organismos en la lista roja de especies en riesgo, o bien, cómo van pasando de una categoría de preocupación menor a mayor, dirigiéndose hacia la peor de todas, la categoría de extinción, y como los esfuerzos y apoyos para la conservación, muchas de las veces son insuficientes. Ejemplo de ello es el caso de la vaquita marina (*Phocoena sinus*), endémica del país, residente del Golfo de California y cuyas poblaciones han disminuido al grado de no tener la certeza de cuántos ejemplares realmente quedan.

Ante esta auténtica preocupación, nace el interés de este libro por compilar las diferentes biotecnologías que actualmente ya se aplican en nuestro país, en beneficio de la reproducción de animales domésticos para la producción, así como para la conservación de la fauna silvestre, tanto aquella destinada con fines de aprovechamiento, como la endémica en riesgo de extinción.

Es así como en este libro se encontrarán biotecnologías que se aplican desde el nivel molecular hasta su aplicación en el organismo complejo. De ahí que, los temas tratados son las aplicaciones moleculares y genómicas con variables reproductivas en ovinos domésticos, por ejemplo, técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en ovinos de pelo, el uso potencial de las nanopartículas en la producción animal, el uso de las técnicas de reproducción asistida para el estudio de la mutación del gen SLICK en el receptor de la hormona prolactina, como alternativa para reducir las consecuencias negativas del estrés calórico en el ganado bovino. Por otro lado, se encontrarán diversas biotecnologías para producir embriones de animales domésticos y silvestres, tales como: la producción de embriones bovinos, la producción *in vitro* de embriones ovinos en México, de embriones bovinos con semen SexedULTRA-4M™, la evaluación de la capacidad de desarrollo de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos provenientes de bovinos (*Bos indicus* y *Bos taurus*), la división de embriones de ovino, el estado actual de la clonación en ovinos y el monitoreo hormonal no invasivo en fauna silvestre bajo cuidado humano. Todos ellos, temas de frontera y con aplicación actual en el campo de la producción y la conservación animal.

Esperando que podamos contribuir en la ampliación del conocimiento científico en el campo de la reproducción y conservación de las especies, a la vez que generar dudas e inquietudes que motiven nuevas investigaciones y aplicaciones de biotecnologías, es que dejamos en sus manos este libro.

Que lo disfruten:
Los compiladores

CAPÍTULO 1

Aplicaciones moleculares y genómicas con variables reproductivas en ovinos

César Cortez Romero^{1,2*}, Juan Salazar Ortiz³, Jaime Gallegos Sánchez², María del Carmen Navarro Maldonado⁴, Demetrio Alonso Ambríz García⁴

Resumen

La incorporación de países en vías de desarrollo a mercados internacionales requiere que la industria ovina, sea competitiva y acorde con las exigencias creadas por las economías de países desarrollados. Esto demanda un cambio en la productividad que permita un aumento en la competitividad de productos de origen animal de alta calidad e inocuos. El objetivo de la presente revisión es mostrar las bases de las principales biotecnologías reproductivas, moleculares y genómicas aplicadas a las variables reproductivas para elevar la productividad en ovinos. Uno de los instrumentos disponibles para lograr esta competitividad es la aplicación de la biotecnología genómica y molecular en la actividad ovina y sus componentes al servicio de la industria misma. La identificación y la descripción de las variantes genéticas en los genes de la fecundidad implicadas en la foliculogénesis y la fecundación, en particular la

¹ Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí. Innovación en Manejo de Recursos Naturales. Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, 78600, San Luis Potosí, México.

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Estado de México, México.

³ Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Innovación Agroalimentaria Sustentable. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

⁴ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1ª Sección, Alcaldía Iztapalapa, CP 09310. Ciudad de México, México.

* Autor de correspondencia: ccortez@colpos.mx

mutación *FecG^E* del Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (*GDF9*), permitirá incrementar la tasa ovulatoria y la prolificidad. Esto va a lograr potencializar el uso de las biotecnologías de reproducción asistida en el mejoramiento genético de la especie ovina, en particular la inseminación artificial (IA) y la ovulación múltiple y transferencia de embriones (OMTE), para obtener un mayor número de corderos por parto en la oveja y así incrementar la productividad en la unidad de producción (UP). De esta manera, se han establecido estrategias reproductivas y genómicas enfocadas para aumentar la productividad y la calidad del sistema producto ovino, con el fin de competir en los mercados internacionales, a través de la creación de programas nacionales de mejoramiento genético destinados al crecimiento y desarrollo de esta actividad.

Palabras clave: Reproducción asistida, molecular, genómica, tecnologías del ADN.

Introducción

En los últimos años, el crecimiento de la población en el mundo está demandando mayor cantidad de alimentos de origen animal. A nivel mundial, la producción pecuaria está en constante crecimiento, propiciada por los retos y oportunidades que implica la globalización del comercio mundial. En particular, la actividad ovina requiere de un aumento en la competitividad. En México, la producción de ovinos es una actividad en constante crecimiento por su excelente adaptación a diferentes condiciones climáticas y buena demanda en el mercado de la carne. Sin embargo, para aprovechar estas ventajas es necesario incrementar el número de ovinos de elevado nivel genético y/o el rescate o conservación de razas locales adaptadas a la región, mediante aplicaciones biotecnológicas con buenos resultados y que reduzcan los costos de producción para los productores. Por lo tanto, se requiere desarrollar e implementar nuevas tecnologías, principalmente aquellas basadas en las biotecnologías de reproducción asistida, herramientas moleculares y la genómica, para lograr una mayor productividad y rentabilidad de las UP de ovinos, índices que dependen de su eficiencia reproductiva. El uso de dichas biotecnologías de vanguardia ofrecerá nuevas oportunidades para el desarrollo de una producción ovina altamente competitiva a nivel mundial y sustentable en el tiem-

po. En este sentido, las herramientas genómicas abren un nuevo mundo de oportunidades en la actividad ovina, ya que las exportaciones de productos ovinos y sus derivados son, en general, el principal motor para el crecimiento de la producción ovina. Para fines de esta revisión, se muestran los elementos históricos y las bases de las principales biotecnologías moleculares y genómicas aplicadas en variables reproductivas, relacionadas con tasa ovulatoria y prolificidad, con el fin de potencializar el uso de las biotecnologías de reproducción asistida en el mejoramiento genético de la especie ovina.

Biotechnologías reproductivas

Entre las biotecnologías de reproducción asistida (**Cuadro 1**), las cuales tienen como objetivo permitir aumentar la eficiencia reproductiva y la tasa de mejoramiento genético de los ovinos, se tiene a la Inseminación Artificial (IA, 1908; primera generación, la cual surge con el principio de garantizar el aspecto sanitario. Posteriormente, se tienen a las técnicas de sincronización e inducción de estros, la OMTE, la congelación de embriones y semen, la bipartición y la transferencia de embriones (TE); el conocimiento del control hormonal en estas técnicas, permitió acortar el anestro posparto y el reinicio de la actividad reproductiva (Control hormonal, 1970; segunda generación). La siguiente generación fue el sexado de embriones y semen, y producción de embriones *in vitro* (FIV; 1980; tercera generación); luego surge la clonación o transferencia nuclear (producción asexual de un individuo idéntico al material nuclear con que se generó, el uso de las células somáticas; 1990; cuarta generación). Por último, el *gene farming* (producción industrial de proteínas con individuos vivos) y la *transgénesis* (transferencia de ADN-Ácido desoxirribonucleico- en una célula receptora y, la posterior integración y construcción de ese ADN en el genoma del organismo). Si la construcción génica se integra en el genoma del animal y expresa su función, se denomina a este “transgénico” y a la proteína codificada por el animal transgénico, “producto transgénico”; 2000; quinta generación (Thibier, 1990; Wilmut et al., 1997; Palma, 2008; Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014; Ugalde, 2014).

En el caso de las técnicas de IA, OMTE y TE, son biotecnologías reproductivas disponibles, viables y prácticas, que permiten la difusión más acelerada de la mejora genética de características deseables en los rebaños; es decir, una estrategia de gran utilidad en los programas de selección a partir de hembras y machos de alto valor genético. Estas técnicas, utilizadas desde mediados del siglo XX, han permitido hacer uso de material genético de alta calidad en todo el mundo con un impacto importante sobre la producción de leche y lácteos, y carne a través de importaciones de material genético probado.

Cuadro 1. Biotecnologías de reproducción asistida en ovinos.

Generación	Biotecnología reproductiva
Primera (1908)	Inseminación Artificial (IA)
Segunda (1970)	Sincronización e inducción de estros, ovulación múltiple y transferencia de embriones (OMTE), congelación de embriones y semen, la bipartición y la transferencia de embriones (TE)
Tercera (1980)	Producción de embriones <i>in vitro</i> (FIV) y sexado de embriones y semen
Cuarta (1990)	Clonación o transferencia nuclear (TN)
Quinta (2000)	<i>Gene farming</i> y transgénesis

No obstante, en la técnica de OMTE, la gran mayoría de las veces se enfrenta a un elevado costo, por lo cual es necesario buscar estrategias que disminuyan las desventajas de las herramientas antes mencionadas. Sin embargo, se debe considerar que hay varios factores que interfieren en la fertilidad de los ovinos con el uso de la OMTE y la TE. Aspectos relacionados con la raza, la edad, la variación individual de la respuesta fisiológica, la barrera cervical, la inducción y sincronización del estro en la oveja, condiciones climáticas, tipo de progesterona empleada, gonadotropina usada y el tipo de inseminación usada; al igual que aquellos relacionados al manejo, la selección de los carneros, la producción y calidad del semen, la variación entre individuos y los procesos de dilución-conservación del semen (Rubianes et al., 1997; González de Bulnes et al., 2002; Veiga-López et al., 2008).

Sincronización y ovulación múltiple

El proceso para la estimulación, el crecimiento y el desarrollo folicular se lleva a cabo mediante la aplicación exógena de gonadotropinas, tal es el caso de la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG). Sin embargo, la eCG puede tener efectos negativos en relación con la liberación de hormonas esteroides y las tasas de ovulación. Al igual, por las cantidades elevadas de estradiol, las cuales pueden interferir en la modificación del ambiente uterino, comprometer la captación de los ovocitos por las fimbrias y el transporte de los embriones a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (Evans y Robinson, 1980; Cognie, 1999), con menor sincronización en la ovulación de las hembras tratadas, debido al crecimiento folicular por un tiempo más largo (Cameron *et al.*, 1988). Se requiere esta sincronía con la finalidad de que la inseminación se realice para asegurar que los espermatozoides estén aptos para fecundar al óvulo liberado y en condiciones de ser fecundado (Pinna *et al.*, 2008).

El éxito que se puede lograr en un programa de OMTE en el mejoramiento genético en los ovinos depende, principalmente, de la respuesta individual al tratamiento de ovulación múltiple y a la sobrevivencia del embrión después de la transferencia. Por lo que son los dos factores más importantes en los programas de OMTE para mejorar los resultados de fertilidad, ya que un buen resultado en el número de embriones obtenidos está determinado por la sincronía entre el momento de la IA y la ovulación (Cognie, 1999; Veiga-López *et al.*, 2008), lo cual se puede mejorar con el uso de agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH; Menchaca *et al.*, 2009) o la adición de hormona luteinizante (LH; Oliveira *et al.*, 2012), a las 24 h posteriores al retiro del progestágeno (Azawi y Al-Mola, 2011). Estudios recientes demostraron mayor cantidad de embriones transferibles (5.83 ± 1.13 vs. 2.33 ± 1.43 ; $p \leq 0.05$; **Cuadro 2**; García-Salas *et al.*, 2017) y tasa ovulatoria (14.83 ± 5.77 vs. 7.33 ± 2.21 ; $p \leq 0.05$; Conde-Hinojosa *et al.*, 2014) con la aplicación de 200 mg de FSHp (Folltropin-V) comparado con 250 UI de FSH-LH (Pluset), respectivamente.

Cuadro 2. Tasa ovulatoria y producción de embriones en ovejas de la raza Pelibuey sujetas a diferentes protocolos de ovulación múltiple en época reproductiva.

Hormona	Tasa ovulatoria (media $\pm$ E.E)	Embriones transferibles (media $\pm$ E.E)
FSH	15.5 $\pm$ 2.83 ^a	15.83 $\pm$ 1.13 ^a
FSH + eCG	15.66 $\pm$ 1.47 ^a	2.66 $\pm$ 1.17 ^b
FSH/LH	8.16 $\pm$ 3.21 ^b	2.33 $\pm$ 1.43 ^b
FSH/LH + eCG	11.83 $\pm$ 2.83 ^b	2.83 $\pm$ 1.50 ^b

^{a, b} Letra diferente en la misma columna indica diferencia ($p \leq 0.05$; García-Salas et al., 2017). E.E. = error estándar.

En otras investigaciones, se reportan resultados de 5.5 ± 0.8 embriones transferibles cuando emplean FSHo (Ovagen) en ocho dosis decrecientes y 4.0 ± 0.8 embriones viables con 132 unidades de FSHo más 500 UI de eCG, aplicadas 48 h antes de la remoción de la esponja (Simonetti et al., 2008). Por su parte, Menchaca et al. (2009) reportaron 6.7 ± 0.5 embriones transferibles con 240 mg de FSHp y 5.2 ± 0.6 con la misma dosis de FSPp más la adición de 200 UI de eCG al retiro del CIDR. De esta manera, estudios reportan aumento en el número de cuerpos lúteos (CL) con la adición de GnRH, posterior a la remoción del progestágeno (Menchaca et al., 2009; Azawi y Al-Mola, 2011; Romero-Santillán et al., 2015). La adición de agonistas de GnRH ha demostrado el incremento en el número de embriones transferibles, Menchaca et al. (2009) reportaron 7.6 ± 0.6 y 5.8 ± 0.7 con GnRH y el grupo testigo, respectivamente. Por su parte, Romero-Santillán et al. (2015) reportaron menor cantidad de embriones transferibles (3.33 ± 1.05 vs 4.8 ± 1.65 , para grupo control y grupo con GnRH, respectivamente).

Otra de las alternativas que se ha empleado con la finalidad de reducir la variación en la sincronización de la ovulación y evaluar la res-

puesta del ovario en la cantidad de embriones transferibles en los tratamientos de ovulación múltiple, ha sido la adición de LH al finalizar el tratamiento de FSH (Oliveira et al., 2012). En este sentido, Pérez-López et al. (2014) reportan que la aplicación de LH a las 24 h posterior al retiro de progestágeno incrementó el número de embriones transferibles comparado con el grupo testigo (6.6 ± 0.6 vs. 3.5 ± 0.2 , respectivamente). Por lo tanto, el éxito en los programas de mejoramiento genético con el uso de las biotecnologías de reproducción asistida en la producción ovina se potencializa con el apoyo de las herramientas moleculares y genómicas aplicadas en las UP.

Biotechnologías moleculares

Los avances en la biotecnología molecular, en paralelo con los adelantos en la genética y las tecnologías reproductivas, proporcionan nuevos y eficaces instrumentos para seguir generando conocimiento e innovando nuevas alternativas de mejora genética en las UP del sistema ovino. De este modo, las tecnologías moleculares tienen diversas aplicaciones en la reproducción de ovinos, las cuales consideran los aspectos relevantes sobre: **a)** las tecnologías basadas en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y la sanidad; ya que las enfermedades reducen la productividad en las unidades de producción en los países en desarrollo y, su detección oportuna con técnicas moleculares y del ADN, podrían contribuir a mejorar la lucha contra las enfermedades, para estimular la producción de alimentos inocuos y el comercio de ovinos en pie. Y, **b)** las aplicaciones de las tecnologías basadas en el ADN a la genética y el mejoramiento; ofrecen grandes oportunidades para lograr sistemas de producción sostenibles y productivos, ya que casi todas las características de los ovinos de interés para la producción y la alimentación están determinadas por la interacción combinada de muchos genes con el ambiente (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Biotecnologías moleculares aplicadas en la reproducción de ovinos.

Clasificación	Aplicación de la biotecnología
Tecnologías basadas en el ADN y la sanidad	Pruebas de diagnóstico y epidemiología molecular.
	Elaboración de vacunas con recombinación del ADN.
Tecnologías basadas en el ADN a la genética y el mejoramiento	Riesgos sanitarios relacionados con el uso de las biotecnologías reproductivas.
	Caracterización de la variación genética y la conservación de la diversidad genética.
	Aumento del ritmo de mejoramiento genético de razas adaptadas a las condiciones locales.
	Control genético en variables reproductivas.

Para fines de esta revisión, se contempla el rol de las tecnologías basadas en el ADN a la genética y el mejoramiento genético, apoyado con la aportación de las biotecnologías reproductivas, las cuales son esenciales para mejorar el patrimonio genético de la especie ovina.

Tecnologías moleculares y genómicas en variables reproductivas

En la actualidad, en adición a la aplicación de las biotecnologías reproductivas en la mejora genética de los ovinos, con el avance de las investigaciones en la genética molecular para la evaluación de reproductores de interés genético, a través del análisis del ADN, principalmente con la caracterización de la secuencia de ADN, la selección asistida por genes (Genes Assisted Selection-GAS), el método de mapeo de intervalo (Quantitative Trait Loci-QTL; Lander y Botstein, 1989), el análisis del genoma, la determinación de polimorfismos, el diagnóstico y la identificación de características de importancia económica con la selección asistida por marcadores moleculares (*Markers Assisted Selection-MAS*, Cokett et al., 1999; Hanrahan et al., 2004) y la selección genómica (*Genomic Selection-GS*; Marshall et al., 2011), ha permitido el uso de la genotipificación, la secuenciación y las firmas de selección para detectar genes deseables en variables reproductivas y

productivas en la especie ovina. En particular, para identificar aquellos individuos portadores de genes relacionados con tasa ovulatoria, prolificidad o tipo de parto, calidad de carne y leche, resistencia o susceptibilidad a ciertas enfermedades, entre otras características; todo con el propósito de diseñar sistemas de mejora genética ovina. El uso de estas metodologías ayuda a identificar individuos portadores de un marcador para decidir su selección o eliminación según sea la característica probada y deseada. En general, con todas estas tecnologías de vanguardia, se puede potencialmente permitir una aportación en el mejoramiento genético por unidad de tiempo con el incremento de la intensidad de selección y la reducción del intervalo generacional con la información de selección de los ovinos.

En el caso de los polimorfismos de base única o simple (SNP) proporcionan información de la diferencia en una posición de un solo nucleótido, ya sea por sustituciones, deleciones o inserciones. Es pertinente mencionar que muchos de estos SNP se localizan en sitios de genes (codificantes), los cuales se asocian principalmente a enfermedades o aspectos relacionados con la expresión fenotípica (Aran-guren-Méndez *et al.*, 2005), donde su alta frecuencia en el genoma de cualquier individuo y su baja tasa de mutación, lo constituyen como una herramienta ideal para el estudio de poblaciones mediante la construcción de mapas genéticos. Así, el uso de marcadores moleculares puede contribuir a la restauración de poblaciones, en la toma de decisiones en programas de mejoramiento genético y, consecuentemente, para implementar estrategias de conservación genética más efectivas (Arif y Khan, 2009).

Control genético en variables reproductivas

La mayoría de las características de los animales de interés para la alimentación están determinadas por la interacción combinada de muchos genes con el ambiente. La mejora genética de razas adaptadas a las condiciones locales, es importante para conseguir sistemas sostenibles de producción. La reproducción en los ovinos juega un papel importante en la eficiencia y rentabilidad del rebaño. Esta eficiencia

se podría medir a través de la fertilidad y la prolificidad en la oveja a lo largo del año (Abdoli *et al.*, 2016), especie que ha demostrado ser un modelo animal ideal para dilucidar el efecto de los factores genéticos que intervienen en la función reproductiva.

Es relevante indicar que la oveja es una especie con características fisiológicas y reproductivas con una gran variabilidad en la respuesta de la tasa de ovulación y la prolificidad; ambas influidas por factores genéticos y por multitud de factores ambientales. En cuanto al control genético, estas variables están reguladas por un conjunto de genes de pequeño efecto (poligen) y por la acción de genes mayores que tienen un gran efecto sobre la tasa de ovulación; la cual es definida por el número de ovocitos liberados durante un ciclo reproductivo y está determinada por un complejo cambio de señales endócrinas entre la hipófisis y el ovario, y señales paracrinas y autocrinas entre factores de señalización dentro de los folículos, lo cual envuelve al ovocito y a sus células somáticas adyacentes, todas ellas controladas genéticamente (Galloway *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2001; McNatty *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). Cabe resaltar que el ovocito es la unidad funcional del ovario (Paulini y Melo, 2011) y para su desarrollo se requiere de una comunicación intrafolicular bidireccional con las células somáticas (Sanfins *et al.*, 2018). Se reporta que, durante la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, se expresan factores de crecimiento (GF) y proteínas morfogénicas (BMP) que inducen el desarrollo folicular a través de un intrincado proceso de señalización paracrina (Paulini y Melo, 2011; Sanfins *et al.*, 2018).

Se ha documentado que la variación en la respuesta de la tasa de ovulación y la prolificidad, está asociada a genes de efecto mayor que intervienen en la función ovárica de la oveja (Hanrahan *et al.*, 2004). Dentro de estos genes de la fecundidad, se encuentran el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (GDF9), la Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP15) y el receptor de Proteína Morfogénica Ósea tipo 1B (BMP-PR-1B), los cuales han sido identificados en diferentes razas de ovinos. Estos genes pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante tipo β (TGF β - Transforming Growth Factor β ; Wilson *et al.*, 2001; Hanrahan *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2011) y son altamente

expresados en el ovocito (Hanrahan et al., 2004; De Castro et al., 2016). Los TGF β regulan el desarrollo y madurez folicular, interactúan con las células del ovocito-granulosa y regulan los receptores a gonadotropinas, entre otras funciones corporales vitales (Hanrahan et al., 2004; Knight y Glister, 2006; Myers y Pangas, 2010). En el ovario de la oveja, el gen *GDF9* es producido exclusivamente por el ovocito (Bodensteiner et al., 1999); de esta manera, dicho gen y su ARNm se han identificado en los ovocitos en el momento de la formación de folículos y en todas las etapas del desarrollo folicular (McNatty et al., 2006). Con relación al efecto genético por parte de los genes de la fecundidad en ovinos, en particular el gen *GDF9*; una investigación reciente mostró ninguna diferencia significativa en los porcentajes de parición y tasa de prolificidad en ovejas sincronizadas de la raza Katahdin portadoras y no portadoras del gen *GDF9* ($p \geq 0.05$; Cuadro 4; Hernández-Rubio et al., 2023).

Sin embargo, estos resultados de la nula influencia del gen *GDF9* en el porcentaje de parición e índice de prolificidad en la oveja, sugieren investigar sobre el efecto de las mutaciones puntuales detectadas en dichos genes de la fecundidad en algunas razas de ovinos, las cuales están relacionadas con tasa ovulatoria y prolificidad. Así, el conocimiento referente a la identificación e influencia de las variantes genéticas reportadas en estos genes de la fecundidad permitirá comprender el control genético de mutaciones y genotipos en variables reproductivas de la oveja.

Cuadro 4. Porcentaje de parición y tasa de prolificidad en ovejas sincronizadas de la raza Katahdin con y sin gen *GDF9*.

Tratamiento	Parición (%)	Índice de prolificidad
Sin gen	77.8 ^a	1.3 ^a
Con gen	78.7 ^a	1.4 ^a

^a Literales idénticas en la misma columna indican que no hay diferencia estadística ($p \geq 0.05$).

Mutaciones en genes de la fecundidad relacionados con tasa ovulatoria y prolificidad

Recientes publicaciones han reportado que las mutaciones puntuales en los genes *BMP15*, *GDF9* y *BMPR-1B* pueden causar el incremento de la tasa de ovulación y prolificidad o por el contrario, presencia de estructuras ováricas anormales e infertilidad, por lo que son conocidos como genes de la fecundidad (Davis, 2005). En la especie ovina, se han descrito ocho fenotipos con mayor tasa de ovulación y prolificidad en diferentes razas asociados a genes mayores: 1) la proteína *BMP15*, la cual se encuentra en el cromosoma X: Inverdale (*FecX^I*), Hanna (*FecX^H*), Belclare (*FecX^B*), Galloway (*FecX^G*), Lacaune (*FecX^L*) y ROA (*FecX^R*); 2) el factor *GDF9*, una mutación en el cromosoma 5: High Fertility (*FecG^H*) y 3) el receptor *BMPR-1B* (*FecB*), que codifica el receptor BMP tipo 1B o activina kinasa 6 (*ALK6*), en el cromosoma 6 (mutación Booroola; Lahoz et al., 2011). Y en particular con el gen *GDF9*, se han reportado 11 mutaciones en la región codificante de dicho gen, pero solo siete afectan la tasa ovulatoria y el tamaño de la camada. Las mutaciones reportadas para este gen son: G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 o *FecG^H* (alta fertilidad, Hanrahan et al., 2004), *FecG^T* (Thoka, Nicol et al., 2009), *FecG^E* (Embrapa, Silva et al., 2010), *FecG^I* (Baluchi, Moradband et al., 2011), G7 o *FecG* (Oveja Blanca Noruega, Våge et al., 2013), *FecG^V* (Vecaria, Souza et al., 2014) y *FecG^A* (Araucana; Bravo et al., 2016).

En las razas Cambridge y Belclare, las ovejas con genotipo heterocigoto en la mutación incrementan su tasa ovulatoria; mientras que las ovejas homocigotas son infértiles, debido a la hipoplasia ovárica y fallas primarias en la foliculogénesis (Juengel et al., 2002; Hanrahan et al., 2004). De las variantes genéticas relacionadas con tasa ovulatoria y prolificidad, Silva et al. (2010) detectaron la mutación Embrapa (*FecG^E*) en el gen *GDF9* (**Cuadro 5**); en la cual, las ovejas de la raza Santa Inés con genotipo homocigoto mostraron valores significativos para tasa ovulatoria e índice de prolificidad ($p \leq 0.05$).

Cuadro 5. Tasa ovulatoria y prolificidad en genotipos de la mutación $FecG^E$ del gen $GDF9$ en ovejas de la raza Santa Inés.

Genotipo	Tasa ovulatoria (media $\pm$ E.E)	Prolificidad (media; intervalo)
+/+	1.22 $\pm$ 0.11 ^a	1.13; [1.11, 1.16] ^a
+/E	1.34 $\pm$ 0.08 ^a	1.44; [1.41, 1.48] ^b
E/E	2.22 $\pm$ 0.12 ^b	1.78; [1.69, 1.87] ^c

^{a, b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia ($p \leq 0.05$; Silva et al., 2010). E.E. = error estándar.

De igual manera, la mutación Embrapa ($FecG^E$) fue identificada en ovejas de la raza Pelibuey. No obstante, los autores no reportaron diferencias significativas entre los genotipos mutados, heterocigotos y silvestres de la variante para los valores de tasa ovulatoria y prolificidad (Escobar-Chaparro et al., 2017; Pérez-Ruiz et al., 2020; **Cuadro 6**).

Cuadro 6. Índice de prolificidad en genotipos de la mutación $FecG^E$ del gen $GDF9$ en ovejas de la raza Pelibuey.

Genotipo	Parto 1	Parto 2	Parto 3
E/E	2.25 ^a	2.25 ^a	2.21 ^a
E/+	1.77 ^a	2.01 ^a	1.58 ^a
+/+	1.60 ^a	1.52 ^a	1.58 ^a

^a Sin diferencias significativas ($p > 0.05$; Pérez-Ruiz et al., 2020).

Sin embargo, otro estudio reciente con ovejas de la raza Pelibuey, en estro natural y durante la época de anestro, demostró que el grupo de hembras (GG, homocigotas) portadoras de la mutación puntual Embrapa ($FecG^E$) en el gen $GDF9$ resultaron con mayor tasa ovulatoria e índice de prolificidad ($p \leq 0.05$; **Cuadro 7**; Muñoz-García et al., 2021).

Cuadro 7. Tasa ovulatoria y prolificidad en grupos de ovejas con la mutación *FecG^E* del gen *GDF9* en la raza Pelibuey (Media±E.E.).

Grupos	Tasa ovulatoria (media ± E.E)	Prolificidad (media ± E.E)
Embrapa (GG)	3.00 ± 0.18 ^a	2.1 ± 0.1 ^a
Silvestre (AA)	1.78 ± 0.15 ^b	1.4 ± 0.2 ^b
Sin gen (sG)	1.28 ± 0.16 ^b	1.4 ± 0.2 ^b

^{a, b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia ($p \leq 0.05$; Muñoz-García et al., 2021). E.E. = error estándar.

Finalmente, estos resultados de las mutaciones y variantes genéticas encontradas en los genes de fecundidad relacionadas con tasa ovulatoria y prolificidad en la oveja, representan una gran utilidad en la implementación de programas de mejoramiento genético, dirigidos para mejorar la eficiencia reproductiva y rentabilidad de los rebaños.

Conclusiones

La comprensión de los eventos fisiológicos y reproductivos en la oveja, con su respectivo control genético, apoyado de los avances de la biotecnología molecular y genómica para la búsqueda, identificación y descripción de las mutaciones implicadas en la foliculogénesis y la fecundación, principalmente con aquellas variantes genéticas identificadas en los genes de la fecundidad, en particular la mutación *FecG^E* del gen *GDF9*, permitirá incrementar la tasa ovulatoria y la prolificidad. Esto logrará potencializar el uso de las biotecnologías de reproducción asistida en el mejoramiento genético de la especie ovina, en particular la IA, la OMTE y la TE, para obtener un mayor número de corderos por parto en la oveja, lo cual se reflejará en un incremento en la productividad de las UP.

Referencias bibliográficas

- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(5), 631–637. <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Microsatellites (STR s), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1), 30-42. https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/237/229
- Arif, A.I., & Khan, H.A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1): 9-17. <https://doaj.org/article/623dd4659112465fa426e-1bf99a9d872>
- Azawi, O.I., & Al-Mola, M.K. (2011). A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. *Tropical Animal Health and Production*, 43: 1351–1355. <https://doi:10.1007/s11250-011-9856-7>
- Bodensteiner, K.J., Clay, C.M., Moeller, C.L., & Sawyer, H.R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*, 60: 381-386. <https://doi:10.1095/biolreprod60.2.381>
- Bravo, S., Larama, G., Paz, E., Inostroza, K., Montaldo, H. H., & Sepúlveda, N. (2016). Polymorphism of the GDF9 gene associated with litter size in Araucana creole sheep. *Animal Genetics*, 47(3), 390–391. <https://doi.org/10.1111/age.12404>
- Cameron, A.W., Battye, K. M., & Trounson, O. A. (1988). Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 747-752. <https://doi:10.1530/jrf.0.0830747>

- Conde-Hinojosa M.P., Cortez-Romero, C., Vaquera-Huerta, H., Herrera-Corredor, A., Torres-Hernandez, G., & Salazar-Ortiz, J. (2014). Respuesta folicular y ovárica en ovejas Pelibuey sometidas a diferentes tratamientos de sincronización y/o superovulación. En: *Por una producción animal sustentable para el logro de la soberanía alimentaria y el combate a la pobreza*. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán.
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51: 105-116. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00235-0)
- Cokett, N.E., Shay, T.L., Beever, J. E., Nielsen, D., Albretsen, J., Georges, M., Peterson, K., Stephens, A., Vernon, W., Timofeevskata, O., South, S., Mork, J., Macilius, A., & Bunch, T.D. (1999). Localization of the locus causing spider lamb syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. *Mammalian Genome*, 10: 35-38. <https://doi.org/10.1007/s003359900938>
- Cortez-Romero, C., & Gallegos-Sánchez, J. (2014). *Biotechnologías reproductivas, moleculares y génicas en ovinos*. 1ra. Edición. Editorial Biblioteca Básica de Agricultura (BBA). ISBN: 978-607-715-212-5. 282p.
- Davis, G.H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37 (Suppl 1): S11-S23. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S11>
- De Castro, F. C., Cruz, M. H. C., & Leal, C. L. V. (2016). Role of Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(8), 1065–1074. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0797>
- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation fac-

- tor 9 (GDF9), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0837-z>
- Evans, G., & Robinson, J. T. (1980). The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *Journal of Agricultural Science*, 94: 69-88. <https://doi.org/10.1017/S002185960002791X>
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Jennifer, J. L., Jokiranta, S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., & Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Natural Genetics*, 25: 279-283. <https://doi.org/10.1038/77033>
- García-Salas, A., Cortez-Romero, C., Salazar-Ortiz, J., Arroyo-Ledezma, J., Ruíz-Vera, V.M., Vaquera-Huerta, H., & Gallegos-Sánchez, J. (2017). Administration of exogenous hormones in ovulatory and embryonic response in Pelibuey sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(3):446-451. <https://doi.org/10.1111/rda.12930>
- González-Bulnes, A., García-García, R.M., Souza, C.J.H., Santiago Moreno, J., López-Sebastián, A., Cocero, M.J., & Baird, D.T. (2002). Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reproduction in Domestic Animals*, 37:357-361. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00385.x>
- Hanrahan, J.P., Grogan, S.M., Mulsant, P., Michael, M., Davis, G.H., Powell, R., & Galloway, S.M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70: 900-909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Hernández-Rubio, D.J., Navarro-Maldonado, Ma. del C., González-Muñoz, S.S., Hernández-Rodríguez, M. Conde-Hinojosa, M.P., & Cortez-Romero, C. 2023. Influencia de la presincronización del estro en variables reproductivas de ovejas de la raza Katahdin portadoras del gen GDF9 (Influence of estrus pre-synchroni-

zation on reproductive variables in Katahdin ewes carriers of the GDF9 gene). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26 (042): 1-12. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/4269>

- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P.E., Cranfield, M., Groome, N. P., Ritvos, O., & McNatty, K. P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep 1. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1777–1789. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132(2): 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Lahoz, C.B., Alabart, J.L., Folch, J., Calvo, J.H., Martinez-Royo, A., & Fantova, E. (2011). Genes mayores para el incremento de la prolificidad. <http://hdl.handle.net/10532/1630>
- Lander, E. S., & Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121(1), 185-199. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.1.185>
- Marshall, K., Quiros-Campos, C., Van der Werf, J. H. J., & Kinghorn, B. (2011). Marker-based selection within smallholder production systems in developing countries. *Livestock Science*, 136(1), 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.09.006>
- McNatty, K.P, Smith P., Moore L.G., Reader K., Lun S., Hanrahan, J.P., Groome, N.P., Laitinen, M., Ritvos, O., & Juengel, J.L. (2005). Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol*, 234(1-2): 57-66. <https://doi:10.5661/rdr-vi-55>
- McNatty, K.P., Lawrence, S., Groome, N.P., Meerasahib, M.F., Hudson, N.L., Whiting, L., Heath, D.A., & Juengel, J.L. (2006). Oocyte signaling molecules and their effects on reproduction in ruminants. *Reproduction Fertility and Development*, 18: 403-412. <https://doi:10.1071/RD05104>

- Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., & Saldaña, J. M. (2009). Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, 72: 477-483. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.002>
- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H., & McNatty, K.P. (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*, 121: 843-852. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210843>
- Moradband, F., Rahimi, G., & Gholizadeh, M. (2011). Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in iranian Baluchi sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(9), 1179-1183. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10453>
- Muñoz-García, C., Vaquera-Huerta, H., Gallegos-Sánchez, J., Becerril-Pérez, C.M., Tarango-Arámbula, L.A., Bravo-Vinaja, Á., & Cortez-Romero, C. (2021). Influence of FecG^E mutation on the reproductive variables of Pelibuey ewes in the anestrus period. *Tropical Animal Health and Production*, 53:328. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02755-7>
- Myers, M., & Pangas, S. A. (2010). Regulatory roles of transforming growth factor beta family members in folliculogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(1), 117-125. <https://doi.org/10.1002/wsbm.21>
- Nicol, L., Bishop, C. S., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, M. S., & McNeilly, S. A. (2009). Specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921-933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Oliveira, M.E.F., Cordeiro, M.F., Ferreira, R.M., Souza, S.F., Pieroni, J.S.P., Rodrigues, L.F.D.S., & Vicente, W.R.R. (2012). Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG. *Ciência Rural*, 42: 1077-1082. <https://doi:10.1590/S0103-84782012000600021>
- Palma, G.A. (2008). *Biotechnología de la Reproducción*. 2ª edición. Prod. Gráfica Integral. Argentina, 669p.

- Paulini, F., & Melo, E. O. (2011). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 354–361. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>
- Pérez-López, M.H., Cortez-Romero, C., Salazar-Ortiz, J., Herrera-Corredor, A., Torres-Hernández, G., Morales-Terán, G., & Gallegos-Sánchez, J. (2014). Efecto de la aplicación de la hormona Luteinizante (LH) a diferentes tiempos post-retiro del CIDR en ovejas Pelibuey. En: Por una producción animal sustentable para el logro de la soberanía alimentaria y el combate a la pobreza. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán.
- Pérez-Ruiz, E., Gallegos-Sánchez, J., Cortez-Romero, C., Segura-León, O.L., Salinas-Ruiz, J., & Salazar-Ortiz, J. (2020). *FecG^E* mutation in Pelibuey sheep. *Animal Genetics*, 51(2), 346-347, <https://doi.org/10.1111/age.12912>
- Pinna, A. E., Brandão, F.Z., Cavalcanti, A.S., Borges, A.M., Loureiro, A.P.P., & Fonseca, J.F. (2008). Fertilidade de ovelhas cíclicas submetidas à sincronização do estro utilizando implantes intravaginais (CIDR®) novos ou reutilizados. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36 (Supl 2): s581. https://www.ufrgs.br/actavet/36-suple-2/FINAL_ANAIS_da_XXII_Reuniao_da_SBTE_2008.pdf
- Romero-Santillán, F., Cortez-Romero, C., Salazar-Ortiz, J., & Gallegos-Sánchez, J. (2015). Cap. 32: Efecto de la adición de un agonista de GnRH en la superovulación de ovejas Pelibuey. En: *El Agro Veracruzano*, vol. II. ISBN: 978-607-96939-2-3. Academia Veracruzana de Ciencias, Boca del Río, Veracruz, pp. 167-173. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1751/1/PUB-CAPITULOS-LIBROS-955.PDF>
- Rubianes, E., Ungerfeld, R., Viñoles, C., Rivero, A., & Adams, G.P. (1997). Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative

- to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, 47: 1479-1488. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00155-6)
- Sanfins, A., Rodrigues, P., & Albertini, F. D. (2018). GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *J Assisted Reproduction and Genetic*, 35(10), 1741–1750. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4>
- Scaramuzzi R.J., Baird, D.T., Campbell, B.K., Driancourt, M.A., Dupont, J., Fortune, J.E., Gilchrist, R.B., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C., & Webb, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 23: 444–467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., & Melo, E. O. (2010). A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 42, 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O.E., Carou, N., Alberio, R.H., Abecia, J.A., & Palacin, I. (2008). Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 104: 227-237. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2007.01.020>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014). Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animals Genetic*, 45(5), 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Thibier, M. (1990). New technologies in cattle reproduction. *Proc. 7 th FAVA Congress*, Pattaya Thailand. P. 512-524.
- Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48 (1): 33-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193030122009>

- Våge, I. D., Husdal, M., Kent, P. M., Klemetsdal, G., & Boman, A. I. (2013). A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Veiga-López, A., Domínguez, V., Souza, C.J., García-García, R.M., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A., McNeilly, A.S., & González-Bulnes, A. (2008). Features of follicle-stimulating hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. *Fertility and Sterility*, 89:1328-1337. <https://doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.034>
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., & Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 27: 810. <https://doi:10.1038/385810a0>
- Wilson, T., Wu, X.Y., Juengel, J.L., Ross, I.K., Lumsden, J.M., Lord, E.A., Dodds, K.G., Walling, G.A., McEwan, J.C., O'Connell, A.R., McNatty, K.P., & Montgomery, G.W. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64: 1225-35. <https://doi:10.1095/biolreprod64.4.1225>
- Xu, E., Li, E., Han, Y., Chen, L., & Xie, Z. (2010). Differential expression of mRNAs encoding BMP/Smad pathway molecules in antral follicles of high-and low-fecundity Hu sheep. *Animal Reproduction Science*, 120:47-55. <https://doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.009>

CAPÍTULO 2

División de embriones. Una nueva visión de una biotecnología reproductiva olvidada

*Raymundo Rangel Santos**

Resumen

La división de embriones es una biotecnología reproductiva de importancia para aumentar la eficiencia de los programas de Transferencia embrionaria de 20 a 30%. Esta técnica es posible llevarla a cabo en el momento de la evaluación de los embriones aún en el mismo rancho. La bipartición embrionaria, supone aumentar al doble la disponibilidad de embriones, requiriéndose conocimientos prácticos en el uso de los equipos especializados. En el presente trabajo se analizan algunas variables tales como edad de la receptora, calidad de los embriones bisectados, estadio de desarrollo del embrión, raza de las hembras subrogadas y personal técnico. Además, se dan a conocer, por el autor experiencias y eficiencias en la bisección y transferencia de embriones en México y otros países, principalmente con la especie ovina, bovina y equina. Finalmente se revisan resultados de la división de embriones postvitricación y de embriones generados *in vitro*.

Palabras claves: Bisección de embriones, gemelos idénticos, transferencia de embriones.

* Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230. México.
rangelsr@correo.chapingo.mx

Introducción

La división de embriones es una tecnología reproductiva con potencial para incrementar la eficiencia de programas de Transferencia de Embriones (TE). El procedimiento es simple, rápido y es posible llevarlo a cabo en ranchos. Su implementación demanda el conocimiento de la técnica y algunos equipos de uso rutinario en un laboratorio de reproducción. Representa una oportunidad de contribuir a mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de explotaciones ganaderas. La TE es una técnica reproductiva antigua, cuyo éxito es variable. El principal problema es la impredecible respuesta a tratamientos de superovulación y variabilidad en la calidad de los embriones. La técnica de división de embriones se justifica desde dos puntos de vista: Incrementar la producción de crías. Este es el aspecto más importante desde un punto de vista productivo y la producción de gemelos idénticos. La posibilidad de generar pares de gemelos idénticos es importante principalmente desde el punto de vista de investigación.

La posibilidad de dividir un embrión inicia como un sueño donde la hipótesis planteada es pensar si un organismo en estadio de desarrollo embrionario temprano tiene la capacidad de continuar viviendo después de ser dividido mecánicamente (Figura 1). Como se presentará en el desarrollo del documento, la masa de células que integran un embrión compacto en estadio de mórula o blastocisto tienen la capacidad de continuar viviendo y en el mejor de los casos sobrevivir ambas mitades. Lo anterior puede tener implicaciones tanto desde el punto de vista productivo como de investigación. Los resultados muestran la capacidad totipotente tanto de las células que integran la masa celular interna como las células del trofoblasto, dando origen a individuos clínicamente sanos (Rahbaran *et al.*, 2021).

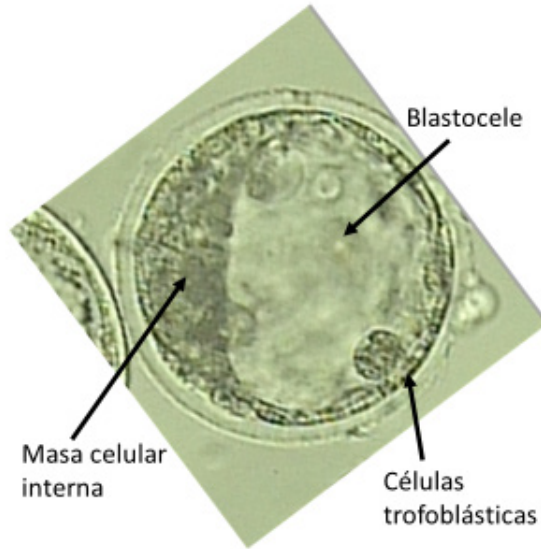


Figura 1. Blastocisto expandido (Imagen tomada de Rangel, 2018).

Necesidades

Con la finalidad de realizar la división de un embrión es necesario contar con los siguientes aspectos: una mano entrenada, un micromanipulador, una micronavaja, medio de división y una caja de Petri.

Tipos de micromanipuladores

Para dividir un embrión es necesario realizar movimientos micrométricos en todas las direcciones, por lo cual se requiere usar un micromanipulador. Al respecto existen en el mercado tanto micromanipuladores mecánicos como automatizados o motorizados. Estos por ser instrumentos de alta precisión y con movimientos en joystick hidrodinámicos tienen elevados costos. Además, algunos de ellos para un correcto funcionamiento requieren mesas con suspensión de aire que amortigüen cualquier tipo de vibración, lo que aumenta el costo de adquisición y funcionamiento. Es importante mencionar que el

uso de estos equipos requiere de un exhaustivo entrenamiento y generación de experiencia, considerando lo delicado que es el embrión y que los movimientos y el tiempo requerido para la bisección tienen que ser óptimos.

Tipos de microscopios

El tipo de microscopio ideal para ayudar en la división de un embrión es un microscopio invertido, del cual es posible encontrar diversas marcas, pero en nuestro laboratorio se usa un Nikon TS100 con excelentes resultados. Sin embargo, también podría utilizarse microscopio estereoscópico equipado con oculares (30X) y objetivos de aumento (10X) para una mejor visualización.

División manual de embriones

Aplicando el principio de que la división es un proceso mecánico, algunos investigadores han mostrado la factibilidad de realizar con éxito la división en forma manual. Aunque en lo personal considero que es una intervención quirúrgica de alto riesgo, el éxito dependerá de realizar movimientos altamente precisos.

La idea de considerar dividir un embrión demanda del conocimiento de aspectos fisiológicos básicos. Por lo cual, es necesario recordar que un blastocisto de aproximadamente siete días está constituido por células de la masa celular interna y células del trofoblasto, las cuales pueden ser identificadas en el laboratorio mediante su posición diferente (Figura 1). Sin embargo, a nivel campo el mismo embrión se aprecia de un solo color y por su posición es factible identificar los dos tipos de células (Figura 2). Lo cual es fundamental para orientar al embrión en posición apropiada para realizar el corte de las células trofoblásticas, pero más importante aún de las células de la masa celular interna, pues son éstas las que dan origen a la nueva cría.

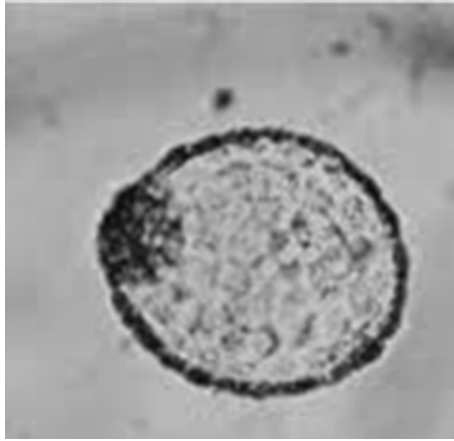


Figura 2. Embrión sin teñir (Imagen tomada de Rangel , 2018).

Breve historia

La técnica de división de embriones se desarrolló en la década de los 70's y 80's, tiempo en el cual para dividir un embrión se requería del uso de 4 a 6 microinstrumentos (Brem *et al.*, 1989), además de dos micromanipuladores, y el procedimiento implicaba tardar más de 30 minutos para procesar un solo embrión. El proceso era considerablemente estresante para el técnico y consumía mucho tiempo, en parte para realizar el alineamiento de los diversos microinstrumentos, por lo que con el paso del tiempo y el constante esfuerzo para mejorar la tecnología se fue reduciendo el número de microinstrumentos utilizados. En consecuencia, posteriormente sólo se usaron 2 microinstrumentos, una pipeta de succión y una micronavaja, significando un avance considerable, sin afectar negativamente la eficiencia de la técnica. El último avance consistió en el desarrollo de una solución especial para dividir embriones que permite al embrión depositarse al fondo de la caja de Petri, por lo cual sólo se requiere una micronavaja para ayudar en el alineamiento apropiado del embrión y realizar un corte vertical (Figura 3). Actualmente es posible dividir un embrión en 5 a 10 minutos (Rangel, 1991; Vijayalakshmy *et al.*, 2019).

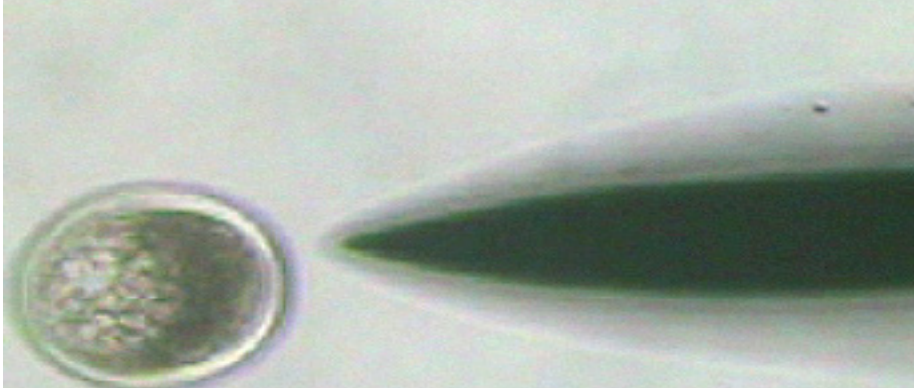


Figura 3. Método simple de división usando sólo una micronevaja (Imagen tomada de Rangel, 2018).

Procedimiento de división

En resumen, la división de un embrión incluye los siguientes aspectos: alinear los instrumentos, seleccionar el embrión, colocar una gota de medio de división, cortar y transferir dentro de una hora.

Construcción y uso de una micronevaja

El corte de un embrión, aunque es posible realizarlo con una microaguja de vidrio, en la actualidad comúnmente se usa una micronevaja, la cual se elabora a partir de hojas de afeitar de acero inoxidable que se pueden quebrar (Figura 4).

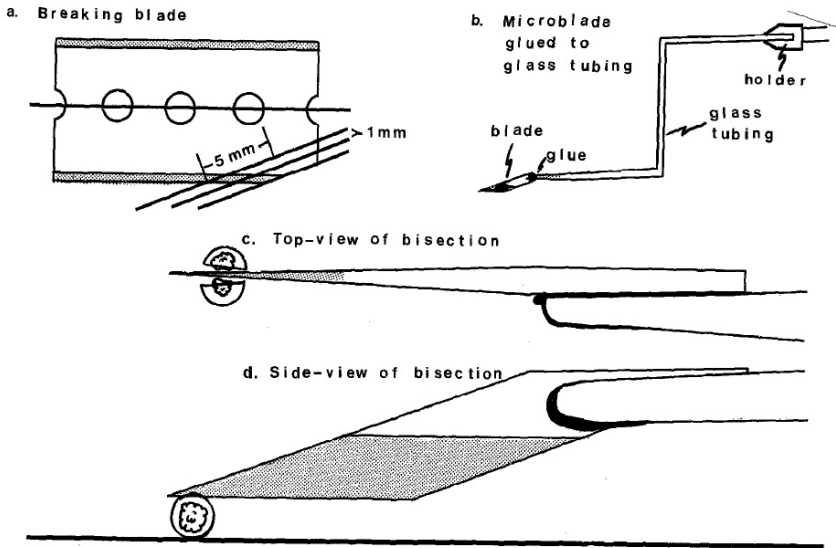


Figura 4. Construcción y uso de una micro navaja (Imagen tomada de Williams y Moore, 1988).

Al finalizar el lavado es posible encontrar un considerable número de blastocistos de excelente calidad, los cuales deberán orientarse con la masa celular interna en el lado izquierdo para facilitar su división (Figura 5).

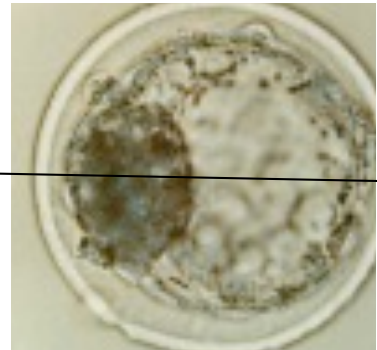
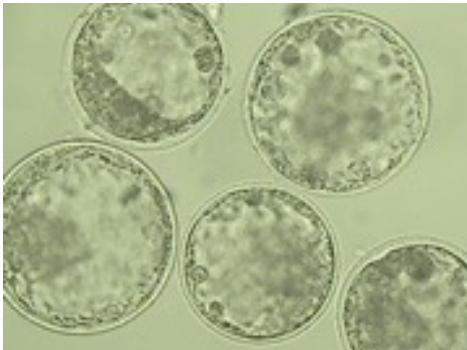


Figura 5. Embriones que deben ser alineados con el fin de ser divididos (Imagen tomada de Rangel, 2018).

Posterior a la división se espera obtener dos mitades de embriones con aproximadamente un 50% de la masa de células en cada una de ellas (Figura 6). Lo cual es importante para alcanzar los mayores porcentajes de sobrevivencia y el mayor porcentaje de gemelos idénticos.

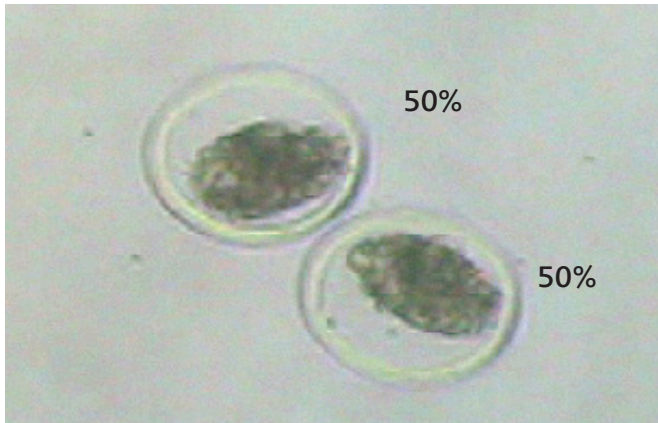


Figura 6. La división de un embrión produce dos demi-embryones con una cantidad similar de masa celular (Imagen tomada de Rangel, 2018).

Factores que afectan la sobrevivencia de embriones divididos

En seguida se analizan algunos factores que podrían afectar la capacidad de sobrevivir de los embriones divididos.

Calidad del embrión (Q1 vs. Q2). Los embriones apropiados para dividirse deben ser calidad 1 o de excelente calidad. Aunque otros embriones de menor calidad técnicamente pueden ser procesados, su capacidad de sobrevivencia se reduce considerablemente. Los resultados del cuadro 1, muestran mayor sobrevivencia para los embriones calidad 1, así como un mayor porcentaje de gemelos idénticos en la especie ovina. Dichos resultados son coincidentes con diversos reportes de la literatura (Brem *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1984; Széll *et al.*, 1994).

Cuadro 1. Calidad del embrión y sobrevivencia del embrión dividido (Tomada de Rangel, 1991).

Característica	Calidad del embrión	
	1	2
No. de embriones divididos	794	117
No. de demi-embiones	1588	234
No. de receptoras	794	117
No. de preñeces (%)	591 (74)	83 (71%)
No. de corderos	805	106
Corderos/demi-embrión (%)	51	45
Corderos/embrión original (%)	102	90
Gemelos/embrión original (%)	27	20

Estadio de desarrollo embrionario (Blastocisto expandido vs. Blastocisto eclosionado). Los embriones pueden ser divididos desde sus fases iniciales de desarrollo, sin embargo, la mayor sobrevivencia se ha obtenido al usar embriones compactos, mórulas y blastocistos (Williams *et al.*, 1984; Arave *et al.*, 1987; McEvoy y Sreenan, 1990). En la experiencia del autor en ovinos, la mayor sobrevivencia y mayor porcentaje de gemelos idénticos se ha obtenido con blastocistos eclosionados (Cuadro 2), coincidiendo con lo reportado por Chesné *et al.* (1987), aunque dichos embriones presentan otras limitantes en su manejo.

Cuadro 2. Estadio de desarrollo del embrión y sobrevivencia del embrión dividido (Tomado de Rangel, 1991).

Característica	Estadio de desarrollo embrionario	
	Blastocisto expandido	Blastocisto eclosionado
No. de embriones divididos	766	145
No. de demi-embiones	1532	290
No. de receptoras	766	145
No. de preñeces (%)	561 (73)	113 (78)
No. de corderos	754	157
Corderos/demi-embrión (%)	49	54
Corderos/embrión original (%)	98	108
Gemelos/embrión original (%)	25	30

Edad de la donadora (10 vs. 24 meses). Los resultados de nuestros estudios en ovinos no muestran efecto significativo con la edad de la donadora en la sobrevivencia de los embriones divididos, aunque la incidencia de gemelos idénticos fue mayor en ovejas de 24 meses.

Raza de la donadora (Danish Texel vs. Finnish Texel). Los resultados de nuestros estudios en ovinos hasta el momento indican que la división de embriones se puede implementar con éxito independientemente del grupo genético proveedor de los embriones a dividir.

Técnico (1 vs. 2). La experiencia del técnico siempre afectará la eficiencia de la técnica, por lo que es recomendable mantenerse en constante capacitación, como se muestra en el cuadro 3. Hashiyada (2017) reportó mejoras significativas en la eficiencia de la técnica con el paso del tiempo de experiencia.

Cuadro 3. Técnico y sobrevivencia del embrión dividido
(Tomado de Rangel, 1991).

Característica	Técnico	
	1	2
No. de embriones divididos	124	787
No. de demi-embryones	248	1574
No. de receptoras	124	787
No. de preñeces (%)	82 (66)	592 (75) *
No. de corderos	110	801
Corderos/demi-embrión (%)	44	51 *
Corderos/embrión original (%)	88	102
Gemelos/embrión original (%)	22	26

Resultados en México

La técnica de división puede aplicarse a embriones de cualquier tipo de especie de mamífero de interés zootécnico. A continuación, se muestran evidencias de su aplicación en bovinos, ovinos y caprinos (Figura 7).



Figura 7. Resultados de división de embriones en bovinos, ovinos y caprinos (Tomado de Rangel, 2022).

Se presenta un resumen de algunos de los trabajos realizados por el autor en el extranjero y en México (Cuadro 4). Así como los resultados de un estudio realizado en equinos. En general, los resultados muestran la factibilidad de obtener alrededor de un 50% de sobrevivencia de los embriones divididos. Los estudios en ovinos muestran la factibilidad de aplicar la división de embriones en explotaciones comerciales. El estudio donde se incluyeron vacas Cebú se realizó en condiciones de clima cálido húmedo, evidenciando la posibilidad de aplicar la tecnología en dichas condiciones medioambientales. Por otro lado, en el estudio donde se usó ganado Holstein se incluyeron sólo vaquillas. Las cuales fueron servidas con semen sexado para producir hembras, por lo que los resultados confirman la oportunidad de dividir embriones sexados provenientes de vaquillas incrementando la eficiencia de programas de TE. Los resultados bajos reportados con embriones de vacas Charolais en parte son relacionados con la participación de técnicos nuevos en dicho proyecto, pero la eficiencia fue incrementada en estudios posteriores. Finalmente, el fin de incluir al menos resultados de un estudio llevado a cabo en equinos obedece a la necesidad de mostrar la factibilidad de aplicar la división en dicha especie. Lo anterior reafirma que la técnica puede ser aplicada con éxito también en una especie donde la inducción de ovulaciones múltiples no funciona y por otro lado el valor económico de los embriones es considerablemente alto.

Cuadro 4. Resumen de resultados (Tomado de Rangel, 1991).

Animales	Número	Tasa de sobrevivencia (%)
Ovinos (NZ)	> 6 000	45
Ovino Dorper	90	51
Bovino Cebú	28	45
Bovino Holstein	16	50
Bovino Charolais	46	35
Equinos (1)	20	50

Aplicación potencial en otras especies

Una vez demostrada la efectividad de la división de embriones en varias especies de interés zootécnico, es factible sugerir que la técnica podría ser utilizada con éxito en otras especies de interés productivo.

Potencial de la división de embriones

Los resultados reportados hasta el momento muestran la factibilidad de aplicar la división de embriones como una alternativa para ayudar a mejorar la eficiencia en programas comerciales de TE. En un ejercicio donde numéricamente se ilustra el beneficio potencial de incluir la división de embriones en un ejercicio de TE que incluye la disponibilidad de 10 embriones enteros frescos en una explotación comercial. En principio se considera la situación donde se transfieren los embriones enteros y se puede obtener un 50, 60 o en el mejor de los casos un 70% de sobrevivencia embrionaria. Lo anterior podría generar 5, 6 ó en el mejor de los casos 7 crías potenciales. En forma alternativa, aplicar la división de embriones resulta en incrementar al doble el número total de embriones para transferir. En base a los resultados probables, sería factible considerar un 50% de sobrevivencia de los embriones divididos. Lo cual significa generar potencialmente 10 crías, representando un incremento variable comparativamente con transferir los embriones enteros (Figura 8).

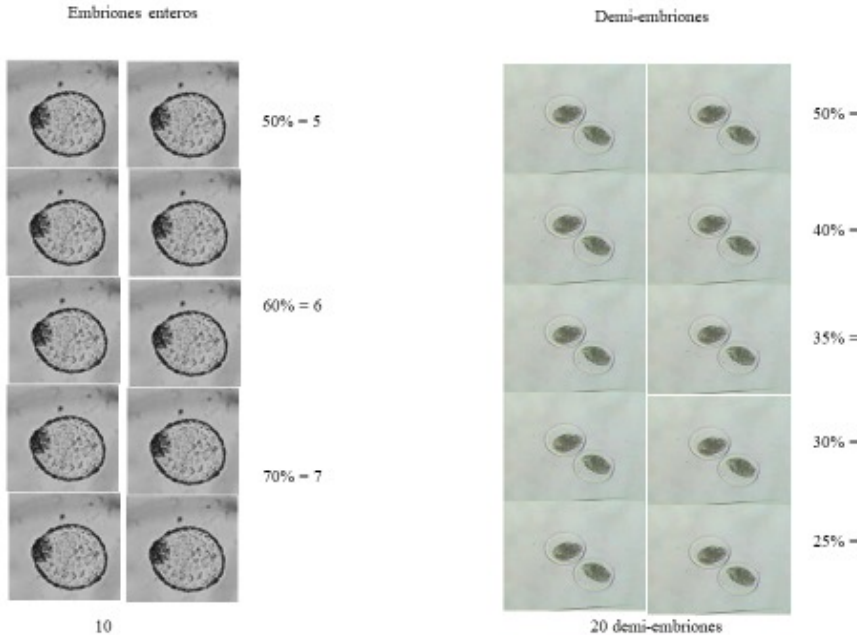


Figura 8. Potencial de la división de embriones (Tomado de Rangel, 2022).

Preguntas pendientes

¿Existe la posibilidad de dividir embriones de calidad 2(Q2)?

Aunque actualmente es recomendable dividir sólo embriones de excelente calidad (Q1), técnicamente sería factible también dividir embriones Q2, la pregunta sería si existe la posibilidad de convertir un embrión Q2 en un embrión Q1. Actualmente estamos trabajando al respecto y los resultados son alentadores.

¿Existe la posibilidad de dividir embriones congelados?

Los resultados de la literatura generalmente concluyen que la sobrevivencia de embriones enteros congelados y posteriormente divididos es aproximadamente 5 a 25% (Seike et al., 1991; Schmidt et al., 1992; Shelton, 1992), por lo cual no es recomendable dividirlos. Sin embar-

go, con los avances recientes en la congelación de embriones como la vitrificación abre la posibilidad de que los resultados iniciales puedan incrementarse.

¿Existe la posibilidad de dividir embriones producidos in vitro?

Resultados preliminares en nuestro laboratorio muestran la factibilidad de dividir embriones ovinos producidos *in vitro*, los cuales en principio fueron cultivados *in vitro* para confirmar su viabilidad y posteriormente algunos fueron transferidos resultando en el nacimiento de una primera cría (Figura 9).

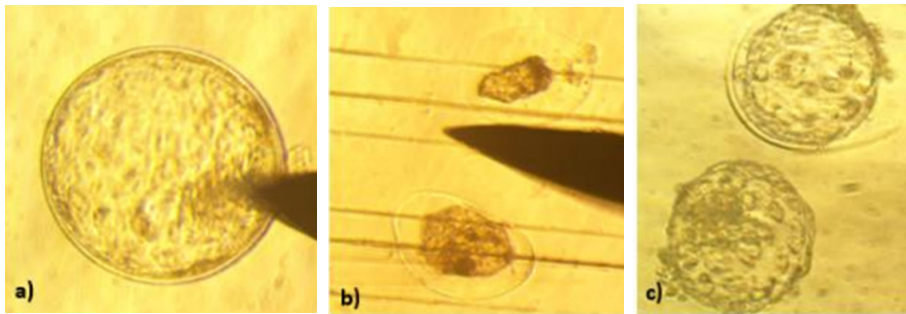


Figura 9. División de embriones ovinos producidos *in vitro* (Tomado de Lorenzo-Torres et al., 2021).

Mensaje final

La división de embriones puede incrementar la eficiencia de programas de TE en un 20 a 30%, confirmando resultados reportados en otros estudios (Gatica et al., 1984; Chesne et al., 1987; Vintila et al., 1995).

Referencias bibliográficas

- Arave, C.W., Bunsch, T.D., Mickelsen, C.H., & Warnick, H. (1987). Factors affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology*, 28(3): 373-382.
- Brem, G., Kruff, B., Szilvassy, B., & Tenhumberg, H. (1984). Identical Simmental twins through microsurgery of embryos. *Theriogenology*, 21(1): 225 abstr.
- Chesné, P., Colas, G., Cognié, Y., Guérin, Y., & Sévellec, C. (1987). Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology*, 27(5): 751-757.
- da Silveira, L.L., de Souza, R.V., Sousa Melo, N.S., Pezzini, T.G., McManus, C., & Rumpf, R. (2005). A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões eqüinos. *Ciência Rural*, 35(2): 412-416.
- Gatica, R., Boland, M.P., Crosby, T.F., & Gordon, Y. (1984). Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology*, 21(4): 555-560.
- Hashiyada, Y. (2017). The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *Journal of Reproduction and Development*, 63(6): 527-538.
- Lorenzo-Torres, A., Rangel-Santos, R., Ruíz-Flores, A., & Ambríz-García D.A. 2021. In vitro reconstitution of sheep demi-embryos in culture medium supplemented with vitamin C. 37th Annual Meeting of the Association of Embryo Technology in Europe (A.E.T.E.). 29 pp.
- McEvoy, T.G., & Sreenan, J.M. (1990). Effect of embryo quality and stage of development on the survival zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology*, 33(6): 1245-1253.
- Rahbaran, M., Razeghian, E., Maashi, M.S., Jalil, A.T., Widjaja, G., Than-gavelu, L., Kuznetsova, M.Y., Nasirmoghadas, P., Heidari, F., Marofi, F., & Jarahian, M. 2021. Cloning and embryo splitting in

mammalians: brief history, methods, and achievements. *Stem Cells International*, 2347506.

Rangel, S.R. (1991). Investigations into procedures for the implementation of a multiple ovulation and embryo transfer scheme using ewe lambs. Doctoral dissertation. Massey University, New Zealand. Rangel S.R. 2018. División de embriones en ovinos. Resultados no publicados.

Rangel, S.R. (2022). División de embriones. Una nueva visión de una biotecnología reproductiva olvidada. Resultados no publicados.

Rangel, S.R., & Lorenzo T.A. (2021). División de embriones ovinos producidos in vitro. Resultados no publicados.

Seike, N., Sakai, M., & Kanagawa H. (1991). Development of frozen-thawed demi-embryos and production of identical twin calves of different ages. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(1): 37-42.

Shelton, J.N. (1992). Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demiembryos. *Theriogenology*, 37(3): 507-514.

Széll, A., MacLeod, I.M., Windsor, D.P., & Kelly, R.W. (1994). Production of identical twin lambs by embryo splitting. *Theriogenology*, 41(8): 1643-1652.

Schmidt, M., Smith, S.D., Avery, B., Purwantara, B., & Greve, T. (1992). Coculture of bovine demiembryos prior to freezing. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33(3): 237-243.

Vijayalakshmy, K., Virmani, M., Verma, R., Manimegalai, J., Lambe, U., & Vikas Choudhir, V. (2019). Micromanipulation of embryos: An overview. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(4): 439-441.

Vintila, I., Babusik, I., Kulickova, L., Bencsik, I., Pacala, N., & Corin, N. (1995). Embryo splitting a way to increase the efficiency of embryo transfer in sheep. *STOCARSTVO*, 49(9-12): 349-353.

Williams, T.J., Elsdon, R.P., & Seidel, G.E., Jr. (1984). Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22(5): 521-531.

Williams, T.J., & Moore, L. (1988). Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 29(2): 477-484.

CAPÍTULO 3

Evaluación de la capacidad de desarrollo de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos provenientes de especies *Bos taurus indicus* y *Bos taurus taurus*

Giovana Yalili Bustamante Saldaña¹, Erika Alayo Aguirre¹
y Maricelia Alvarado Bazan¹

Resumen

La aplicación de la biotecnología permite aumentar la eficiencia reproductiva y el progreso genético del ganado vacuno. La presente investigación tuvo como objetivo comparar la capacidad de desarrollo de embriones producidos *in vitro* provenientes de *Bos t. indicus* y *Bos t. taurus*. Se evaluaron ovocitos colectados en los mismos periodos y épocas del año de estas especies; las donadoras estuvieron bajo las mismas condiciones de manejo, tanto sanitarias como nutricionales y sin estímulo hormonal. Se aplicó la prueba de Fisher para comparar el porcentaje de ovocitos viables y el porcentaje de embriones producidos por ambas subespecies y prueba t-student con nivel de significancia $p < 0.05$. Hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de embriones (28.6 % vs 38.6 %) para *Bos t. taurus* y *Bos t. indicus*, respectivamente. Se concluye a partir de los resultados obte-

1 Área clonación del Laboratorio de biotecnología reproductiva Sembro-Lactea. Carretera Panamericana Km531. Virú. La Libertad. Perú. E-mail: giovanaslbs@gmail.com, ealayo@gruporocio.com, malvarado@gruporocio.com

nidos, que la subespecie *Bos t. indicus* tiene mayor capacidad de producción de embriones en comparación con la subespecie *Bos t. taurus*.

Palabras clave: Vacuno, biotecnología, embriones, *Bos t. indicus*, *Bos t. taurus*

Introducción

El ciclo reproductivo natural en el bovino conduce al nacimiento de una cría por año en el mejor de los casos. Para mejorar la eficiencia reproductiva de animales de alto mérito genético se utilizan técnicas de reproducción asistida (Ploudre et al., 2012). Este procedimiento, permite multiplicar la descendencia de animales de alta calidad genética, acortando simultáneamente el intervalo generacional y facilitando diferentes actividades de mejoramiento genético, como la evaluación de la progenie y la comparación entre grupos de animales (Satori et al., 2002).

La biotecnología ha experimentado un gran auge en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos, o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones.

Un objetivo valioso del desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, como base para otras biotecnologías, que aseguren una alta tasa de preñez cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables (Hansen, 2006).

La fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos bovinos es una técnica beneficiosa que permite obtener embriones, lo que representa grandes ventajas en reproducción animal garantizando un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo, clonación mediante transferencia nuclear y producción de animales transgénicos (Gadea et al., 1998), biotecnologías que permiten el mejoramiento genético

necesario, para vencer las limitaciones impuestas por las condiciones ambientales (Gutiérrez *et al.*, 2017). Además, las técnicas de FIV son la única opción disponible para producir crías de hembras valiosas, que por causas no genéticas son estériles y por lo tanto son eliminadas de los sistemas productivos (Ratto *et al.*, 1999). Esta técnica tiene muchas posibilidades; puede ser usada en vacas cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y en las que no responden a estímulos hormonales; también, en animales con desórdenes reproductivos de origen no genético (Galli *et al.*, 2001), y en terneras y novillas pre púberes a partir del 6°-8° mes de edad (Taneja *et al.*, 2000).

Cada vez es más evidente la importancia del componente racial sobre los eventos fisiológicos del embrión y los gametos que le dan origen y dada la importancia de la ganadería en el país, es importante caracterizar la influencia de dicho componente sobre la capacidad de desarrollo embrionario en bovinos. La realización de estudios donde se compare la capacidad de desarrollo embrionario entre las subespecies *B. t. taurus* y *B. t. indicus*, permitirá contribuir a fortalecer los conocimientos relacionados con las diferencias biológicas existentes entre estas dos especies (Báez *et al.*, 2010).

La raza animal de la que se derivan los ovocitos afecta la capacidad de desarrollo de los embriones derivados de FIV. *Bos t. taurus* en comparación con *Bos t. indicus* tiene ovarios que contienen menos folículos antrales, un tamaño de folículo ovulatorio más grande y una mayor tasa de metabolismo. También hay un perfil hormonal diferente en *Bos t. taurus* en comparación con el ganado *Bos t. indicus*. Las vacas *Bos taurus* tienen un pico menor de concentraciones circulantes de estradiol y progesterona que las vacas *Bos indicus* (Slade *et al.*, 2019).

El ganado *B. t. taurus* es muy sensible a las condiciones climáticas, experimentando grados variables de infertilidad. Los animales con mayor herencia cebuina (*B. t. indicus*); además, de ser menos exigentes en alimentación debido a su menor producción lechera, poseen características anatómicas y funcionales que los hacen más aptos para resistir las condiciones ambientales adversas, mayor resistencia a enfermedades por lo cual mantienen tasas de fertilidad más elevadas a

lo largo del año (Barros et al., 2006). La especie *B. t. indicus* (ganado cebú) es predominante en las regiones tropicales, debido a su mejor tolerancia al estrés térmico y la resistencia a los parásitos que las razas europeas (*B. t. taurus*), las cuales son predominantes en climas templados (Dubuc et al., 1984). En comparación con las razas europeas, el ganado cebú experimenta una menor reducción en el consumo de alimento, en la tasa de crecimiento, la producción de leche y la función reproductiva, en respuesta al estrés térmico (Barros et al., 2006).

En los últimos años se han desarrollado diversos programas de producción *in vitro* de embriones bovinos y son numerosos los profesionales que están dedicados a esta biotecnología. Estos programas obedecen en gran medida, a las razas que se trabajen, tanto en *Bos t. taurus* como en *B. t. indicus*, sin embargo, dependiendo de las condiciones ambientales, varían. Por consiguiente, es importante registrar los detalles de trabajos locales, que sirvan como soporte técnico para el personal que se desempeña en esta actividad (Van Wagten donk, 2006).

Se espera que el conocimiento generado de la selección de una de las especies predominantes, *B. t. taurus* o *B. t. indicus*, sea utilizado como fuente de gametos femeninos, que muestren la mayor capacidad de producción embrionaria *in vitro*, para la FIV; esto permitirá mejorar la eficiencia de la PIV de embriones bovinos. El presente estudio expone el resultado del trabajo realizado en el Laboratorio Biotecnológico SEMBRYO en LACTEA S.A, ubicado en el Departamento de La Libertad – Perú, en el cual se realizó una evaluación de la capacidad de desarrollo embrionario producido *in vitro* a partir de ovocitos provenientes de subespecies de vacas *Bos t. taurus* vs *Bos t. indicus*, ambas especies de hembras fueron manejadas bajo las mismas condiciones medio ambientales y usando el mismo protocolo para la producción de los embriones *in vitro*.

El objetivo de este estudio fue la producción de embriones *in vitro* a gran escala, basado en el trabajo de campo y el laboratorio, con el fin de comparar los resultados entre embriones producidos a partir de especies de vacas *Bos t. taurus* y *Bos t. indicus*.

Materiales

Selección de donadoras de ovocitos

La aspiración de las donadoras se ejecutó durante un periodo de seis meses comprendido entre el mes de marzo a agosto del 2018, a una temperatura que varía de 20 a 25°C, las donadoras tuvieron sesiones de aspiración folicular de dos veces por semana. Como donadoras se seleccionaron hembras de las subespecies *Bos indicus* y *Bos taurus* con una edad promedio entre los 2 a 4 años, con buena condición corporal, con historia sanitaria, productiva y reproductiva normal; dichas donadoras fueron alimentadas con forraje de broza y chala durante el periodo que fueron sometidas a aspiración. Para lo cual, en campo las vacas fueron colocadas en un brete para realizar la inspección ginecológica y de esta manera determinar si la vaca estaba limpia. Cabe recalcar que las donadoras no fueron sometidas a protocolos de superovulación hormonal.

Para la recolección de ovocitos se utilizó la técnica de OPU (Ovum Pick Up) en la cual en cada sesión se utilizó un ecosonógrafo conectado a un transductor, usándose también una bomba de aspiración, trabajándose con una presión de vacío que osciló entre 15 a 16 cm³/min. Se ubicó por palpación rectal uno de los ovarios y se procedió a identificar en la pantalla del monitor los folículos. Se orientó el ovario para visualizar el folículo a aspirar y se realizó una punción del folículo previsto, aspirando el contenido del mismo, continuando sucesivamente en todos los folículos de ese ovario. Se procedió de manera idéntica con el otro ovario.

Búsqueda y selección de ovocitos

En el laboratorio el día de la colecta se procedió a preparar el medio de aspiración y medio de enjuague a base de PBS + antibiótico + heparina + BSA, los cuales se enviaron a las instalaciones donde se realizó la colecta de ovocitos en tubos con los datos necesarios, identificando el código de la vaca, para poder de esta manera diferenciarlas entre las subespecies *Bos t. taurus* y *Bos t. indicus*. Una vez realizada la colecta,

los tubos fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 38°C, donde el contenido de los tubos fue pasado a través de un filtro y lavado con medio de enjuague, y luego depositarlos en placas de 100 mm y realizar la observación bajo estereoscopio para su respectiva búsqueda, selección y clasificación.

Maduración de ovocitos

Para la maduración se utilizó medio B-199 suplementado con hormonas como LH, FSH, estradiol, FCS (Suero fetal bovino), factor de crecimiento epidermal. Los complejos cumulus- ovocito fueron cultivados en grupos de 10, en microgotas de medio y mantenidos en una incubadora de CO₂ durante 24 horas a 38.5°C en una atmósfera con 5 % CO₂ en aire saturado de humedad (Figura 1)

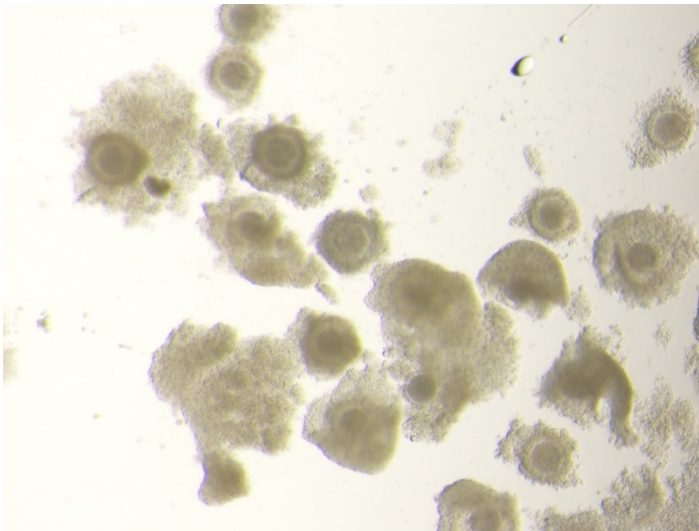


Figura 1. Ovocitos post maduración en el Laboratorio de Biotecnología reproductiva Sembryo – Láctea S.A (Sembryo-2018).

Capacitación espermática

Para llevar a cabo la FIV se utilizó semen congelado de un toro Brahman puro *B. t. indicus* para las vacas de raza pura *Bos t. indicus* y un toro *Bos t. taurus* puro, para las vacas de raza pura Holstein previamente probada la fertilidad de dichos toros. La capacitación espermática se realizó con la técnica de gradiente de PERCOLL, el semen a trabajar se depositó sobre un tubo cónico de 15 mL que contenía 1 mL de Percoll 45 y 1 mL de Percoll de 90, se llevó a la centrifuga a 3000 rpm por 30 minutos. Se retiró cuidadosamente el pellet y se homogenizó con 1 ml de Talp 1x, se centrifugó por segunda vez a 1500 rpm por 20 min. Se retiró el sobrenadante y este se homogenizó con medio Talp IVF. Se calculó la concentración y motilidad ajustando la concentración a 1.5 millones de espermatozoides/mL.

Fecundación in vitro

Una vez transcurrido el tiempo de maduración, los COC (Complejo Ovocito Células Cúmulo) previamente se denudaron parcialmente y se trasladaron en grupos de 10 ovocitos a microgotas conteniendo Talp IVF, posteriormente se procedió a fertilizar con la mezcla de la suspensión de semen a cada gota conteniendo los ovocitos. Luego, se colocaron en la incubadora durante 18 a 24 horas a 38.5°C en una atmósfera saturada de humedad, bajo 5 % CO₂.

Cultivo embrionario

Aproximadamente 18 horas post inseminación, se denudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron en medio de lavado H-Talp/Hepes antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo temprano cubiertas. Las placas de cultivo fueron incubadas a 38.5°C en incubadora de mezcla de gases (5 % CO₂, 88 % de Nitrógeno, 7 % de Oxígeno a > 85 % de humedad). En el día 4 post cultivo se realizó el cultivo tardío, realizando la renovación de medio de cultivo CIV y la evaluación de división embrionaria; así mismo, se retiró el restante de las células del

cúmulus. Posteriormente para el día 7 se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido (Figura 2).

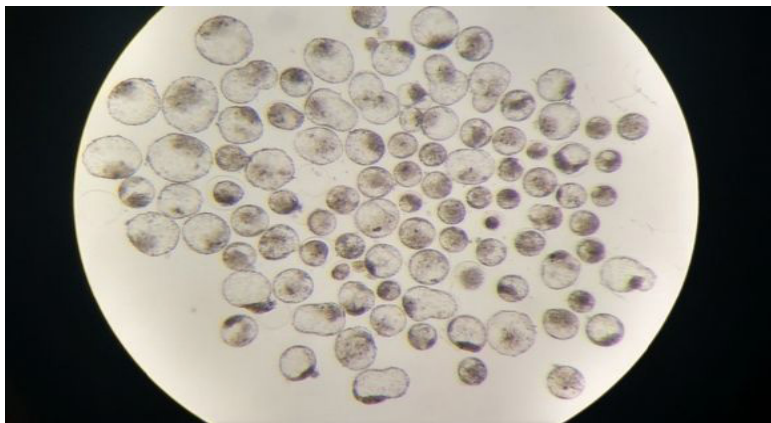


Figura 2. Blastocistos obtenidos al día 7 en el laboratorio de Biotecnología reproductiva Sembryo – Láctea S.A.

Resultados

Se colectaron, un total de 2,866 ovocitos en el periodo comprendido entre marzo a agosto del 2018, de los cuales 1,424 ovocitos pertenecieron a la especie *Bos taurus*, y 1,442 ovocitos de la subespecie *Bos indicus*, los resultados se resumen en la Tabla 1. Del total de ovocitos colectados, fueron a maduración 1,310 para la especie *Bos taurus* y 1,282 para la subespecie *Bos indicus* respectivamente, de estos últimos pasadas 24 horas solo fueron fertilizados 1,248 para la especie *Bos taurus* y 1,130 para *Bos indicus* respectivamente.

Tabla 1. Número total de ovocitos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*.

SUBESPECIE	Nº Ovocitos colectados
<i>Bos taurus</i>	1424a
<i>Bos indicus</i>	1442a

Letras iguales en las casillas corresponden, que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$)

Los análisis de los datos obtenidos se resumen en la Tabla 2, observándose que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las colectas de las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus*. Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la producción de blastocistos (28.6 % vs 36.6 %) entre las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje total de ovocitos fertilizados y de blastocistos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*.

SUBESPECIE	Ovocitos encontrados (n)	Ovocitos madurados (n)	Ovocitos fertilizados (n)	Ovocitos fertilizados (%)	Blastocistos producidos (n)	Blastocistos producidos (%)
<i>Bos Taurus</i>	1,424	1,310	1,248	87.64 ^a	357	28.61 ^a
<i>Bos indicus</i>	1,442	1,282	1,130	78.36 ^a	414	36.64 ^b

Letras diferentes en las casillas, corresponden a que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Báez et al. (2010), en los cuales se mostró que el ganado con predominancia fenotípica *Bos indicus* presentó mejores tasas de desarrollo embrionario, debido a que sus ovocitos fueron más competentes al tener genes termo tolerantes, con capacidad para resistir las condiciones ambientales del trópico, y podían llegar a desarrollarse estos ovocitos luego de la fecundación en mayor porcentaje de embriones que los del ganado *Bos taurus* (Báez et al., 2010).

Resultados contrarios se obtuvieron en estudios reportados por Bryant (2007), donde hubo mejores tasas de desarrollo embrionario en *Bos taurus* que en *Bos indicus*, exhibiendo que los ovocitos de la raza Brahman (*Bos indicus*) presentan una mayor concentración de lípidos comparado con las razas europeas (*Bos taurus*), lo que resulta en una menor respuesta a la fertilización *in vitro*, por consiguiente, menores tasas de preñez (Bryant, 2007). Por otro lado Camargo reportó resultados de la evaluación de los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en las hembras donadoras bajo las mismas condiciones

dietarias, encontrándose un nivel circulante más elevado de colesterol y de triglicéridos en la raza Brahman (*Bos indicus*) comparada con las razas inglesas (*Bos taurus*) (Camargo et al., 2007), lo que afecta directamente la influencia de la cantidad de lípidos encontrados en los ovocitos de ambas subespecies (Bryant, 2007); esto podría respaldar la menor tasa de producción de embriones *in vitro*, del ganado *Bos indicus* vs *Bos taurus*.

Chávez et al. (2010) encontró que, en vacas Holstein (*Bos taurus*), el estrés calórico parece reducir la competencia ovocitaria y las tasas de fecundación, reduciendo el desarrollo del embrión contribuyendo a una mala fertilidad durante los meses de verano; a diferencia del ganado cebú (*Bos indicus*) que está bien adaptado a los ambientes tropicales, evidenciando una máxima tolerancia al calor, mostrando mejor rendimiento reproductivo que *Bos taurus* en regiones tropicales y subtropicales, concluyendo que en ambientes tropicales el ganado *Bos indicus* presenta mejores índices de reproducción que el ganado *Bos taurus*.

Diversos estudios han señalado que el estrés calórico ejerce un efecto nocivo retrasado sobre el desarrollo folicular, los niveles de progesterona y sobre la competencia ovocitaria en vacas del género *Bos indicus*, a diferencia del *Bos taurus*, donde el estrés calórico causa un inmediato deterioro sobre el desarrollo folicular (Sun, 2003). No se conoce concretamente el mecanismo por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero, se ha descrito que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulus y el ovocito. Se afecta la competencia del ovocito para ser fecundado (Al Katanani, 2002), la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, y se producen cambios en la esteroidogénesis (Roth et al., 2001). Por tanto, algunos folículos pudiesen ser afectados aún antes de su reclutamiento lo que se traduce en la prolongación de los efectos del estrés térmico aún en los meses con condiciones más confortables (Lozano, 2005).

Visintin et al. (2002), señaló que existen diferencias ultraestructurales importantes, si se comparan embriones de *B. t. indicus* y *B. t. taurus*,

que por estas diferencias existe la posibilidad de una mejor respuesta en la obtención de embriones *in vitro*. Sin embargo, existen otros estudios en los cuales no se encontraron diferencias de embriones producidos *in vitro*, sugiriendo que el porcentaje de fertilización *in vitro* no es afectado por la raza o el estado fisiológico (Leroy *et al.*, 2005). Los resultados encontrados en el presente estudio evidencian que si existe una influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones obtenidos en la fertilización *in vitro*; no obstante, existen otros factores asociados importantes que se deben tener en cuenta tales como: etapa de producción de la donadora (si están en producción láctea o están secas), la temperatura del medio ambiente o estación del año (Tobón, 2004).

Conclusiones

- No hubo diferencia significativa entre los ovocitos recuperados de las subespecies *Bos t. indicus* y *Bos t. taurus*.
- La producción de blastocistos fue mejor en la subespecie *Bos t. indicus* comparado con los blastocistos producidos por *Bos t. taurus*.
- La subespecie *Bos t. indicus* mostró tener mayor capacidad de producción de embriones en comparación con la subespecie *Bos t. taurus*.

Referencias bibliográficas

- Al Katanani, Y., Paula-Lopes, F. & Hansen, P. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 85: 390-396.
- Báez, F., Chávez, A., Hernández, H., & Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica Maracaibo*. Venezuela. 20(3).

- Barros, C., Pegorer, M., Moraes, J., Eberhardt, B., & Monteiro, F. (2006). Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenology*. 65: 210-218.
- Bryant, BC. (2007). Intracellular lipids in *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes. A post-graduate thesis. B.S., Texas A&M Louisiana University. College Station, pp. 112-119.
- Camargo, L., Viana, J., Ramos, A., Serapiao, R., De Sa, W., Ferreira, A., Guimaraes, M., & Vale-Filho, V. (2007). Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*. 68: 626-632.
- Chávez, A., Báez, F., Hernández, H., & Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancias fenotípicas de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica de Veterinaria*. 20(3): 259-267.
- Dubuc, M. (1984). Animales Tropicales. Zebuinos y Azebuados. Espectantes S.R.L (Ed). Caracas-Venezuela. 3era Ed, pp. 21-25.
- Gadea, J., Ruiz, P.S., Coy, A., Poto, A., Peinado, B., Romar, R., Campos, I., & Zubillaga, O. (1998). Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. *Archivos de Zootecnia* (47): 299-304.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55: 1341-1357.
- Gutiérrez, C., Cifuentes, E., Pérez, V., Romero, L., Martínez H, N., & González T. M. (2017). Transferencia de embriones fecundados *in vitro* en ganado bovino de doble propósito. *Revista MVZ Córdoba*; 6(1): 52-57.

- Hansen, P. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle an overview. *Theriogenology* (65):119-125.
- Leroy, J., Opsomer, G., De Vlieghe, S., Vanholder, T., & Goossens, L. (2005). Comparison of embryo quality in high-yield dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*; 64 (9): 2022-2036.
- Lozano, R. R., Vásquez, C. G., & González-Padilla, E. (2005). Effect of heat stress and its interaction with other management and productive variables on pregnancy rate in dairy cows in Aguascalientes, México. *Veterinaria México*. 36 (3): 245-260.
- Plourde, D., Vigneault, C., Laflamme, I., Blondin, P., & Robert, C. (2012). Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology. 2011.12.021: 1767-1778.
- Ratto, M., Berland, M., Wolter, M., & Matamoros R. (1999). Bovine embryo development produced by in vitro fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 31 (1):89-96.
- Roth, Z., Meidan, R., Shaham-Albalancy, A., Braw Tal, R., & Wolfenson, D. (2001). Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*. 121: 745-751.
- Satori, R., Sartor, B., Guenther, J., Parrish, J., & Wilthbank, M. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*; 85 (11): 2803-2812.
- Slade, O., Clara, Varella, S., Reis, C., Agostinho, J., & Tamy, I. (2019). Oocyte origin affects the in vitro embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. *Animal Reproduction Science*, 209, 106165

- Sun, Q.Y. (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscience Research Technology*. 61:342-348.
- Taneja, M., Bols, P.E., Van de Velde, A., Ju, J.C., Schreiber, D., & Tripp, M.W. (2000). Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of Reproduction*. 62: 206-213.
- Tobón J. (2004). Repoblamiento ganadero. Editorial Marin Vieco Ltda.
- Van Wagtendonk de Leeuw, A.M. (2006). Ovum Pick-Up and in-vitro Production in the bovine alter several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65 (5): 914-925.
- Visintin, J.A., Martinus, J. F., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R., Nicacio, A.C., A & Ssumpcao, M. E. (2002). Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different. *Theriogenology* 57 (1): 345-359.

CAPÍTULO 4

Producción in vitro de embriones ovinos en México

*Horacio Álvarez Gallardo^{1,2}, Adriana Velázquez Roque³,
Fernando Villaseñor González⁴, Michael
Edward-Kjelland^{5,6} y Salvador Romo García²*

Resumen

La producción in vivo de embriones en ovinos en nuestro país es incipiente y para ello se ha utilizado la colección por método quirúrgico, con la desventaja de la consecuente formación de adherencias y restricción del uso de las donadoras al cabo de algunos ciclos. El advenimiento de la técnica conocida como LOPU (laparoscopic ovum pick up) ha sido de importancia para la obtención serial de ovocitos los cuales pueden ser incorporados a las técnicas de FIV y consecuentemente a la transferencia de embriones durante toda la vida de la donadora. En la FIV puede utilizarse semen fresco o congelado, que, si es del mismo individuo no muestra diferencias para la obtención de blastocistos. El uso de gradientes de PERCOLL para tratar el semen previamente a la FIV, puede ser de gran trascendencia. La utilización de semen congelado en época reproductiva o no reproductiva, no tiene diferencia significativa. Es de gran relevancia el vigilar el día de formación de blastocistos in vitro para que sea sincrónicamente con los días de las

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos – Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. E-mail: alvarez.horacio@inifap.gob.mx, alvarezgh1802@gmail.com,

² Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail: sromo_99@yahoo.com,

³ H&A Biotecnologías en Reproducción Animal. E-mail: velazquezra0809@gmail.com,

⁴ Campo Experimental Centro Altos de Jalisco – Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. E-mail: villasenor.fernando@inifap.gob.mx,

⁵ Conservation, Genetics & Biotech,

⁶ Mayville State University. E-mail: mkjelland@hotmail.com

receptoras, a fin de obtener los mejores resultados en implantación. En dado caso, es conveniente la criopreservación de los blastocistos para asegurar dicha sincronización. Se espera que la técnica de producción *in vitro* de embriones de ovino y su transferencia en nuestro país, aumente considerablemente, como ya se hace en otros países.

Palabras clave: Embriones, Producción *in vitro*, Transferencia.

Introducción

Producción de embriones ovinos

Actualmente, la producción *in vivo* de embriones ovinos (IVD) mejor conocida como MOET (multiovulación y transferencia de embriones), es el principal, por no decir, el único método utilizado para generar embriones en pequeños rumiantes en México, aunque existe un reporte de las primeras crías producidas en México con embriones ovinos producidos *in vitro* (Hernández et al., 2016). La colección de embriones se realiza por el método quirúrgico (laparotomía), el cual es el más utilizado a nivel mundial, debido a las características anatómicas del cérvix en los ovinos, sin embargo, esta técnica tiene muchos inconvenientes, entre los que destacan las adherencias y el trauma postoperatorio, el tiempo prolongado entre un procedimiento y otro (Jorge-Neto et al., 2018), lo cual hace que se pueda repetir el proceso de 4 a 5 veces como máximo, en la gran mayoría de las donadoras.

Como alternativa a la colección de embriones quirúrgica, en los últimos años muchos investigadores han estado trabajando en el desarrollo de una técnica no quirúrgica (dilatando el cérvix), utilizando sustancias como el misoprostol, prostaglandina F_{2α} y estrógenos principalmente. Aunque hay resultados prometedores (penetración completa del cérvix que va de 27-78% de las donadoras, recuperación de medio de lavado de alrededor del 88 al 91% (Fonseca et al., 2019; da

Fonseca et al., 2019), pese a estos resultados prometedores, aún falta desarrollar esta técnica para que pueda reemplazar al lavado quirúrgico.

Considerando lo anteriormente mencionado, la producción *in vitro* de embriones ovinos (IVP) surge como una alternativa, tanto para el mejoramiento genético como para la conservación, mediante la aspiración folicular vía laparoscópica o mejor conocida como LOPU por sus siglas en inglés (Laparoscopic Ovum Pick Up), la cual es altamente repetible, poco invasiva (ya que no genera adherencias), con poco tiempo de ejecución (15 minutos aproximadamente por donadora) y con un periodo entre procedimientos de 14 días en comparación con la colección quirúrgica de 60 días entre una colecta de embriones y otra (Jorge-Neto et al., 2018) sin embargo, se requiere de personal altamente capacitado y de un laboratorio de producción *in vitro* de embriones.

En la actualidad en México no se realiza la IVP, sin embargo, en los Estados Unidos de Norteamérica la IVP se aplica comercialmente de forma muy somera, en comparación con la IVD (Tabla 1), según lo reportado por la Sociedad Internacional de Tecnologías en Embriones (IETS) en 2020 (Viana, 2021).

Tabla 1. Producción in vivo e in vitro de embriones ovinos en 2020.

País / Región	Embriones IVD				Embriones IVP						
	Lavados	Embriones	Embriones transferidos			Dona- doras	Ovo- citos	Em- briones	Embriones transfe- ridos		
			Frescos	Congelados	Na- cional				Importa- do	Fres- cos	Congelados
Europa											
Portugal	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	
Rumania	4	27	27	0	0	0	0	0	0	0	
Rusia	0	0	0	0	2,683	0	0	0	0	0	
Serbia	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	
España	3	35	15	0	0	0	0	0	0	0	
Suiza	0	0	0	0	285	0	0	0	0	0	
Reino Unido	187	904	904	35	0	0	0	0	0	0	

País / Región	Embriones IVD					Embriones IVP					
	Lavados	Embriones	Embriones transferidos			Dona- doras	Ovo- citos	Em- briones	Embriones transfe- ridos		
			Frescos	Congelados					Fres- cos	Congelados	
				Na- cional	Impor- tado						Na- cional
Total	194	966	958	43	2,968	0	0	0	0	0	0
N América											
Canadá	0	0	0	0	516	0	0	0	0	0	0
México	55	396	335	110	0	0	0	0	0	0	0
EUA	1,323	8,808	8,319	457	0	33	311	141	93	0	0
Total	1,378	9,204	8,654	567	516	33	311	141	93	0	0
Oceanía											
Australia	1,677	12,427	11,927	494	0	0	0	0	0	0	0
Total	1,677	12,427	11,927	494	0	0	0	0	0	0	0
S América											
Brasil	888	7,203	5,616	953	0	0	0	0	0	0	0
Perú	5	19	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	893	7,222	5,620	953	0	0	0	0	0	0	0
Total Global	4,142	29,819	27,159	2,057	3,484	33	311	141	93	0	0

Total de embriones ovinos producidos in vivo e in vitro por país y región durante 2020 (Viana, 2021).

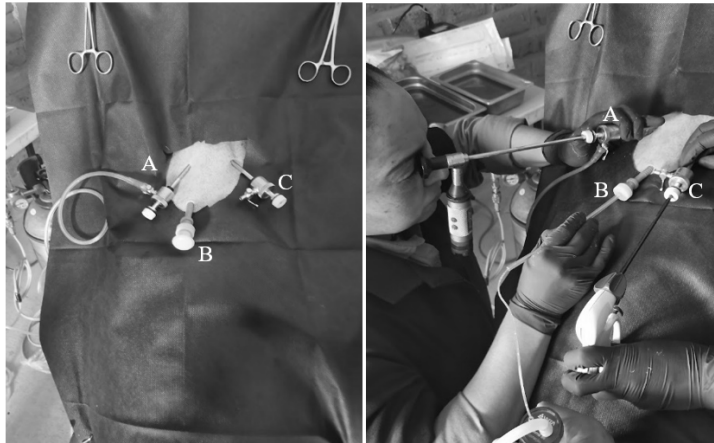
Aspiración folicular vía laparoscópica (LOPU)

La LOPU es la técnica más confiable y eficiente para colectar ovocitos de alta calidad de animales vivos y en algunos casos de animales de edad avanzada, lo que permite su uso para la IVP. Esta técnica tiene aplicación en ovinos, caprinos, bovinos, búfalos (Jorge-Neto et al., 2018), cérvidos (Locatelli et al., 2006) y cerdos (Brüssow et al., 1997) principalmente, además de jugar un papel importante en la conservación de especies. La repetición de la LOPU en la misma donadora no causa secuelas con impacto en la vida reproductiva de la hembra, incluso cuando se realiza en animales prepúberes o silvestres. Otra ventaja de la LOPU es que se puede realizar en pequeños rumiantes aun cuando se encuentren fuera de temporada reproductiva, además de poder aplicarla en animales prepúberes (Jorge-Neto et al., 2018).

En pequeños rumiantes, la LOPU seguida de producción de la IVP y transferencia embrionaria (TE) es la forma más eficiente de producir una mayor cantidad de crías a partir de hembras de genética y productividad sobresaliente. En programas de mejoramiento genético, esto permite incrementar el diferencial de selección y de esa manera acelerar la velocidad del progreso genético.

La LOPU se realiza bajo anestesia; a nivel de campo, nuestro equipo utiliza 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 es colocada en decúbito dorsal en una camilla laparoscópica para rasurar y desinfectar la zona abdominal inmediatamente craneal a la ubre; posteriormente se levanta la camilla con la cabeza hacia abajo en un ángulo aproximado de 45-60 grados, de tal modo que los órganos digestivos se descansen sobre el diafragma y permitan aislar el útero y los ovarios. Se procede a colocar un campo quirúrgico dejando un área aproximada de 15 x 15 cm; se colocan tres trocares (un trocar para el endoscopio, otro para una pinza atraumática y otro para el mandril de aspiración, todos preferentemente de 5 mm) (Figura 1) para poder acceder a la cavidad abdominal, lo que nos permite realmente minimizar el grado de trauma quirúrgico. Para aumentar la

capacidad de visualización, se realiza un neumoperitoneo, insuflando la cavidad abdominal con CO₂.



Preparación de la zona de manipulación, en donde A) camisa en la que se coloca el endoscopio, B) camisa en la que se coloca el mandril de aspiración y C) camisa en la que se coloca la pinza atraumática para sujetar el ovario.

Figura 1. Posición de los trócares, endoscopio, pinza y mandril de aspiración.

La visualización se realiza mediante un endoscopio rígido de 0° de 5mm, asociado con el mandril de aspiración, el cual está compuesto por tubo de acero inoxidable o acrílico de 5 mm de diámetro, unido a una aguja de 20G de bisel corto, la cual se conecta a una manguera siliconizada que desemboca en un tubo de colección de 50 mL el que a su vez está conectado con la bomba de vacío (Figura 2). La presión de vacío se gradúa a una velocidad de 50-70 gotas por minuto. Una vez que los 3 trócares han sido debidamente insertados y se ha introducido a través de ellos el laparoscopio, la pinza de sujeción atraumática y la pipeta de aspiración, se procede con la punción folicular. Para realizar la punción folicular, el ovario se sujeta con la pinza atraumática y se gira en diferentes direcciones para ver toda la superficie del ovario y así puncionar todos los folículos de más de 2 mm de diámetro. El procedimiento se repite en ambos ovarios, y se lavan los ovarios con solución fisiológica heparinizada, a efecto de eliminar cualquier resto de sangre y que no se formen adherencias.



Sistema de aspiración que consta de A) bomba de aspiración, B) manguera y filtro de vacío, C) tubo de colecta y D) mandril de aspiración

Figura 2. Sistema de aspiración.

Otro aspecto por resaltar es que se requiere de estimulación hormonal en las donadoras, debido a que los ovarios generalmente son pequeños y con el fin de facilitar la punción (Baldassarre et al., 2007). Es importante aplicar prostaglandina F2 α previo a la LOPU debido a que, si hay presencia de algún cuerpo lúteo, los sangrados son mayores debido a la alta irrigación en dicha estructura (Vilá et al., 2007).

Producción in vitro de embriones ovinos (IVP)

La IVP es una biotecnología que es aplicada con dos objetivos, generar progenie a partir de embriones de donantes genéticamente superiores y generar embriones para programas de conservación, ya sea para obtener crías o para generar bancos de germoplasma.

Esta técnica requiere de varios pasos: 1) la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos colectados, 2) la fertilización *in vitro* (FIV) que comprende la co-incubación de los ovocitos madurados con los espermatozoides seleccionados y capacitados y 3) el cultivo *in vitro* (CIV) que va desde los cigotos hasta la etapa de blastocistos.

Para la IVP, se han utilizado los mismos medios empleados para bovinos, como son: el medio Charles Rosenkrans (CR1) (Rosenkrans y First, 1994), el fluido oviductal sintético (SOF) (Gardner et al., 1994) y el medio optimizado simple de potasio (KSOM) (Liu y Foote, 1995).

Investigaciones realizadas en IVP

1. Evaluación del tipo de semen para FIV

Para poder llevar la IVP de manera exitosa, la calidad del semen es uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta. En el caso de los ovinos, es una práctica común el uso de semen fresco para la FIV, sin embargo, esto puede llegar a ser un problema debido a que están bien documentadas las diferencias que existen entre eyaculados del mismo animal, lo cual es una fuente de variación importante en los resultados de la IVP. Con base en lo anterior, se realizó la evaluación de la IVP utilizando semen fresco y semen congelado del mismo seminal. Los resultados de este trabajo muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el semen fresco y el semen congelado para las variables de porcentaje de divisiones, porcentaje de embriones de 8 células y porcentaje de blastocistos, con lo que se concluyó que se pueden usar tanto semen fresco como congelado con resultados similares (Figura 3).

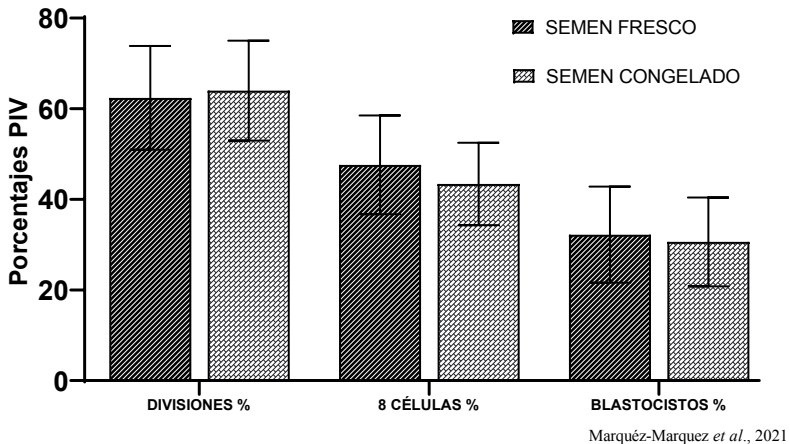


Figura 3. Resumen de IVP en ovinos utilizando semen fresco y semen congelado.

2. Evaluación de la selección espermática para FIV

Los métodos de selección espermática son utilizados rutinariamente para preparar el semen para FIV. Estos procedimientos aumentan la calidad espermática y sirven para remover el plasma seminal, el diluyente y restos celulares. El método de los gradientes de PERCOLL, es ampliamente empleado en los laboratorios de FIV en animales. Se han utilizado diferentes concentraciones de gradientes, volúmenes, tiempos y fuerza de centrifugación con el fin de incrementar la recuperación de espermatozoides vivos y aumentar la calidad espermática (motilidad, integridad acrosomal). En base a esto se evaluaron dos concentraciones de gradientes para la selección espermática: 1) 45-90% (control) y 2) 40-80% (tratamiento), utilizando semen congelado del mismo semental. No se encontraron diferencias para ambos grupos para las variables de porcentaje de divisiones y embriones de 8 células, aunque el porcentaje de divisiones tendió a ser estadísticamente significativo ($P = 0.06$) a favor del grupo tratado. Con respecto al porcentaje de blastocistos hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$) a favor del grupo tratado. Con estos resultados se puede concluir que el Percoll 40-80% incrementa el porcentaje de blastocistos (Figura 4).

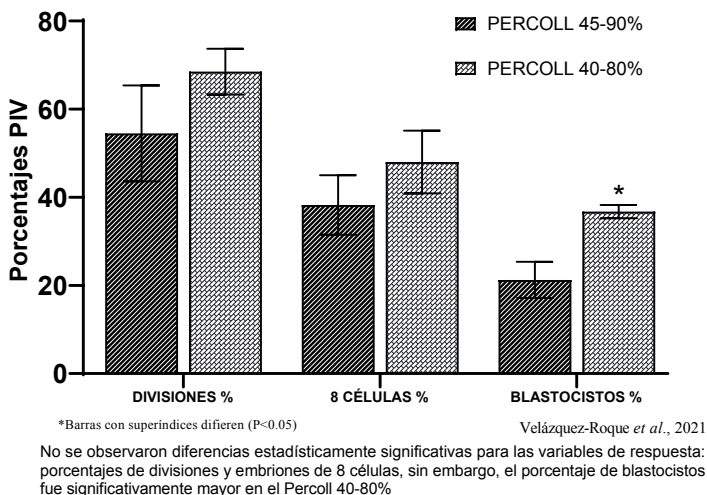


Figura 4. Resumen del IVP en ovinos utilizando diferentes concentraciones de PERCOLL en la selección espermática para FIV.

3. Evaluación de semen congelado en temporada y fuera de temporada reproductiva para FIV

Es bien sabida la diferencia que existe entre los eyaculados del mismo animal, sin embargo, también se sabe que el efecto de la temporada reproductiva repercute sobre la calidad espermática en los ovinos. Por tal motivo se evaluó el efecto de la temporada reproductiva y no reproductiva sobre el semen utilizado para la IVP. Se congeló semen del mismo macho (Dorper) en temporada reproductiva (octubre) y fuera de temporada reproductiva (mayo) y se utilizó para la FIV. No hubo diferencias estadísticas entre ambos grupos para el porcentaje de divisiones, embriones de 8 células y blastocistos, sin embargo, hubo mayor porcentaje de blastocistos con el semen congelado en temporada reproductiva, aunque esta diferencia no fue significativa ($P=0.07$). Nuestros resultados muestran que el semen congelado en temporada y fuera de temporada reproductiva, se comportan similar en la IVP (Figura 5).

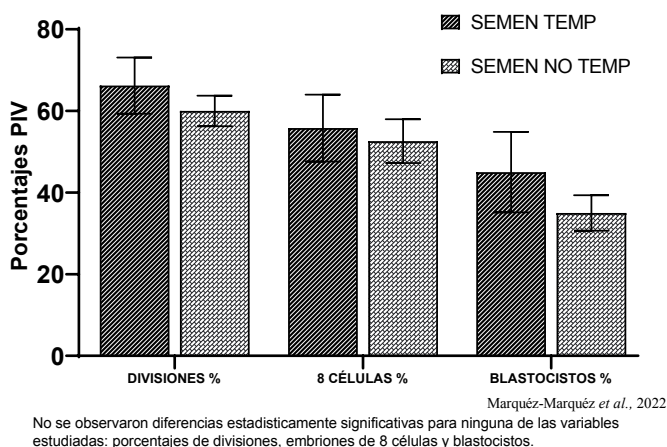


Figura 5. Resumen de IVP utilizando semen congelado en temporada reproductiva y fuera de temporada de reproductividad.

4. Dificultades encontradas para aplicar la IVP

Un problema recurrente, es el estado sanitario del semen. En México, la gran mayoría de los programas reproductivos utilizan semen procesado a nivel de campo, y aunque no presenta mayores complicaciones al aplicarlo en las principales biotecnologías (inseminación artificial y MOET), en el caso de la IVP es una fuente de contaminación. Esto implica que el semen deba de someterse a mayor manipulación para tratar de evitar la contaminación lo cual repercute directamente en la producción de embriones.

En la experiencia de nuestro grupo, hemos encontrado que la distribución de la producción de blastocistos entre los días 6, 7 y 8 de CIV es muy variable (Tabla 2). Esto implica un problema si se pretende realizar TE con embriones frescos, ya que, si los embriones alcanzan el estadio de blastocisto en el día 7 de CIV, se tendrían receptoras sincronizadas en día 6 y ya habría una asincronía de un día o en su caso hasta de dos días si se obtienen blastocistos en día 8 de CIV.

Tabla 2. Distribución de la producción de blastocistos

	Día 6	Día 7	Día 8	Total
Media	19.1	12.0	1.18	33.8
Mínimo	2	0	0	16
Máximo	38	29	10	58

Distribución de la producción de blastocistos de acuerdo con el día de CIV

Al no poder tener una certeza de cómo se va a distribuir la producción de blastocistos, una alternativa es la criopreservación, aunque se debe de tener en cuenta que la fertilidad se va a ver afectada.

5. Evaluación de la criopreservación de embriones IVP

Considerando nuestros resultados de IVP y la distribución de la producción de blastocistos, nuestro equipo inició con las pruebas de criopreservación. Tomando en cuenta resultados previos con congelamiento lento de embriones bovinos producidos *in vitro*, se deci-

dió evaluar la respuesta al congelamiento lento utilizando glicerol y etilenglicol. Obteniéndose 58.7 y 81.7% de reexpansión para los embriones congelados en glicerol y etilenglicol respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P<0.001$). En cuanto a la eclosión, se tuvieron un 76.6 y 80.9% de eclosión para los embriones congelados en glicerol y etilenglicol respectivamente. Con estos resultados se concluyó que el etilenglicol fue el mejor crioprotector para el congelamiento lento de embriones IVP (Datos en proceso de publicación).

6. Primeras crías producidas en México a partir de embriones IVP criopreservados

Una vez que ya se tuvo el protocolo de criopreservación, se procedió a la TE de los embriones criopreservados con el objetivo de evaluar la fertilidad de los embriones IVP congelados. Se realizaron transferencias de 2 blastocistos por receptora y al diagnóstico a los 40 días de gestación, obtuvimos un 53.5% de receptoras gestantes, de las cuales el 40% fueron gestaciones gemelares. Solo el 45% de las receptoras llegaron a parto (Figuras 6 y 7), lo cual indica una pérdida de gestaciones del 8.5%. Extrañamente no se tuvieron partos gemelares, aun cuando se había diagnosticado un alto número de gestaciones gemelares (Datos en proceso de publicación).



Figura 6. Receptoras con sus crías producidas por embrión in vitro.



Figura 7. Crías producto de transferencia de embriones producidos *in vitro*.

A pesar de no ser una biotecnología muy empleada hasta el momento, la IVP va a tener un papel muy importante en la producción de embriones en pequeños rumiantes en México, ya que las donadoras se van a poder utilizar por periodos más prolongados sin las complicaciones que sufren después de la MOET, sin embargo, se debe ser claro en que no es una tecnología que esté peleada con la MOET, son tecnologías que se complementan.

La IVP también va a tomar mucha relevancia en los programas de conservación, ya que en muchas ocasiones las donantes son animales viejos o con problemas de fertilidad que no son una opción para las biotecnologías tradicionales (IA y MOET), además de que con la IVP se puede maximizar el recurso genético al poder utilizar muy poco semen para fertilizar varios ovocitos o utilizar una misma donadora con diferentes sementales.

Un factor muy importante para considerar es que se requiere de gran infraestructura y de mucha capacitación de los técnicos para que puedan aplicar la IVP.

Referencias bibliográficas

- Baldassarre, H., Rao, K.M., Neveu, N., Brochu, E., Begin, I., Behboodi, E., & Hockley D.K. (2007). Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19(5):612-6.
- Brüssow, K.P., Torner, H., Rátky, J., Hunter, M.G., & Nürnberg, G. (1997). Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. *Acta Veterinaria Hungarica*, 45(2):189-96.
- da Fonseca, J.F., Zambrini, F.N., Guimarães, J.D., Silva, M.R., Oliveira, M.E.F., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M., & Souza-Fabjan, J.M.G. (2019). Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(1):118-125.
- Fonseca, J.F., Zambrini, F.N., Guimarães, J.D., Silva, M.R., Oliveira, M.E.F., Bartlewski, P.M., & Souza-Fabjan, J.M.G. (2019). Cervical penetration rates and efficiency of non-surgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. *Animal Reproduction Science*, 203:25-32.
- Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., & Batt, P.A. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*, 50: 390-400.
- Hernández, P.J.E., Ortiz, F., Rodríguez, J.L., Ducolomb, Y., Fernández, R.F., Betancourt, M., Casas, E., Heuze, Y., Kjelland, M.E., Romo, S. (2016). Use of IVF and ET in mexican criollo sheep (*Ovis aries*): Immediate and delayed embryo transfers. *Advances in Reproductive Sciences*, 4:8-16.

- Jorge-Neto, P.N., Alecho, R.L., Schilbach, P.C., & Baldassarre, H. (2018). Laparoscopic ovum pick-up (LOPU): from animal production to conservation. *Spermova*, 8(1): 61-67.
- Liu, Z., & Foote, R.H. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty-five percent O₂. *Biology of Reproduction*, 53: 786-790.
- Locatelli, Y., Vallet, J.C., Huyghe, F.P., Cognié, Y., Legendre, X., & Mermillod, P. (2006). Laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* production of sika deer embryos: effect of season and culture conditions. *Theriogenology*, 66(5):1334-42.
- Márquez-Márquez, G., Romo-Domínguez, S., Velázquez-Roque, A., Álvarez-Gallardo, H., Kjelland, M., Villaseñor-González, F., & Romo, S. (2021). The production of ovine embryos *in vitro* using frozen-thawed semen processed in the breeding and non-breeding seasons. *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2) 269-269.
- Márquez-Márquez, G., Velázquez-Roque, A., Villaseñor-González, F., Kjelland, M., Álvarez-Gallardo, H., & Romo, S. (2021). *In vitro* production of ovine embryos using either fresh or frozen-thawed semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 33 (1) 141.
- Rosenkrans, C.F. Jr., & First, N.L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 72(2): 434-437.
- Viana, J.H.M. (2021). 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter – IETS*, 39 (4): 24-38
- Vilá, V.V., Pérez, A.M.L., Perozo, P.E., Riera, N.M., & Rivera, L. (2007). Vascularización arterial del ovario durante el ciclo estral en ovinos. *Revista Científica*, 17(4): 341-348.
- Velázquez-Roque, A., Villaseñor-González, F., Márquez-Márquez, G., Kjelland, M., Álvarez-Gallardo, H., & Romo, S. (2021). Comparison of two percoll gradients for selection of frozen semen for *in vitro* production of ovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 33 (1) 141.

CAPÍTULO 5

Producción in vitro de embriones bovinos con semen SexedULTRA-4M™: Investigaciones realizadas en México

Horacio Álvarez Gallardo^{1,2}, Salvador Romo García², Michael Edward Kjelland^{3,4} y Adriana Velázquez Roque⁵

Resumen

Desde hace tiempo, la pretendida asignación del sexo en embriones de ganado bovino ha sido compleja, pues los resultados con diferentes biotecnologías de reproducción a través de la selección de espermatozoides X o Y no eran lo suficientemente constantes y eficientes, lo cual cambió considerablemente cuando se incorporó en este campo a la citometría de flujo, sin embargo aún tuvieron que pasar cerca de 20 años, para que se detectara de manera eficiente el 3.8% de ADN que posee de manera adicional el cromosoma X con respecto al Y. Al inicio del uso de la citometría, la pérdida en una muestra espermática analizada por este proceso era cerca del 80%, considerando los espermatozoides no detectados y la velocidad del sistema. Actualmente los citómetros de nueva generación (Génesis III) y la técnica conocida comercialmente como SexedULTRA-4M™. permiten obtener mayor eficiencia de sexado y en mejor tiempo. Las pajillas de espermatozoides sexados han mostrado mejores resultados en la formación de

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos – INIFAP. E-mail: alvarez.horacio@inifap.gob.mx, alvarez-gh1802@gmail.com,

² Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM. E-mail: sromo_99@yahoo.com,

³ Conservation, Genetics & Biotech,

⁴ Mayville State University. E-mail: mjkjelland@hotmail.com,

⁵ H&A Biotecnologías en Reproducción Animal. E-mail: velazquezra0809@gmail.com

blastocistos en la Producción in vitro de embriones en comparación al semen no sexado.

Palabras clave: Sexado de semen, bovinos, SexedULTRA-4M™.

Introducción

Antecedentes del sexado espermático

Hablando de biotecnologías reproductivas en ganado bovino, la selección del sexo tiene una larga historia. A lo largo del tiempo, muchos investigadores trataron de separar los espermatozoides con cromosomas X y Y mediante varias técnicas, basándose en principios de diferencia de masa y motilidad, patrones de nado, cambios en la superficie del espermatozoide y diferencias de volumen (Seidel y Garner, 2002). Sin embargo, ninguno de estos métodos fue capaz de producir la separación de espermatozoides fértiles de manera eficaz.

La predeterminación del sexo se pudo lograr gracias a los avances en la computación, biofísica, biología celular y fisiología reproductiva aplicada. A partir de la década de 1980 comenzó a aplicarse una técnica denominada citometría de flujo, la cual permitió separar los espermatozoides de acuerdo con sus cromosomas sexuales. Tomó alrededor de 20 años que esta tecnología fuera comercializada para su uso en inseminación artificial en ganado bovino. Esta técnica se basa en diferenciar los espermatozoides X y Y en base a su contenido de ADN. En el caso de los bovinos, los espermatozoides X que producen hembras contienen un promedio de 3.8% más ADN que los espermatozoides Y que producen machos (Garner, 2001). El sexado de espermatozoides por medio de citometría de flujo es una herramienta valiosa que indudablemente tuvo un impacto benéfico en el mejoramiento genético de la industria ganadera. Esta tecnología, tenía una eficacia del 85-95%, sin embargo, no estaba completamente perfeccionada (Garner y Seidel, 2003).

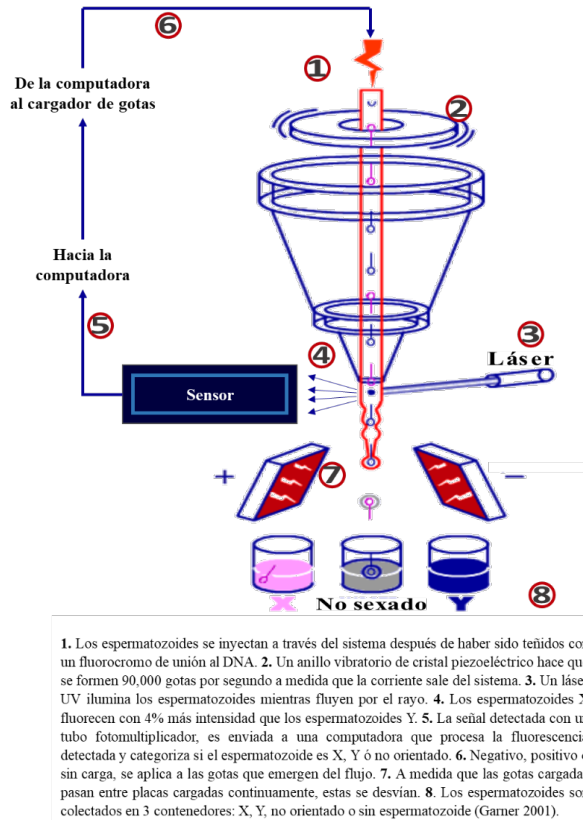


Figura 1. Sistema de clasificación de espermatozoides por citometría de flujo.

Los espermatozoides con cromosomas X y Y pueden ser separados en base al contenido de ADN usando citometría de flujo (Garner, 2001; Garner y Seidel, 2003). De manera convencional, el citómetro de flujo consiste en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos que permite alinear y leer los espermatozoides individualmente en microgotas. La fluorescencia que produce cada espermatozoide teñido es procesada por un software que permite al operador seleccionar la población espermática con mínima o máxima luminosidad según el sexo que se quiera separar. Los espermatozoides elegidos son cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente recolectados (Oses et al., 2009) (Figura 1).

Después se concentran mediante centrifugación y posteriormente son congelados, quedando vivos solo la mitad del total (Seidel, 2009). El sexado espermático convencional tiene una eficacia del 85-95% (Garner y Seidel, 2003). En los citómetros de flujo de alta velocidad conocidos como MoFlo SX (Figura 2), los espermatozoides pasaban a una velocidad de 80 km/h, aproximadamente 20,000 espermatozoides totales/segundo (Garner y Seidel, 2003), con lo que se requería de 9 minutos para sexar una pajilla de 2.1 millones de espermatozoides, lo cual solo conseguía generar aproximadamente 7 pajillas por hora (Garner y Seidel, 2008).

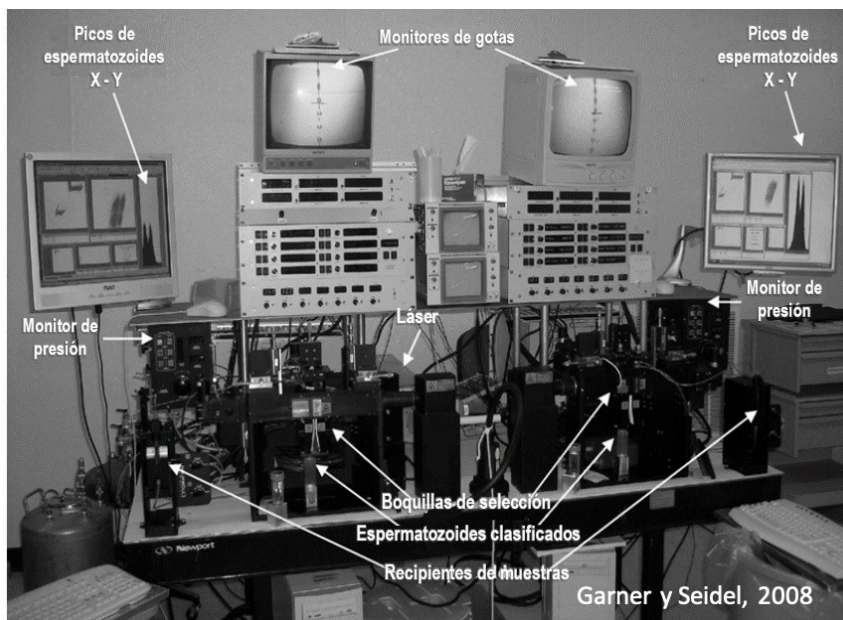


Figura 2. Citómetro MoFlowST™.

La motilidad, morfología y concentración espermática de los eyaculados eran los factores más importantes para obtener una buena separación de las dos poblaciones, ya que se observó una alta correlación entre la motilidad, la concentración y la separación de las poblaciones con citómetros de flujo de alta velocidad. Por lo tanto, para la separación de espermatozoides X y Y se necesitaban eyaculados con más

del 50% de motilidad progresiva y 75% de espermatozoides normales (Oses et al., 2009).

El semen sexado se comercializaba en pajillas de 0.25 ml a una concentración de 2.1 millones de espermatozoides (Garner y Seidel, 2008). Esta concentración se debía a que, al momento de sexar el semen, se perdía aproximadamente un 80% del eyaculado entre los espermatozoides del sexo no deseado y los espermatozoides que no se lograban diferenciar (Oses et al., 2009). Este semen era menos fértil y más delicado que el semen convencional debido a que los espermatozoides eran sometidos a varios procesos para la separación de los espermatozoides con cromosoma “X” y los de cromosoma “Y”, además del proceso de congelado (Espinosa y Córdova, 2012).

La primera producción comercial de semen sexado fue en la compañía Cogent en el Reino Unido (Seidel, 2009). Aunque tuvo un inicio relativamente lento, aumentó exponencialmente la producción de semen sexado bovino con un estimado de 4 millones de dosis en el 2008 (Seidel, 2009). A pesar de las limitantes del semen sexado, claramente hubo una buena aceptación (Seidel, 2009). Se consiguieron porcentajes de gestación aceptables con la dosis reducida (2.1×10^6 espermatozoides) de semen sexado en vaquillas, pero no fue así en el caso de vacas lactantes (Garner, 2001).

Modificaciones a la técnica de sexado espermático

En la actualidad la tecnología del sexado espermático ha evolucionado, modificando las técnicas (incrementando la velocidad del sexado, disminuyendo el estrés, incrementando la concentración espermática y por ende mejorando los parámetros de viabilidad espermática) a lo que hoy se conoce como SexedULTRA-4M™. Aunque en la actualidad existen muy pocos datos acerca de esta nueva tecnología, se ha reportado que, en esta nueva técnica, se alteró la fisiología espermática para facilitar el ingreso del fluorocromo Hoechst 33342 y para retenerlo dentro de la célula, lo que permite que haya mayor fluorescencia y con esto se logre una mejor discriminación entre las poblaciones “X”

y “Y”. Por otra parte, el proceso de criopreservación es otro paso muy estresante para la célula espermática, por lo cual, la tecnología SexedULTRA™ se ideó para simplificar y optimizar los medios y controlar estos agentes estresores para el espermatozoide. Se modificó el protocolo, con un tratamiento previo al proceso de tinción, además del uso de un nuevo medio de tinción que mantiene el pH estable durante un periodo de tiempo más prolongado. El medio de congelamiento también fue modificado, tomando en cuenta la dosis de semen sexado.

En el éxito del proceso de ultrasexado influyeron principalmente dos factores: las modificaciones en los medios y los equipos para realizar el sexado. Los modernos citómetros Genesis III (Figura 3) pueden hacer la separación de subpoblaciones de ~8000 espermatozoides/segundo con ~90% de pureza, alcanzando un máximo de separación de 500 millones de espermatozoides/hora (Vishwanath y Moreno, 2018).



Figura 3. Citómetros de última generación para sexado espermático.

Con estos cambios, en las pruebas de laboratorio se incrementó la motilidad espermática, así como la integridad del acrosoma con respecto al sexado convencional considerando las mismas concentraciones espermáticas (Gonzalez-Marin et al., 2017).

Por otra parte, al evaluar la calidad espermática considerado integridad de la membrana plasmática (VIA), porcentaje de acrosomas intactos (PIA) e índice de fragmentación de ADN (DFI) del semen SexedULTRA™ comparado con el semen convencional, en el semen SexedULTRA™ a las 3 horas post-descongelado, el PIA fue significativamente mayor con respecto al semen convencional. En cuanto al DFI, el semen SexedULTRA™ tuvo un DFI significativamente menor en todos los puntos de evaluación con respecto al semen convencional. Con estos datos, los autores concluyeron que la tecnología SexedULTRA™ mantiene la calidad del semen y en muchos casos tiene mayor longevidad *in vitro* comparado con el semen convencional (Gonzalez-Marin et al., 2018).

Producción *in vitro* de embriones bovinos (PIV) con semen sexado

En el caso de la asociación de biotecnologías, una de las más exitosas ha sido sin lugar a duda la PIV y el sexado espermático. Históricamente siempre se ha considerado que el método más económico de usar el semen sexado en programas de reproducción en ganado bovino es a través de la producción *in vitro* de embriones (PIV), ya que con esta técnica se requiere una cantidad muy pequeña de espermatozoides. Sin embargo, los resultados con la PIV con semen sexado tienen los inconvenientes de los bajos porcentajes de fertilización, de divisiones, de producción de blastocistos, de preñez y la variación entre toros comparado con el semen convencional (Wheeler et al., 2006).

Investigaciones realizadas en PIV con semen SexedULTRA-4M™

1. Comparación del semen SexedULTRA-4M con semen convencional para PIV

Para este experimento se utilizaron un total de 4000 ovocitos (obtenidos a partir de ovarios de rastro) para la PIV. Para la FIV se emplearon cuatro toros de la raza Angus Negro (1000 ovocitos por toro), de los cuales se utilizó semen sexado SexedULTRA-4M™ con cromosoma “X” (500 ovocitos por toro) y semen convencional (500 ovocitos por toro) de cada toro. Una vez fertilizados, los presuntos cigotos se colocaron en cultivo durante 7 días. Al evaluar el comportamiento de acuerdo con el tipo de semen con los promedios de los cuatro toros evaluados, con el semen SexedULTRA-4M™ hubo mayor porcentaje de divisiones (58.10%) con respecto al semen convencional (54.45%) siendo estadísticamente significativo ($P=0.01$). Para la variable de porcentaje de embriones de 8 células no hubo diferencia significativa entre grupos, sin embargo, hay tendencia a ser significativo para el semen SexedULTRA-4M™. El porcentaje de blastocistos fue mayor significativamente ($P=0.009$) para el semen SexedULTRA-4M™ (27.15%) en comparación con el semen convencional (22.8%) (Figura 4).

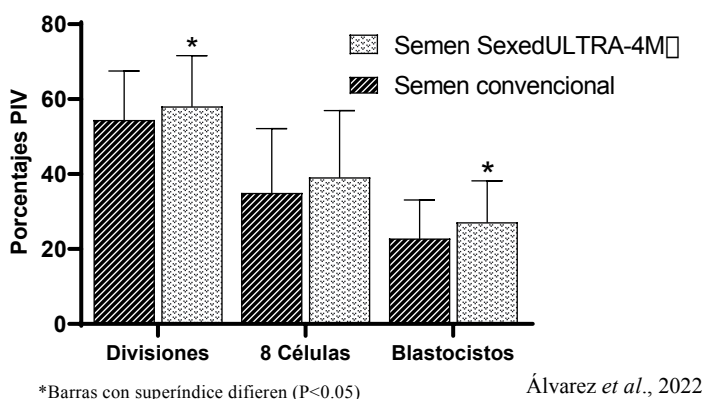


Figura 4. Resumen de la PIV utilizando semen convencional y semen SexedULTRA-4M (promedios de cuatro toros).

En el caso del comportamiento de acuerdo con los toros, no hubo diferencias estadísticamente significativas para todas las variables analizadas en el caso de los toros 1 y 4. Sin embargo, el toro 2 tuvo porcentajes de divisiones y de blastocistos significativamente superiores con el semen SexedULTRA-4M™ comparado con el semen convencional. En el caso del toro 3, el semen SexedULTRA-4M™ fue superior ($P < 0.05$) en el porcentaje de blastocistos con respecto al semen convencional.

En cuanto al tipo de semen por toro, todos los toros fueron diferentes para todas las variables estudiadas ($P > 0.05$). Sin embargo, para todas las variables estudiadas que no fueron diferentes entre el tipo de semen del mismo toro, si hubo diferencia aritmética a favor del semen SexedULTRA-4M™ con los toros 1 y 4. Con estos datos se pudo concluir que el semen SexedULTRA-4M con cromosoma “X” tiene resultados similares a los obtenidos con semen Convencional y en algunos casos superiores. El resumen de estos resultados se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la producción in vitro de embriones bovinos usando semen convencional Y SexedULTRA-4M™ de 4 toros (Álvarez et al., 2022).

Toro	Semen	Ovocitos N	Divisiones %	Embriones de 8 células %	Blastocistos %
1	Convencional	500	72.2 ± 5.63	59.8 ± 11.03	35.8 ± 6.42
	SexedULTRA-4M	500	75.6 ± 5.73	62.8 ± 13.92	40.4 ± 8.91
2	Convencional	500	46.2 ± 2.28 ^a	26.2 ± 1.92	20.4 ± 2.07 ^a
	SexedULTRA-4M	500	51 ± 3.32 ^b	29.8 ± 3.63	24.2 ± 2.77 ^b
3	Convencional	500	40.8 ± 2.28	18 ± 1.87	10.4 ± 1.14 ^a
	SexedULTRA-4M	500	43 ± 2.55	20.8 ± 2.58	14.2 ± 0.83 ^b
4	Convencional	500	58.6 ± 6.02	36 ± 6.48	24.6 ± 6.35
	SexedULTRA-4M	500	62.8 ± 7.79	43.2 ± 6.34	29.8 ± 6.65

Diferentes literales “a” y “b” en la misma columna, representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

2. Comparación del semen SexedULTRA-4M con cromosoma “X”, “Y” y semen convencional para la PIV

El objetivo del trabajo fue comparar semen SexedULTRA-4M con cromosoma “X”, semen SexedULTRA-4M con cromosoma “Y” y semen Convencional del mismo toro para la PIV. Para este trabajo se utilizaron 1500 ovocitos (obtenidos a partir de ovarios de rastro), 500 ovocitos para ser fertilizados con cada tipo de semen. Los porcentajes de divisiones fueron de 58.6 ± 6.02 , 62.8 ± 7.79 y 49.8 ± 5.36 , respectivamente para el semen Convencional, SexedULTRA-4M X y SexedULTRA-4M Y. Los porcentajes de embriones de 8 células fueron de 36 ± 6.48 , 43.2 ± 6.34 , y 26 ± 6.96 , respectivamente con semen Convencional, SexedULTRA-4M X y SexedULTRA-4M Y. El porcentaje de blastocistos en día 7 fue de 24.6 ± 6.35 para el semen Convencional, 29.8 ± 6.65 para el SexedULTRA-4M X y 9.8 ± 2.59 para el SexedULTRA-4M Y. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de divisiones y embriones de 8 células entre los grupos de semen Convencional y el de SexedULTRA-4M X, sin embargo, ambos fueron significativamente superiores ($P < 0.05$) comparados con el grupo SexedULTRA-4M Y. El porcentaje de blastocistos en día 7 fue significativamente superior para el grupo SexedULTRA-4M X comparado con los grupos de semen Convencional y SexedULTRA-4M Y, y para el grupo de semen Convencional comparado con el grupo SexedULTRA-4M Y (Figura 5). Con los resultados obtenidos se puede concluir que el semen SexedULTRA-4M tuvo mayor porcentaje de blastocistos que el semen Convencional y el SexedULTRA-4M Y.

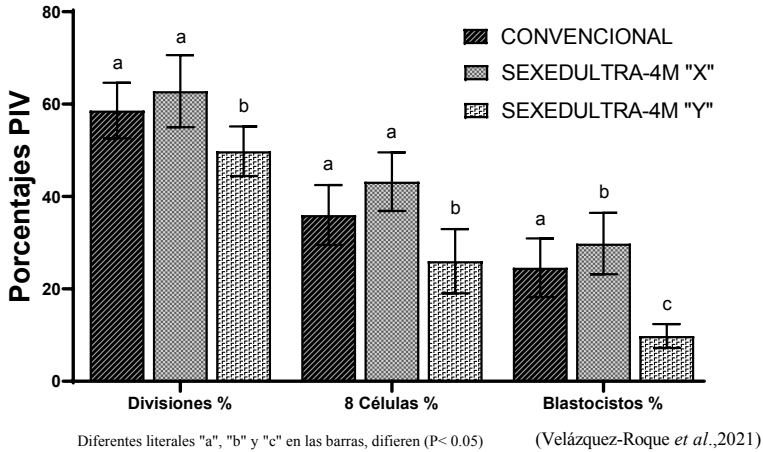
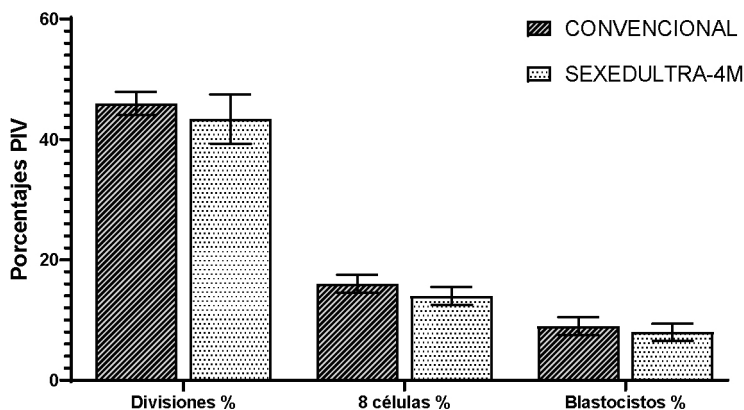


Figura 5. Resumen de PIV en bovinos utilizando semen convencional, SexedULTRA-4M con cromosoma "X" y cromosoma "Y".

3. Comparación del semen SexedULTRA-4M con semen convencional para PIV a partir de ovocitos de hembras prepúberes de razas de carne

El objetivo de esta investigación fue comparar el semen Convencional y el semen SexedULTRA-4M con cromosoma X para la PIV a partir de hembras prepúberes. Para la PIV se utilizaron ovarios colectados por medio de castración quirúrgica (para exportación a Estados Unidos) de hembras de 6 meses de edad con genotipo *Bos indicus* x *Bos taurus*. Los ovocitos madurados ($n=600$, en 5 réplicas) fueron divididos en dos grupos, el grupo semen Convencional y el grupo SexedULTRA-4M. El proceso de FIV se llevó a cabo con semen Convencional y SexedULTRA-4M del mismo toro. Los presuntos cigotos fueron colocados en CIV hasta el día 7. El porcentaje de divisiones para el semen Convencional fue de $46\% \pm 1.4$ y $43.2\% \pm 1.4$ para el SexedULTRA-4M. Para los embriones de 8 células los resultados fueron del $16\% \pm 0.6$ y $14\% \pm 0.6$ para Convencional and ULTRA-4M respectivamente. El porcentaje de blastocistos al día 7 para Convencional fue de $9\% \pm 0.6$ y $8\% \pm 0.6$ para ULTRA-4M. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos ($P > 0.05$) para todas las variables analizadas (Figura 6). En conclusión, bajo las condiciones

de este trabajo, el ULTRA-4M tiene resultados similares al Convencional para la PIV bovinos a partir de hembras prepúberes.



Velázquez *et al.*, 2019

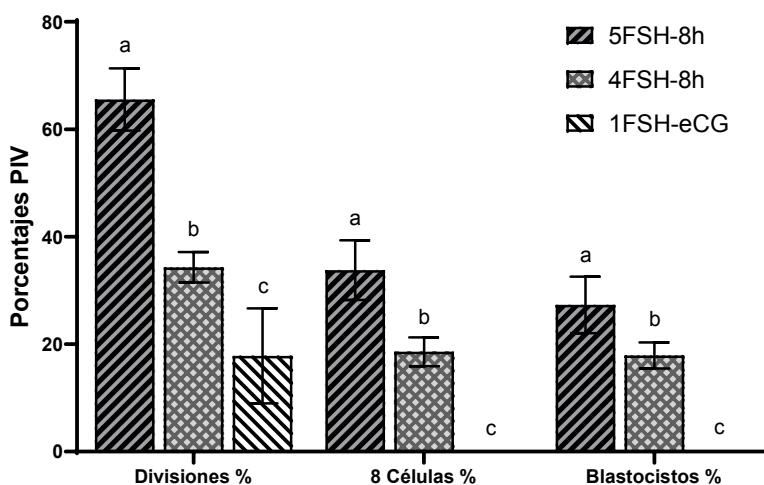
No hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables analizadas

Figura 6. Resumen de PIV en becerras prepúberes (*B taurus* x *B indicus*) utilizando semen convencional y SexedULTRA.

4. PIV con semen SexedULTRA-4M a partir de ovocitos de hembras Holstein prepúberes obtenidos por aspiración folicular laparoscópica (LOPU)

En este estudio se utilizó el semen SexedULTRA-4M con cromosoma X para la PIV a partir de hembras prepúberes. Para la PIV se utilizaron ovocitos colectados por medio de aspiración folicular laparoscópica (LOPU) a partir de 15 hembras de 3 meses de edad de la raza Holstein. Debido a los antecedentes que nuestro grupo de trabajo tenía trabajando PIV con hembras prepúberes, además de lo reportado en la literatura (Baldassarre *et al.*, 2018) se decidió realizar estimulación ovárica, 72 horas previo a la LOPU. Se evaluaron tres protocolos de estimulación (5 hembras por cada protocolo): 1) 5 aplicaciones de FSH cada 8 horas + eCG en la sexta aplicación (5FSH-8h); 2) 4 aplicaciones de FSH cada 8 horas + eCG en la quinta aplicación (4FSH-8h); 3) 1 aplicación de FSH + eCG (1FSH-eCG). Los ovocitos colectados (se mezclaron

los ovocitos de las donadoras de cada grupo para bloquear el efecto de la hembra) fueron madurados (5FSH-8h n=120; 4FSH-8h n=115; 1FSH-eCG n=96) y fertilizados *in vitro* con semen SexedULTRA-4M del mismo toro. Los presuntos cigotos fueron colocados en CIV hasta el día 7. Los porcentajes de divisiones fueron $63.33\% \pm 2.12$, $38.03\% \pm 2.8$ y $14.28\% \pm 1.4$ para los grupos 5FSH-8h, 4FSH-8h y 1FSH-eCG respectivamente. Para los embriones de 8 células los resultados para 5FSH-8h fueron de $33.33\% \pm 1.4$, para 4FSH-8h fueron $19.09\% \pm 0.7$ y para 1FSH-eCG $0\% \pm 0$. El porcentaje de blastocistos al día 7 para 5FSH-8h fue de $30\% \pm 2.4$, para 4FSH-8h fue $19\% \pm 1.06$ y para 1FSH-eCG fue $0\% \pm 0$. Todos los grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para todas las variables analizadas (Figura 7). En conclusión, bajo las condiciones de este trabajo, el tratamiento 5FSH-8h tuvo resultados similares de PIV con hembras prepúberes comparados con los que se obtienen con animales adultos utilizando semen SexedULTRA-4M con cromosoma X.



Diferentes literales "a", "b" y "c" en las barras, difieren ($P < 0.05$)

Trabajo en proceso de publicación

Figura 7. Resumen de PIV en becerras prepúberes Holstein utilizando semen SexedULTRA-4M-.

Consideraciones finales

Esta nueva tecnología de sexado espermático, hasta el momento está demostrando una mejoría sustancial tanto en inseminación artificial, en la mutiovolución y transferencia de embriones, así como en la PIV. Aún falta trabajo por hacer para acabar de perfeccionar la asociación de biotecnologías, pero sin lugar a dudas el sexado espermático SexedULTRA-4M va a ser un parteaguas en el mejoramiento genético tanto de ganado de leche como con el ganado de carne, además de que no nos debe sorprender su aplicación para el mejoramiento y rescate genéticos en otras especies animales.

Referencias bibliográficas

- Álvarez-Gallardo, H., Kjelland, M.E., Pérez-Martínez, M., Villaseñor-González, F., & Romo-García, S. (2022). Evaluation of novel SexedULTRA-4M technology for in vitro bovine embryo production. *Animal Reproduction*, 19(1): e20220018.
- Espinosa, C.R., & Córdova, A.I. (2012). Sexing sperm of domestic animals. *Tropical Animal Health Production*, 45(1): 1-8.
- Garner, D.L. (2001). Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. *Journal of Andrology*, 22(4): 519-26.
- Garner, D.L., & Seidel Jr, G.E. (2003). Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science*, 83: 375-384
- Garner, D.L., & Seidel Jr, G.E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69: 886-895.
- Gonzalez-Marin, C., Gongora, C.E., Guilligan, T.B., Evans, K.M., Moreno, J.F., & Vishwanath R. (2018). In Vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 114: 40-45.

- González-Marin, C., Lenz, R.W., Gilligan, T.B., Evans, K.M., Gongora, C.E., Moreno, J.F., Vishwanath, R. (2017). SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and *in vitro* fertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 29 (1): 204.
- Oses, M.V., Teruel, M.T., & Cabodevila, J.A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *RedVet*, 20: 138-145.
- Seidel Jr, G.E. (2009). Sperm sexing technology. The transition to commercial application. An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm". *Theriogenology*, 71: 1-3.
- Seidel Jr, G.E., & Garner, D.L. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124: 733-743.
- Velázquez, RA., Álvarez, GH., Kjelland, M., Villaseñor, GF., Ariza, G., & Romo, S. (2019). "In vitro embryo production using prepubertal calf oocytes with conventional semen and sexed semen ULTRA-4M". *Reproduction, Fertility and Development*, 32 (1): 162.
- Velázquez-Roque, A., Álvarez-Gallardo, H., Kjelland, M., Pérez-Martínez, M., Villaseñor-González, F., & Romo, S. (2021). Comparison of SexedULTRA-4M™ "X" and "Y" chromosome-bearing semen versus conventional for the *in vitro* production of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2): 268-268.
- Vishwanath, R., & Moreno, J.F. (2018). Review: Semen sexing – current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, 12:1 1-12.
- Wheeler, M.B., Rutledge, J.J., Fischer-Brown, A., VanEtten, T., Malusky, S., Beebe, D.J. (2006). Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1):219-27.

CAPÍTULO 6

Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en ovino de Pelo

*María Fernanda Soza Mata¹, Julio Porfirio Ramón Ugalde¹
y Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo^{2*}*

Resumen

Diversas investigaciones han demostrado que uno de los principales daños ocasionados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) es la fragmentación del ADN en los espermatozoides, el cual tiene un gran impacto en el éxito reproductivo, tanto *in vivo* como *in vitro*; pudiendo ocasionar fracaso en la fecundación, abortos y malformaciones. Por tal motivo, la integridad de la cromatina espermática ha sido reconocida como un parámetro de la calidad seminal y de la fecundidad, además de ser independiente de los parámetros comúnmente evaluados en el análisis seminal rutinario, requiriendo de técnicas especiales para su análisis. Sin embargo, algunas de las técnicas que se utilizan actualmente para medir el daño del ADN espermático presentan una baja reproducibilidad en los resultados y entre diferentes especies, así como equipo sofisticado para su análisis.

Palabras claves: ADN; Ovino; Fragmentación; ROS; Semen

¹ Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal. Antigua carretera Mérida-Motul km 16.3, Conkal, C. P. 97345, Yucatán, México. E-mail: julio.ramon@itconkal.edu.mx, fercho_soza15@hotmail.com,

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. E-mail: dominguez.alvaro@inifap.gob.mx.

Introducción

Los ovinos de pelo, Pelibuey, Blackbelly, considerados como razas maternas, son de las razas que han visto descender su inventario en los últimos años en México, por lo cual hoy en día se encuentran amenazadas (González et al., 2004; Aguilar et al., 2017). El peligro se cierne desde el punto de vista genético, ya que están siendo absorbidas por razas paternas (sintéticas) de reciente introducción al país. El ganadero con cierto criterio productivo, está aprovechando las cualidades de ambas aportaciones genéticas. Por una parte, las razas maternas o sea el ovino de pelo autóctono brinda cualidades de mayor rusticidad que son producto de adaptación al medio ambiente adverso después de muchos años de estancia en nuestro país, mientras que las razas paternas o sea el ovino “sintético”, proporciona a través del cruce terminal, una mayor producción de carne en la eficiencia transformadora de los insumos alimenticios que se les oferta. Bajo estas circunstancias, el cruce indiscriminado y sin control, poco a poco ha erosionado el material genético autóctono con una tasa de sustitución hacia el F1, F2 como pie de cría sin ninguna dirección genética. La alternativa de solución para la recuperación de las razas maternas está en la aplicación de la biotecnología reproductiva, ya que, a través de biotécnicas de reproducción asistida se pueden recuperar y propagar a corto plazo estas razas de pelo, de ahí que resulte necesario establecer un Banco de Germoplasma *in situ*, *ex situ* e *in vitro* que garantice una distribución controlada y preserven los genes de animales puros.

Los Bancos de Germoplasma *in vitro*, permiten conservar la variabilidad genética que existe hoy en día y posibilitan el manejo genético de los recursos naturales (Ballaou, 1992). Asimismo, si se conservan semen, óvulos y embriones, estos podrían ser utilizados durante muchos años, reforzando un programa de mejoramiento genético de mediano y largo plazo. Por otra parte, la utilización de los gametos conservados en estos bancos permite el intercambio del material de alto valor genético tanto entre poblaciones como entre generaciones, de esta forma se mejora tanto la conservación *in situ* como la *ex situ* al

evitarse la pérdida de variabilidad genética y la consanguinidad, fenómeno habitual en especies amenazadas.

Actualmente, el INIFAP, Campo experimental de Mocochoá, cuenta con un rebaño núcleo ovino de las razas puras Pelibuey y Blackbelly, que han sido conservadas a través de registros genealógicos por más de 40 años. Durante este tiempo, se han desarrollado diversas investigaciones orientadas a la selección, mejora genética, nutrición, evaluación de cruzamientos y aspectos reproductivos. En este último, se han realizado diversos estudios en la mejora de los protocolos de congelación del semen ovino, así como una evaluación completa de la calidad del semen. Uno de los factores que influye en esta técnica es que la capacidad fecundante del semen se ve afectada por los procesos de criopreservación (Roca *et al.*, 2005). Numerosos estudios han demostrado que los procesos de criopreservación afectan negativamente a la calidad y la capacidad fecundante del semen. Se ha descrito que los espermatozoides de ovino son más susceptibles al choque frío durante la criopreservación que otros mamíferos (Grötter *et al.*, 2019). En el ovino, a pesar de que un porcentaje relativamente alto (40-50 %) de espermatozoides conservan su motilidad después de la descongelación, sólo alrededor del 20-30 % permanecen biológicamente intactos (Watson, 2000). Estas diferencias, se atribuyen, en parte, a la composición lipídica (Mandal *et al.*, 2014; Chunrong *et al.*, 2019) y al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presentes en las membranas de los espermatozoides (Mandal *et al.*, 2014), así como a varios factores causados por los protocolos de criopreservación que alteran la integridad del espermatozoide: el cambio en la temperatura del diluyente; el estrés osmótico y tóxico inducido por los crioprotectores (Watson, 1995, 2000); la formación/remodelación de hielo intracelular durante la congelación y descongelación (Peña *et al.*, 2005); la disolución de hielo en el ambiente extracelular (Watson, 2000) y el estrés oxidativo ocasionado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kolettis *et al.*, 1999; Watson, 2000). Diversas investigaciones han demostrado que uno de los principales daños ocasionados por las ROS es la fragmentación del ADN en los espermatozoides, el cual tiene un gran impacto en el éxito reproductivo, tanto *in vivo*

como *in vitro*; pudiendo ocasionar fracaso en la fecundación, abortos y malformaciones (Muriel et al., 2004). Por tal motivo, la integridad de la cromatina espermática ha sido reconocida como un parámetro indicativo del potencial fecundante masculino y puede ser independiente de los parámetros comúnmente evaluados en el análisis seminal rutinario, requiriendo de técnicas especiales para su análisis.

Por esta razón, el estudio más reciente realizado por el INIFAP, Campo experimental de Mochochá, junto con el Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, fue la de comparar diferentes técnicas para analizar la fragmentación del ADN espermático ovino de muestras descongeladas, con el fin de incluir la mejor técnica al protocolo de evaluación seminal rutinario y así poder garantizar una mayor capacidad fecundante de los gametos.

Actualmente, existe mucha información sobre la fragmentación del ADN del espermatozoide a partir de investigaciones realizadas en células espermáticas de humanos y animales, sin embargo, la aplicación de resultados obtenidos por diferentes autores es menor en el ámbito de la producción animal; además de las diferencias en resultados por la variedad de las técnicas empleadas en la determinación del daño del ADN espermático en diferentes especies (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático en diferentes especies.

Técnica	Ventajas	Desventajas	Costo	Especies	Autor
NA	Rápido y metodología sencilla.	Subjetividad y baja reproducibilidad.	Bajo	Ovinos, porcinos, bovinos, equinos	Martins et al., 2007; Khalifa y Lymberopoulos, 2013; Evenson, 2016; Czubaszek et al., 2019; Mohammadi y Soltani, 2021
SCD	Buena reproducción, fácil y rápida evaluación	Subjetividad y baja reproducibilidad.	Medio	Ovinos, caprinos, porcinos, equinos	Gosálvez et al., 2008; Alves et al., 2015; Evenson, 2016; Peris-Frau et al., 2019
CMA3	Metodología sencilla y buena reproducibilidad.	Baja reproducibilidad	Medio	Bovinos, ovinos, porcinos	Simões et al., 2009; Alves et al., 2015; Hamilton et al., 2018; Czubaszek et al., 2019; Rahimizadeh et al., 2020
AT	Metodología sencilla y reproducible	Subjetividad y baja reproducibilidad	Bajo costo	Bovinos, caninos, felinos, ovinos, equinos	Nava-Trujillo et al., 2011; Alves et al., 2015; Álvarez et al., 2016; Nava-Trujillo y Quintero-Moreno, 2017; Rui et al., 2017; Martins et al., 2020
AA	Metodología sencilla	Subjetividad y baja reproducibilidad	Bajo costo	Bovinos, Ovinos, porcinos	Mukhopadhyay et al., 2009; Oliveira et al., 2013; Alves et al., 2015; Álvarez et al., 2016; Czubaszek et al., 2019; Peris-Frau et al., 2020

NA: Naranja de Acridina; SCD: Dispersión de la Cromatina Espermática; CMA3: Cromomicina A3; AT: Azul de Toluidina; AA: Azul de Anilina.

Hasta el momento, se pueden encontrar numerosas publicaciones sobre la utilidad de diversas técnicas en las cuales se analiza el estado de la cromatina espermática en diferentes especies. Uno de los más sencillos es la prueba de la naranja de acridina (NA), con el cual se comprueba el grado de desnaturalización del ADN espermático en función de su unión al colorante naranja de acridina (Ortega López *et al.*, 2010). Es un método relativamente rápido y se ha usado para evaluar la calidad espermática previa y posterior a la criopreservación (Senan *et al.*, 2013; Papa *et al.*, 2015). Sin embargo, la técnica de AO está limitada a estas propiedades metacromáticas, por cuanto nos aporta información limitada del estatus nuclear del espermatozoide. Otras técnicas, como la dispersión de la cromatina espermática (SCD) analizan la fragmentación del ADN espermático comprobando roturas en la cadena. Esta técnica permite diferenciar entre los espermatozoides cuya cromatina está condensada e intacta de los que tienen su ADN fragmentado (Nava-Trujillo *et al.*, 2011; Carretero *et al.*, 2012; Nezhad *et al.*, 2013). Asimismo, también se encuentra la cromomicina A3 (CMA3) que es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética. Este colorante permite detectar espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento de la cromatina (Manicardi *et al.*, 1995). Por otro lado, también se encuentra el azul de toluidina (AT) que es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina. Se trata, por tanto, de otra prueba que nos indica el nivel de maduración o condensación nuclear (Erenpreisa *et al.*, 2003). Por último, el azul de anilina (AA) que es similar al de azul de toluidina. Este colorante es de tipo básico que reacciona con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), los grupos sulfatos de los glucosaminoglicanos y los grupos carboxilos de las proteínas. Esta tinción discrimina entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína, teniendo afinidad por la primera, por lo que se puede utilizar para detectar defectos en la compactación o inmadurez de la cromatina (Hammadeh *et al.*, 1996).

Análisis de la fragmentación del ADN espermático:

Naranja de acridina (NA)

El semen descongelado se diluye a una concentración de $\sim 30 \times 10^6/\text{mL}$ en PBS y se colocan 7 μL en un cubreobjeto para realizar un frotis que se deja secar al aire y después se fija en una solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) durante 24 horas. Posteriormente, los frotis se dejan secar para luego ser teñidos con una solución de NA durante 5 minutos. La solución madre se prepara disolviendo 0.05g de NA en 50 mL de agua destilada y se almacena a 4°C hasta su uso, mientras que la solución de tinción se prepara mezclando 10 mL de la solución madre (40 mL de 0.1 M de ácido cítrico y 2.5 mL de 0.3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Finalmente, los frotis se lavan sumergiéndolos en un vaso con agua destilada para luego analizarlos con un microscopio de fluorescencia (Figura 1).

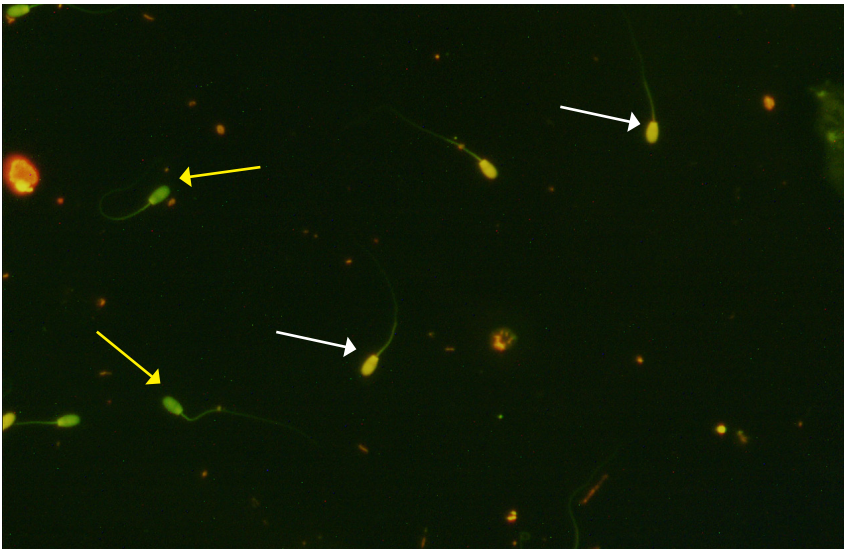


Figura 1. Espermatozoides de ovino procesados con la técnica de naranja de acridina.

Los espermatozoides que presentan una fluorescencia amarilla representan las células que tienen el ADN fragmentado (flecha blanca) en contraste con los no fragmentados que presentan una fluorescencia verde (flecha amarilla) (Foto: Álvaro E. Domínguez Rebolledo).

Dispersión de la cromatina espermática (SCD)

El semen descongelado se diluye a una concentración de $\sim 30 \times 10^6/\text{mL}$ en una solución fosfato búfer (PBS), se mezcla 20 μL del semen diluido con 40 μL agarosa líquida de bajo punto de fusión atemperada a 37 °C, de modo que la concentración final de la agarosa sea del 0.7%. Sobre un portaobjetos previamente recubierto de una película de agarosa estándar al 0.65%, se depositan dos gotas separadas con 10 μL de la suspensión de agarosa con la muestra de semen diluida, se cubren con un cubreobjetos de 22x22 mm, se colocan en una placa de aluminio previamente enfriada a 4°C y se transfiere a un refrigerador para que se solidifiquen a 4°C durante 5 minutos hasta formar un microgel. Posteriormente, los cubreobjetos se retiran cuidadosamente sin alterar las capas subyacentes y los portaobjetos se introducen horizontalmente en una bandeja con una solución lisis (0.4 M Tris, 50 mM EDTA, 0.4 M DTT, 0.3% SDS, 1% Tritón X-100, pH 7.5 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínaasa K >600 U/mL, $\sim 20 \text{ mg}/\text{mL}$) para extraer membranas, proteínas y producir la descondensación de la cromatina. Después, se sumergen en agua destilada durante 5 minutos, para luego deshidratarlas mediante la sumersión en 70, 90 y 100% (v/v) de etanol con un tiempo de 2 minutos cada uno y se dejan secar al aire. Finalmente, las células se tiñen con 10 μL de Yoduro de Propidio para su observación con un microscopio de fluorescencia (Figura 2).



Figura 2. Espermatozoides de ovino procesados con la técnica del test SCD modificado.

Los espermatozoides que muestran una fluorescencia amarilla brillante con un halo rojo representan las células que tienen el ADN fragmentado (flecha blanca) en contraste con los no fragmentados que muestran una fluorescencia roja (flecha verde) (Foto: Álvaro E. Domínguez Rebolledo).

Cromomicina A3 (CMA3)

El semen descongelado se diluye a una concentración de $\sim 30 \times 10^6$ /mL en PBS y se colocan 7 μ L en un cubreobjeto para realizar un frotis que se deja secar al aire y después se fija en una solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, los frotis se dejan secar para luego teñirlos con la tinción de CMA3 (0.25mg/ml en buffer McIlvaine (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M ácido cítrico y 10 mM de MgCl_2 , pH 7) durante 30 minutos. Finalmente, los frotis se lavan sumergiéndolos en un vaso con agua destilada para luego analizarlos con un microscopio de fluorescencia (Figura 3).

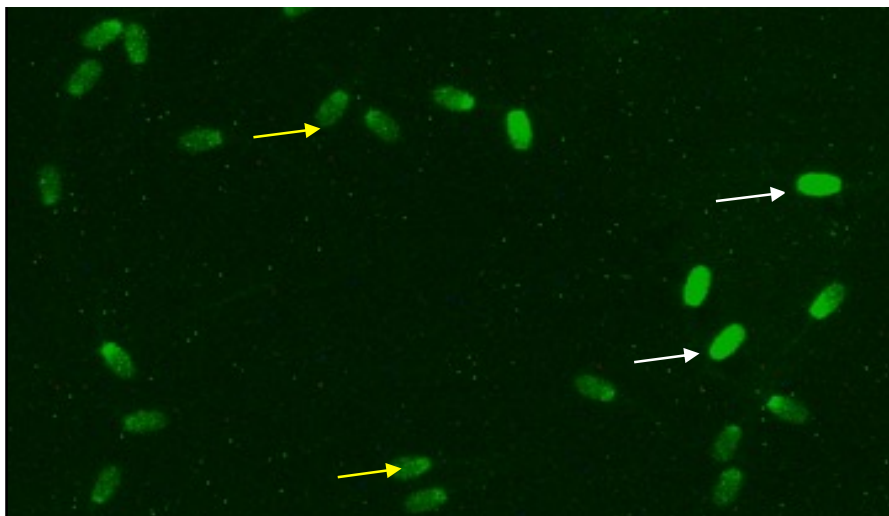


Figura 3. Espermatozoides de ovino procesado con la técnica CMA3.

Los espermatozoides que muestran una fluorescencia verde brillante representan las células que tienen el ADN fragmentado (flecha blanca) en contraste con los no fragmentados que presentan una fluorescencia verde degradada (flecha amarilla) (Foto: Álvaro E. Domínguez Rebolledo).

Azul de toluidina (AT)

El semen descongelado se diluye a una concentración de $\sim 30 \times 10^6$ /mL en PBS y se colocan 7 μ L en un cubreobjeto para realizar un frotis que se deja secar al aire y después se fija en una solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, los frotis se dejan secar para después teñirlos con la tinción de AT (0.05% de AT en 10mL de tampón McIlvaine, pH 4.0) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los frotis se lavan sumergiéndolos en un vaso con agua destilada para luego analizarlos con un microscopio de campo claro (Figura 4).

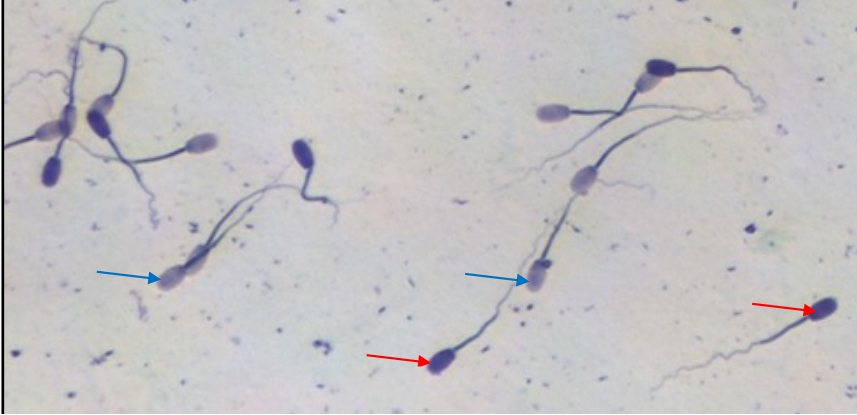


Figura 4. Espermatozoides de ovino procesado con la técnica Azul de toluidina. Los espermatozoides que muestran una coloración morada intensa representan las células que tienen el ADN fragmentado (flecha roja) en contraste con los no fragmentados que presentan una coloración morada degradada (flecha azul) (Foto: Álvaro E. Domínguez Rebolledo).

Azul de anilina (AA)

El semen descongelado se diluye a una concentración de $\sim 30 \times 10^6$ /mL en PBS y se colocan 7 μ L en un cubreobjeto para realizar un frotis que se deja secar al aire y después se fija en una solución Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, los frotis se dejan secar para después teñirlos con la tinción de AA (5% de AA disuelto en ácido acético al 4%, pH 3.5). Finalmente, los frotis se lavan sumergiéndolos en un vaso con agua destilada para luego analizarlos con un microscopio de campo claro (Figura 5).



Figura 5. Espermatozoides de ovino procesados con la técnica de Azul de anilina. Los espermatozoides que muestran una coloración azul representan las células que tienen el ADN fragmentado (flecha roja) en contraste con los no fragmentados que presentan una coloración azul degradada (flecha azul) (Foto: Álvaro E. Domínguez Rebolledo).

Conclusión

Si se pretende conservar y rescatar vía gametos (semen), las razas maternas ovinas amenazadas por la erosión genética causada por la introducción indiscriminada de nuevas razas paternas, es necesario garantizar que el material seminal a utilizar sea fértil. Esta garantía la da, además del estudio de la calidad seminal de cada individuo, la incorporación de técnicas de reciente estudio como el análisis de la fragmentación del ADN a través de tinciones vitales. Solo así en programas de mejoramiento genético de mediano y largo plazo, a través de Bancos de Germoplasma es como se podrán recuperar las razas maternas, tanto en zonas tropicales, subtropicales o templadas del país.

Referencias bibliográficas

- Aguilar C. U., Berruecos, J. M., Espinoza B., Segura J. C., Valencia J., Roldán A. (2017). Origen, historia y situación actual de la oveja pelibuey en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3):429-439.
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2):269-279.
- Álvarez-Gonçalves, C., Arellano, F., & Pèrz-Carrera, A. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *Revista Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*, 1(7): 21-37.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., & Courtens, J. L. (2005). Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129(4): 535-543.
- Ansari, M., Rakha, B., Akhter, S., & Ashiq, M. (2016). OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85(3): 528-532.
- Alves, M.B.R., Oliveira, M.L., Lançon, R., Florez-Rodriguez, S.A., Celeghini, E.C.C., Arruda, R.P., & Andrade, A.F.C. (2015). Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte 1. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 39: 263-269.
- Ballou, J.D. (1992). Potential contribution of cryopreserved germplasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, 29: 1925.
- Carretero, M. I., Arraztoa, C. C., Ferrante, A.; Caldevilla, M., Santa Cruz, R., & Neild, D. (2012). "Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm

- Chromatin Dispersion test”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (8):480.
- Chunrong, L.V., Guoquan, W.U., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2):171-182.
- Cremades, T., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Abaigar, T., Vazquez, J.M., & Martinez, E.A. (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26: 610-618.
- Czubaszek, M., Andraszek, K., & Banaszewska, D. (2019). Influence of the age of the individual on the stability of boar sperm genetic material. *Theriogenology*, 147: 176-182.
- El-Sisy, G. A., El-Nattat, W. S., El-Sheshtawy, R. I., & Abo El-Maaty, A. M. (2016). Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls’ semen preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(6): 514-518.
- Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Ivanov, A., & Pjanova, D. (2003). Toluidina blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry*, 52: 19-27.
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169: 56-75.
- Gonsálvez-Berenguer, J., Caballero-Peregrín, P., López-Fernández, C., Fernández, J.L., & Núñez-Calonge, R. (2008). Fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, 6(3): 193-209.
- González, P. E., Domínguez, R. A.E., Ramón, U. J. (2004). La importancia de establecer bancos de germoplasma. *La revista del Borrego*. 6:16-2.
- Grötter, L.G., Cattaneo, L., Marini, P.E., Kjelland, M.E., & Ferré, L.B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques

- with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4):655-665.
- Hamilton, T., Siqueira, A., de Castro, L.S., Mendes, C.M., Delgado, J.D., de Assis, P.M., Mesquita, L.P., Maiorka, P.C., Nichi, M., Goissis, M.D., Visintin, J.A., & Assumpção, M.E. (2018). Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 1-14.
- Hammadeh, M. E., Al-Hasani, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., Küpker, D., Diedrich, K., & Schmidt, W. (1996). "Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme". *Human Reproduction*, 11 (11): 2468-2471.
- Khalifa, T., & Lymberopoulos, A. (2013). Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell Tissue Bank*, 14: 687-698.
- Kolettis, P.M., Sharma, R.K., Pasqualotto, F.F., Nelson, D., Thomas, A.J., & Agarwal, A. (1999). "Effect of seminal oxidative stress on fertility after vasectomy reversal". *Fertility and Sterility*, 71:249-255
- Mandal, R, Badyakar, D, & Chakrabarty, J. (2014). Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*, 2014:9.
- Manicardi, G. C., Tombacco, A., Bizzaro, D., Bianchi, U., Bianchi, P. G., & Sakkas, D. (1998). "DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the Nick translation and terminal transferase assays", *The Histochemical Journal*, 30 (1): 33-39.
- Maxwell, W.M., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillan, L., Gellatly, E.S., & McPhie, C.A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(2):123-6.

- Mohammadi, T., & Soltani, L. (2021). Effects of hydroethanolic extracts of *Terminalia chebula* and *Thymbra spicata* on ram fresh semen under normal and oxidative stress conditions. *Veterinary medicine and science*, 7(5): 1778–1785.
- Mukhopadhyay, C.S., Gupta, A.K., Yadav, B.R., Chauhan, I.S., Gupta, A., Mohanty, T.K., & Raina, V.S. (2011). Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livestock Science*, 136: 114-121.
- Muriel, L., Segrelles, E., Goyanes, V., Gosálvez, J., & Fernández, J. L. (2004). Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by *in situ* enzymatic treatment and digital image analysis. *Molecular Human Reproduction*, 10 (3): 203-209.
- Nava, H., Quintero, A., Finol, G., Carruyo, G., Vilchez, V., Osorio, C., Rubio, J., & Valeris, R. (2011). Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(2): 116-122.
- Nava-Trujillo, H., & Quintero-Moreno, A. (2017). Importancia de la evaluación de la cromatina espermática en rumiantes. *Journal of veterinary andrology*, 2(1): 8-22.
- Nezhad, F. S., Lavvaf, A., & Karimi, S. (2013). “Influence of Heat Stress on DNA Damage on Sheep ‘S Sertoli Cells’”, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 6 (10), pp: 1396-1400.
- Oliveira, R.V., Dogan, S., Belser, L.E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G., & Memili, E. (2013). Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction*, 146(3): 263-272.
- Ortega-López, L., Olaya-Vila, E., López-Domínguez, P., Segovia, A.G., Orozco-Gómez, I., Núñez-Calonge, R. & Caballero-Peregrín, P. (2010). “Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina”. *Revista Internacional de Andrología*, 8(3):114-121.

- Papa, P. M., Maziero, R. D., Guasti, P. N., Junqueira, C. R., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Papa, F. O., & Dell'Aqua, J. A. (2015). "Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen". *Theriogenology*, 83 (1): 107-113.
- Peña, F.J., Saravia, F., Garcia-Herreros, M., Nuñez-Martinez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2005). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*, 26:716-723.
- Peris, P., Álvarez, M., Martín, A., Iniesta, M., Sánchez, I., Garde, J. J., Rodríguez, H., & Soler, A. J. (2019). Comparative evaluation of DNA integrity using sperm chromatin structure assay and Sperm-Ovis-Halo-max during in vitro capacitation of cryopreserved ram spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, 54(4): 46-49.
- Peris, P., Álvarez, M., Martín, A., Iniesta, M., Sánchez, I., Medina, D. A., Garde, J. J., Villar, M., Rodríguez, H., & Soler, A. J. 2021. Unravelling how in vitro capacitation alters ram sperm chromatin before and after cryopreservation. *Andrology*, 9(1): 414-425.
- Rahimizadeh, P., Rezaei, T., Numan, M., Ziarati, N., Hasirbaf, A., Mohamad, S., Maroufizadeh, S., & Shahverdi, A. (2020). Effect of Bovine Serum Albumin Supplementation in Tris-Soybean Lecithin-Based Extender on Quality of Chilled Ram Epididymal Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 19(1): 33-40.
- Roca, J, Rodríguez, M.J., Gil, M.A., Carvajal, G., Garcia, E.M., Cuello, C., Vazquez, J.M., & Martinez, E.A. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology*, 26 (1):15-24
- Rui, B.R., Angrimani, D., Bicudo, L.C., Losano, J., Nichi, M., & Pereira, R. (2017). A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1): 1-5.

- Senan, V. P., Sherief, P. M. & Nair, J. R. (2013). "Cytotoxic effect of ink extracts of cuttlefish and squid on chick embryo fibroblasts". *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4: 1893-1896.
- Singh, A. K., Kumar, A., Honparkhe, M., Kaur, S., Kaur, H., Ghuman, S., & Brar, P. S. (2018). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 195-202.
- Vidal, A. H., Batista, A. M., da Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2013). Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 109(1), 47-51.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61 481-492.
- Yildiz, C., Bozkurt, Y., & Yavas, I. (2013). An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67 (1), 91-94

CAPÍTULO 7

Monitoreo hormonal no invasivo como una herramienta dentro de los programas de reproducción en fauna silvestre bajo cuidado humano

José Antonio Sandoval Zárate^{1,2}

Resumen

Uno de los aspectos más importantes para el desarrollo e implementación de biotecnologías reproductivas encaminadas a la conservación de especies de fauna silvestres, tanto en ejemplares de vida libre como bajo cuidado profesional, es la fisiología reproductiva. Dado que la endocrinología es una de las áreas principales que engloba a la fisiología, se han desarrollado y estandarizado diferentes técnicas para definir los perfiles hormonales de estas especies. Una de las herramientas de amplio uso para establecer los perfiles endocrinológicos es el monitoreo hormonal no invasivo (MHNI), con este tipo de técnica se puede lograr una adecuada cuantificación, principalmente de hormonas esteroides y con ello conocer algunos aspectos como son: la pubertad, estacionalidad, tiempos de ovulación entre otros, mediante el uso de diversas matrices tales como: heces fecales, orina, pelo, plumas, escamas, saliva. Con la información generada a partir del MHNI se han realizado los ajustes necesarios para hacer más eficientes las biotecnologías reproductivas implementadas en ejemplares domésti-

¹ Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre, Secretaría del Medio Ambiente, CDMX.

² Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Jaszarate105@gmail.com

cos, así como ir dilucidando la fisiología, principalmente reproductiva de las especies silvestres.

Palabras Clave: Biotecnologías, ELISA, Fisiología, Hormonas, Reproducción

Introducción

Actualmente, los zoológicos juegan un papel importante dentro de la conservación de la fauna silvestre *ex situ*, también conocida como fauna silvestre bajo cuidado humano, ya que albergan ejemplares que representan un reservorio de material genético (Meunier, 2022). Uno de los aspectos más importantes para lograr conservar estas especies es el conocer los procesos fisiológicos y en particular la fisiología reproductiva. En el caso de los animales domésticos estos procesos se han ido dilucidando a través de diversos métodos, entre los que se encuentran el establecimiento de los perfiles hormonales por medio de la toma de muestras sanguíneas secuenciales, permitiendo definir varios aspectos reproductivos, como son: la pubertad, estacionalidad, tiempos de ovulación entre otros. Sin embargo, en los organismos de fauna silvestre, la toma de muestras séricas repetidas no suele ser tan eficiente, dado que en muchas de las especies se requiere del uso de la contención química, lo que puede reflejarse de manera negativa en los resultados obtenidos. Es por ello que se han desarrollado técnicas de cuantificación no invasivas, haciendo uso de matrices que pueden ser colectadas de manera fácil, rápida y segura, tanto para el manejador como para el ejemplar, dichas muestras permiten conocer las variaciones hormonales durante periodos longitudinales prolongados (Pukazhenth, 2004), con una mínima interacción con los ejemplares, reduciendo las posibles alteraciones que se presentaran en los organismos y por ende en los resultados (Wojtusik, 2017).

Uno de los aspectos a considerar para el desarrollo de un monitoreo hormonal no invasivo (MHNI), es la selección del tipo de matriz, dado que ésta deberá de reflejar el o los procesos fisiológicos que se

desea evaluar, así como en el intervalo de tiempo entre su secreción y su excreción. En el caso del MHNI principalmente se utilizan: heces y orina, aunque también se pueden utilizar escamas o pelo, dependiendo de los objetivos que se desean alcanzar (Valdespino, 2007). Otro punto importante por considerar al momento de determinar el método de cuantificación será la naturaleza química de las hormonas dado que de acuerdo con su composición esta podría no ser cuantificada en excretas.

Para conocer y determinar el monitoreo hormonal de un organismo por métodos no invasivos, es decir, el análisis hormonal a partir de las excretas (Valdespino *et al.*, 2007; Busso, 2017), se debe conocer la ruta de excreción de las hormonas a evaluar. El cual consiste en que, una vez realizada su acción, por ejemplo, en el caso de las hormonas esteroides, son transportadas en la sangre de manera libre o unidos a globulinas específicas, su catabolismo se llevará a cabo principalmente en hígado, para después ser eliminados con la orina o bilis como conjugados. En el intestino estos metabolitos tienen diversas rutas, ya que pueden ser reabsorbidos por la circulación enterohepática, desconjugados por las bacterias y ser eliminados por las heces. En general, los metabolitos finales que aparecen en la orina son conjugados, mientras que en las heces existen tanto los metabolitos como la hormona pura. Solo una pequeña proporción de los esteroides sanguíneos libres, es secretada a través de la mucosa del intestino grueso, lo que permite encontrar una pequeña proporción de esteroide original sin conjugar en la orina o en heces (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2005; Valdespino *et al.*, 2007).

Matrices empleadas para MHNI

Como ya se mencionó, existen diversas matrices en las que se puede realizar la cuantificación de hormonas, principalmente las derivadas del colesterol, dado que estas tienen una mayor estabilidad en comparación con las hormonas de otro tipo de origen. A continuación, mencionaremos de forma breve algunos de las principales matrices empleadas en el MHNI.

Heces fecales

El uso de heces fecales en el monitoreo hormonal representa una herramienta muy práctica, sin embargo, requiere un manejo muy elaborado, el cual iniciará conociendo el tiempo de paso gástrico. Una vez obtenida la muestra el proceso de extracción de las hormonas inicia con la eliminación de la humedad presente en la misma, esta acción puede realizarse por dos medios, el procedimiento más común es mantenerlos a temperaturas de 70°C, hasta que el peso de la muestra sea constante, en tanto que otra técnica puede ser la liofilización, posteriormente, una vez obtenida la muestra en base seca, esta será diluida en una solución de alcohol primario, ya sea etanol o metanol al 90 o 100%, dependiendo el protocolo a seguir. Este procedimiento resulta una limitante para la cuantificación de hormonas polipeptídicas, dada su naturaleza química, porque al ser sometidas a altas temperaturas daría como resultado su desnaturalización.

Al momento de obtener los resultados y realizar el diseño de los perfiles hormonales, es importante considerar el tiempo que las hormonas tardan en ser secretadas hasta su eliminación en las heces, a lo que se le conoce como tiempo de paso gástrico, es por ello que, al momento de realizar la interpretación de los resultados, se deberá de considerar este lapso de tiempo entre el estar en suero y en heces, que puede ser hasta de 12 horas (Palme, 2005). Por lo anterior, se debe de tomar en cuenta que el o los pulsos registrados dentro de un perfil pueden haberse dado horas antes de la obtención de la muestra. En los casos cuando no se conoce el tiempo de tránsito, lo primero que se deberá hacer son pruebas para determinar este parámetro, lo cual se logra colocando marcadores en el alimento y espera que se vean reflejados en las heces. Los marcadores pueden ser, colorantes de tipo vegetal o algunas semillas que no puedan ser fácilmente digeridas, de esta forma se sabrá cuanto tiempo transcurre desde que la hormona es secretada hasta que es eliminada y posteriormente cuantificada.

Orina

Los muestreos a partir de orina reflejan de manera más cercana los procesos que ocurren en el organismo, ya que el tiempo que puede pasar entre estar en sangre y ser excretado es un periodo de tiempo no mayor a ocho horas. Sin embargo, deberán considerarse que las determinaciones obtenidas se basan en la cuantificación de los metabolitos como son estrona conjugada (E1G) o pregnanediol-3-glucorónico (PdG) (Sugianto, 2021), así como, el caso de isoformas para hormonas siogénicas. Por tal motivo, es necesario conocer las diversas formas en las cuales se pueden encontrar esos productos de desecho.

En los casos donde se utiliza la orina como matriz para la cuantificación hormonal de esteroides, los resultados deberán de tener un ajuste, el cual se realiza con base en la concentración de creatinina (Cr), por tal motivo la expresión de los resultados se realiza considerando los niveles de este producto en la muestra (ejemplo: nanogramo de Hormona / mg Cr). Lo anterior tiene dos objetivos, el primero conocer de manera indirecta la función renal, evitando un sesgo por efecto de diuresis; en tanto, la segunda está enfocada a determinar que la muestra no esté diluida, dado que, en la mayoría de las ocasiones son recolectadas del piso, teniendo el riesgo de estar diluidas o en su defecto se puede recolectar agua al no tener identificados los lugares donde los organismos orinan o tener problemas para identificar la orina de agua.

La cuantificación de la Cr se realiza a través de una prueba colorimétrica, cuyo fundamento se basa en la interacción de la creatinina con el ácido pícrico en un medio alcalino. Dicha reacción provocará la formación de picratos generando una coloración naranja a marrón de la sustancia donde se está llevando a cabo esta interacción (Miller, 2004). Es importante mencionar que los resultados de las muestras cuya concentración de creatinina sea inferior a 0.100 mg de Cr/Ml serán considerados como no diagnósticas, dado que están demasiado diluidas, provocando sub o sobreestimando de la concentración real.

Saliva

La cuantificación de hormonas en saliva proporciona una alternativa útil dentro de los métodos no invasivos, ya que es un reflejo de las concentraciones de hormonas libres en suero, esto debido a su disposición anatómica, la cual permite el paso de estos mediadores químicos de la sangre a la saliva (Sheriff, 2011), sin embargo, tienen como desventaja que los ejemplares deben condicionarse de manera voluntaria con los dispositivos diseñados para la recolección de la muestra, los cuales deberán estar adaptados a la especie en la cual se desarrollará el estudio (Montgomery, 2022). Es por esto último que su aplicación como método no invasivo puede ser cuestionado, al tener una interacción directa con los organismos, dando como resultado un grado de invasión, lo que puede modificar sus conductas e incluso los resultados obtenidos dentro de la cuantificación.

Pelo y lana

La cuantificación hormonal a partir de estos tipos de matrices está indicada para un análisis retrospectivo con intervalos de tiempo a largo plazo, los cuales van desde días hasta semanas o meses. La principal consideración al momento de realizar la determinación de las concentraciones hormonales a partir de este tipo de muestras es conocer la tasa de crecimiento de la matriz, ya sea el pelo o lana (Carlitz, 2014). Para realizar un comparativo de los niveles hormonales, tanto intra como inter individuo la obtención de la muestra deberá hacerse de la misma región del cuerpo (Bartling-John, 2021), ya que cada región del cuerpo presenta un crecimiento diferente. La determinación de la tasa de crecimiento del pelo se logra afeitando la zona del cuerpo de donde se hará el estudio, después de un tiempo determinado y de acuerdo con el protocolo de estudio se volverá a rasurar la zona para establecer la longitud de crecimiento. Los resultados obtenidos en una región del cuerpo no podrán ser extrapolados el crecimiento de otras zonas.

Escamas

En el caso de los reptiles, una matriz que puede ser utilizada son las escamas, donde se utilizan las mudas, producto del cambio de la epidermis asociado al crecimiento del ejemplar, este cambio está influenciado por diversos factores como la nutrición, el manejo rutinario, exposición a factores ambientales, sexo, etapa fisiológica, entre otros (Berkvens, 2013). La cantidad de hormonas determinada por este medio es el resultado de la acumulación generada desde que inició la muda hasta que se desprendió.

Tanto el pelo, lana y escamas son muestras es muy fácil de conservar y la concentración hormonal prácticamente no se ve afectada por las variaciones ambientales o intrínsecas de la muestra. Sin embargo, al igual que en las muestras fecales, se deberá realizar un proceso de extracción para obtener las hormonas, por lo que la concentración de éstas puede variar según el protocolo de extracción a ser utilizado.

Métodos de cuantificación hormonal

Existen diversos métodos para la cuantificación hormonal, los cuales se basan en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), donde alguno de ellos está unido a un agente (isotopo, enzima, biotina, etc.) que permitirá la determinación y cuantificación de una hormona en específico. Los principales inmunoensayos son: RadioInmuno siogén (RIA) este es un método que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, el cual estará marcado con un isótopo (Ardila, E.); el Enzimoinmuno Análisis (EIA) o el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), por sus siglas en inglés, se caracterizan por hacer uso de enzimas unidas a uno de los reactivos (Ag o Ac) para permitir la cuantificación a través de la colorimetría (Crowther, 2012). Otra prueba es la Quimioluminiscencia, en este caso el fundamento se basa en el uso sustancias quimioluminiscentes como marcadores para la producción química de luz, la cual podrá ser cuantificada para determinar la cantidad de hormona presente en una muestra.

El uso de los métodos mencionados, así como otros que también se emplean para la cuantificación hormonal, pueden tener una interferencia directa en las concentraciones obtenidas (Prasad, 2019), por tal motivo, al momento de comparar los resultados obtenidos en un ejemplar, estos datos deberán ser comparados con ensayos similares a los que se estén empleando.

Las variaciones en la correlación y el sesgo proporcional entre los kits probablemente se explican porque los diferentes anticuerpos en los ensayos reaccionan de forma cruzada con otras sustancias, además, los diferentes anticuerpos pueden reaccionar de manera distinta a los factores propios de la matriz empleada o incluso asociados a los tiempos de almacenamiento (Amaral, 2010; Anderson, 2017).

Clasificación química de las hormonas

De manera muy breve se mencionarán las clasificaciones químicas de las principales hormonas que intervienen en los procesos reproductivos, ya que éstas tienen diferentes orígenes, lo que les confiere un aspecto fisicoquímico de suma importancia al momento de su cuantificación. Dichas características permitirán definir si son candidatas a una cuantificación no invasiva, así como la metodología más adecuada para su determinación.

Polipeptídicas: Son cadenas de aminoácidos que de acuerdo con su estructura podrán ser llamadas polipéptidos o proteínas, estas últimas son cadenas de aminoácidos largas con una estructura tridimensional. Además, en este grupo se encuentran incluidos las glicoproteínas, que son proteínas que tienen carbohidratos unidos a algunos aminoácidos. Estas hormonas son termolábiles, es decir, no resisten temperaturas altas, así como los cambios de pH, ya que estos cambios repercuten directamente en su estructura, a lo que se conoce como desnaturalización (Rangel, 2018).

Aminas: son las hormonas más simples, derivan de aminoácidos, como la tirosina que da origen a las catecolaminas (ejemplo: adrenalina o epinefrina y noradrenalina o norepinefrina). Mientras que las

indolamidas provienen del triptófano y dan origen a la serotonina y melatonina (Rangel, 2018) Finalmente la histamina que deriva de la histidina.

Prostaglandinas: en este grupo se encuentran las prostaglandinas (PG), los leucotrienos y tromboxanos que son eicosanoides derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido araquidónico el precursor más importante (Rangel, 2018).

Esteroides: son hormonas sintetizadas a partir del colesterol, poseen una estructura de cuatro anillos (tres hexanos y uno pentano). Su estructura cíclica les confiere una gran estabilidad, incluso a temperaturas extremas, lo que se conoce como termoestabilidad. Debido a su carácter poco polar, son considerados como liposolubles, permitiéndoles atravesar membranas celulares por difusión simple, logrando activar receptores a nivel intracelular (Rangel, 2018).

Con base en las características químicas de las hormonas antes mencionadas, todas aquellas hormonas que sean sensibles a las variaciones de temperatura deberán ser cuantificadas por matrices que no requieran procesos de extracción de hormonas a base de incrementos de temperatura, dado que podrán ser desnaturalizadas y por ende subcuantificadas, en el mejor de los casos.

Aplicaciones del monitoreo hormonal no invasivo

El uso del monitoreo hormonal no invasivo, principalmente a partir de muestras fecales y orina, es una herramienta con la que se puede conocer la fisiología de los ejemplares de fauna silvestre bajo cuidado humano, con esta herramienta se podrán determinar las fases gestacional o estrogénica del ciclo estral, así como la determinación de la estacionalidad reproductiva, la cual en algunos casos se ha visto modificada en algunos ejemplares bajo cuidado humano, permitiendo el desarrollo y optimización de la biotecnologías reproductivas con las que se contribuirá a la conservación de especies, incrementando de manera controlada los grupos que se encuentran en instituciones

zoológicas, contribuyendo con la variabilidad genética y fortaleciendo los programas de conservación.

El desarrollo de parámetros de referencia a partir de MHNI puede servir para la identificación de ejemplares gestantes e incluso hacer diferencias con ejemplares que pudieran presentar una pseudogestación, así como la presencia de patologías, principalmente de tipo reproductivo, permitiendo la toma oportuna de decisiones y, por ende, la implementación de medidas que favorezcan el cuidado íntegro de los ejemplares, minimizando su manejo en la toma de muestras.

Por otra parte, actualmente las instituciones zoológicas emplean métodos contraceptivos para controlar la densidad poblacional de los grupos de ejemplares que mantiene bajo su cuidado, muchos de estos tratamientos tienen como base la administración de hormonas esteroides, las cuales administradas por tiempos prolongados pueden generar desbalances endocrinológicos en los ejemplares donde se estén empleando, dado que actualmente aún hay un déficit de información de los procesos fisiológicos de los ejemplares de fauna silvestre, por lo que se pueden ocasionar alteraciones hormonales que afecten directamente la salud de los individuos, principalmente el tracto reproductor, comprometiendo el retorno a la actividad cíclica que permita una posterior reproducción de dichos ejemplares. Con la implementación de un MHNI durante el tiempo del tratamiento contraceptivo se podrá inferir de manera oportuna la presentación de las posibles alteraciones que comprometan la integridad del ejemplar o determinar el éxito del tratamiento.

A manera de conclusión podemos decir que, el uso del MHNI es una herramienta valiosa para la recopilación de información relacionada a aspectos reproductivos, haciendo uso de la cuantificación de metabolitos excretados en orina, heces o algún otro tipo de matriz, dependiendo del analito a cuantificar. Asimismo, es importante considerar el tipo de método de cuantificación y las variaciones propias del mismo. Una vez estandarizados y establecidos los niveles de referencia, estos datos pueden ser de utilidad para su implementación en ejemplares que se encuentren en vida libre, los que podrían ser

candidatos para algún proceso de biotecnología reproductiva o simplemente conocer su estado fisiológico, así como si cursan con algún proceso patológico.

Referencias bibliográficas

- Amaral, R. S. (2010). Use of Alternative Matrices to Monitor Steroid Hormones in Aquatic Mammals: A Review. *Aquatic Mammals*, 36(2), 162–171. Doi:10.1578/am.36.2.2010.162
- Andersson, C. R., Bergquist, J., Theodorsson, E., & Ström, J. O. (2017). Comparisons between commercial salivary testosterone enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 77(8), 582–586. Doi:10.1080/00365513.2017.1339231
- Ardila, E. El Radioinmunoensayo. <http://revistaendocrino.org/index.php/rcedm/article/view/23/38#:~:text=El%20radioinmunoensayo%20es%20un%20tipo,de%20los%20m%C3%A9todos%20radiol%C3%B3gicos>. Consultada el 29 de abril de 2022
- Bartling-John, E.E., & Phillips K.A. (2021). The Effect of Body Region on Hair Cortisol Concentration in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comparative medicine* vol. 71,2: 148-151. Doi:10.30802/AALAS-CM-20-000091
- Berkvens, C. N., Hyatt, C., Gilman, C., Pearl, D. L., Barker, I. K., & Mastromonaco, G. F. (2013). Validation of a shed skin corticosterone enzyme immunoassay in the African House Snake (*Lamprophis fuliginosus*) and its evaluation in the Eastern Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus catenatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 194, 1–9. Doi:10.1016/j.ygcen.2013.08.011
- Busso, J. (2017). Innovación tecnológica en endocrinología de fauna silvestre: investigación en monitoreo hormonal no invasivo en Córdoba para resolver problemas de bienestar. [Blog] *Vet Comunicaciones*.

- Carlitz, E. H. D., Kirschbaum, C., Stalder, T., & van Schaik, C. P. (2014). Hair as a long-term retrospective cortisol calendar in orangutans (*Pongo spp.*): New perspectives for stress monitoring in captive management and conservation. *General and Comparative Endocrinology*, 195, 151–156. Doi:10.1016/j.ygcen.2013.11.002
- Crowther, J. (2012). *The ELISA Guidebook*. New Jersey: Humana Press. Volumen 149
- Graham LH. 2004 Non-Invasive Monitoring of Reproduction in Zoo and Wildlife Species. *ARBS Annual Review of Biomedical Science*; 6:91-8.
- Gröschl, M. (2017). Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis*, 9(8), 655–668. Doi:10.4155/bio-2017-0010
- Hernández-Jáuregui, D., Galindo Maldonado, F., Valdez Pérez, R., Romano Pardo, M. & Schuneman, de Aluja, A. (2005). Cortisol en saliva, orina y heces: Evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Revista Veterinaria México*, [Internet] 36(3), pp.325-337.
- Meunier, M. Schwarzenberger, & F. Mulot, B. (2022). Use of a simplified non-invasive technic to monitor fecal progesterone metabolites and reproduction function in several zoo species: Efficacy of mini VIDAS® automate (bioMérieux), 179, 69-77 doi.org/10.1016/j.The-riogenology.2021.11.015
- Miller, R. C. (2004). Comparison of Specific Gravity and Creatinine for Normalizing Urinary Reproductive Hormone Concentrations. *Clinical Chemistry*, 50(5), 924–932. Doi:10.1373/clinchem.2004.032292
- Montgomery, T.M., Greenberg, J. R., Gunson, J. L., John, K., Laubach, Z. M., Nonnamaker, E. Person, E. S., Rogers, H., Ronis, E. M., Smale, L., Steinfield, K. R., Strong, R., Holekamp, K. E., & Beehner, J.C. (2022) Measuring salivary cortisol in wild carnivores. *Hormones and Behavior* 137 doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105082
- Palme, R. (2005). Measuring Fecal Steroids: Guidelines for Practical Application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 75–80. Doi:10.1196/annals.1343.007

- Prasad, S., Lassetter, B., Welker, K. M., & Mehta, P. H. (2019). Unstable correspondence between salivary testosterone measured with enzyme immunoassays and tandem mass spectrometry. *Psychoneuroendocrinology*, 104373. Doi:10.1016/j.psyneuen.2019.10437
- Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. (2004). *Reproduction, Fertility and Development*, 16(2), 33. Doi:10.1071/rd03076
- Rangel-Porta, L. E., & Hernández-Medrano J. H. (2018) Fisiología reproductiva de los animales domésticos. 1era Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México. ISBN: 978-607-30-0671-2
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869–887. Doi:10.1007/s00442-011-1943-y
- Sugianto, N. A., Dehnhard, M., Newman, C., Macdonald, D. W., & Buesching, C. D. (2021). A non-invasive method to assess the reproductive status of the European badger (*Meles meles*) from urinary sex-steroid metabolites. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113655. Doi:10.1016/j.ygcen.2020.113655
- Valdespino, C., Martínez-Mota, R., García-Feria, L. & Martínez-Romero, L. (2007). Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA* (N.S.), [Internet] 23(3). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-
- Wojtusik, J., Brown, J. & Pukazhenth, B. (2017). Non-invasive hormonal characterization of the ovarian cycle, pregnancy, and seasonal anestrus of the female addra gazelle (*Nanger dama ruficollis*). *The-riogenology*, 95, pp.96-104.

CAPÍTULO 8

Estado actual de la clonación en ovinos

José Roberto Vázquez Avendaño^{1, 2}, Demetrio Alonso Ambríz García², Alfredo Trejo Córdova² y María del Carmen Navarro Maldonado²

Resumen

Dentro de las especies domésticas con mayor importancia económica se encuentran los ovinos, esto se debe a su adaptabilidad a diferentes regiones geográficas con climas extremos, así como también a las diferentes bondades que tiene, como su fácil manejo y su gestación relativamente corta en comparación con otras especies de interés zootécnico. Los ovinos son una especie poliéstrica estacional, es decir que tienen varios ciclos reproductivos durante las estaciones de otoño-invierno, el tamaño de la camada suele ser de uno a dos corderos, en algunas razas hasta de tres, ante esta situación las técnicas de reproducción asistida ofrecen el aprovechamiento del potencial reproductivo de los ejemplares de genética valiosa. Entre estas técnicas encontramos la inseminación artificial, la sincronización de estros, la superovulación, la producción *in vitro* de embriones por fertilización *in vitro* y clonación. La producción *in vitro* de embriones clones contempla la separación de blastómeros y la bipartición de embriones obtenidos *in vivo* o por FIV con la finalidad de generar gemelos homocigóticos. También se generan a partir de la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), inicialmente se emplearon diferentes tipos

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,

² Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col Vicentina, A.P. 55-535, D.F. 09340 México. E-mail: robertmizer@gmail.com.

de células embrionarias tales como blastómeros de embriones de dos células, mórulas y células de la masa celular interna. A partir de estos experimentos se obtuvieron corderos recién nacidos, el más relevante de ellos fue la oveja Dolly que se obtuvo a partir de células somáticas de glándula mamaria en el año de 1997, desde entonces se han realizado modificaciones sobre todo en aspectos técnicos para mejorar la eficiencia de la TNCS, actualmente la eficiencia de embriones en etapa de blastocisto oscila entre el 5.3 al 42%, una vez que son transferidos a hembras receptoras y el porcentaje que logra finalizar con un cordero recién nacido es del 5.3 al 15%. Esta baja eficiencia se debe principalmente a aspectos extrínsecos e intrínsecos a la técnica de clonación que van desde una ineficiente reprogramación de la célula somática, un limitado potencial de reprogramación por parte del ovocito, a la técnica en sí misma que involucra una serie de pasos traumáticos para las células y finalmente a los ineficientes sistemas de cultivo *in vitro* de embriones.

Palabras clave: TNCS, Ovinos, Eficiencia, Desarrollo embrionario, Reprogramación nuclear

Introducción

Los ovinos están dentro de las cinco especies domésticas de mayor importancia económica a nivel mundial, se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes regiones geográficas del planeta debido a su gran adaptabilidad a diversas condiciones climáticas (FAO, 2010). A partir de la domesticación de los ovinos hace 9000 años en el medio oriente, han surgido una gran variedad de razas, de las cuales se tiene el registro de aproximadamente 1400 razas, entre las que destacan, Suffolk, Merino, Texel, Corriedale, Barbados Black Belly, entre otras (Romanov *et al.*, 2021). En la Figura 1 se muestran los principales países con mayor producción durante el año 2020, en 1° lugar se encuentra China con 173, 095, 534 ovinos, mientras en la 15° posición tenemos a Kenya con 25,345, 927 individuos. México no figura en la lista de los 15 primeros lugares, sino que se ubica en la posición número 38° con 8,725,882 cabezas de ganado (FAOSTAT).

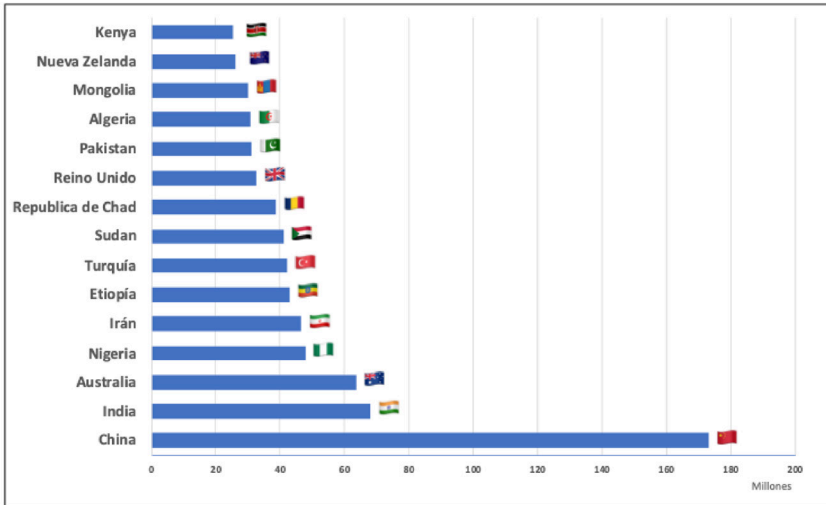


Figura 1. Países con mayor producción de ovinos durante el año 2020. Gráfico: Roberto Vázquez.

En México la crianza de ovinos se realiza en gran medida bajo un sistema extensivo, es decir, que su alimentación se basa en el pastoreo. La producción anual de ovinos en México fue de 8,7 millones para el 2019, los principales estados productores de carne fueron el Estado de México, Hidalgo, Veracruz, Zacatecas, Jalisco y Puebla (Bobadilla-Soto *et al.*, 2021). Como podemos observar tanto en México como a nivel mundial los ovinos tienen una importancia económica relevante, sobre todo en aquellos países con climas extremos donde otras especies domésticas no se podrían adaptar fácilmente.

Los ovinos presentan algunas ventajas en comparación con otras especies de interés zootécnico, por ejemplo, su tamaño mediano facilita su manejo en los sistemas de producción, así como su periodo de gestación que es relativamente corto (150 días) en comparación con otros rumiantes (Loi *et al.*, 2013).

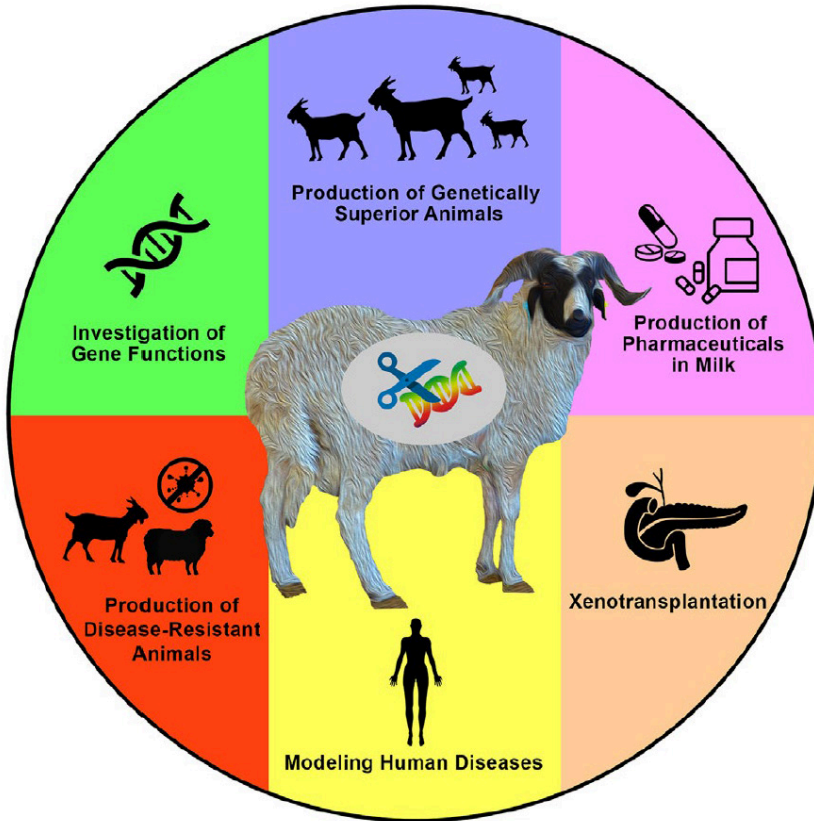


Figura 2. Los ovinos como modelo de investigación biomédica mediante edición genética. Tomado de Kalds et al., 2019.

Los ovinos son una especie doméstica que no solamente tiene importancia a nivel agropecuario, en el contexto del desarrollo de la tecnología de los sistemas CRISPR/CAS9 (del inglés repeats, clustered, short, palindromic, regularly interspaced/CRISPR associated 9) se han utilizado para generar diferentes modelos en ovinos y cabras (Figura 2). En la revisión realizada por Kalds et al. (2019), se describe la generación de diferentes ovinos editados genéticamente mediante la tecnología CRISPR/CAS9, entre los que se puede mencionar el incremento del peso corporal y la aceleración de la tasa de crecimiento, cuyo gen blanco para este fin es la miostatina (MSTN), éste fue aplicado por

primera vez en los ovinos. Otros modelos se han enfocado en la producción de fibras, en este caso se han buscado genes relacionados con la cantidad y la calidad de la lana, por ejemplo, el gen FGF5 (Fibroblasts growth factor 5) que funciona como un inhibidor del crecimiento y el largo de la lana. También se han realizado manipulaciones en los componentes de la leche, cuya finalidad es enriquecerla con determinadas proteínas, como es el caso de la melatonina. En cuanto al mejoramiento al desempeño reproductivo que es un aspecto importante en los sistemas ganaderos, se ha observado que determinados genes están asociados tanto con la tasa ovulatoria como con el tamaño de la camada, unos de los genes candidatos es el GDF9 (Growth differentiation factor 9). Estos son algunos ejemplos, sin embargo, existen más modelos de investigación para el estudio de enfermedades humanas como la fibrosis quística, la generación de individuos resistentes a determinadas enfermedades, entre otros (Kalds et al., 2019).

Dada la importancia de los ovinos en diferentes áreas productiva y de investigación, es importante su manejo reproductivo, para facilitar la reproducción y propagación de determinados individuos, aprovechando al máximo su potencial reproductivo durante su vida útil, para este fin se han empleado diferentes técnicas de reproducción asistida, entre las que podemos mencionar a la inseminación artificial (IA), la cual se realiza a nivel de vagina, cérvix y por laparoscopia intrauterina, siendo esta última con la que se obtienen mejores tasas de fertilización (64%) a partir de semen congelado (Álvarez et al., 2019).

Por otra parte, se encuentra la producción *in vitro* de embriones, los cuales se generan a partir de ovocitos de ovarios provenientes de ovejas *post mortem* o *in vivo* por LOPU (laparoscopic ovum pick-up), madurados *in vitro* (MIV) con un medio base como el TCM-199, suplementado con gonadotropinas (FSH y LH), cisteína, estradiol y suero de oveja en estro como fuente de proteína (Mechaca et al., 2016).

Para la fertilización *in vitro* (FIV), los espermatozoides se seleccionan por las técnicas de swim-up o centrifugación con gradientes discontinuos de Percoll, el medio frecuente que se emplea es el SOF (synthetic oviduct fluid), suplementado con heparina, hipotaurina y suero

de oveja en estro (Mechaca et al., 2016; Paramino e Izquierdo, 2016). Para el desarrollo embrionario, los cigotos se cultivan en medio SOF suplementado con suero de vaca o albumina sérica bovina durante 6 a 7 días, tiempo en el cual los embriones alcanzan la etapa de blastocisto (Mechaca et al., 2016).

Entre la producción *in vitro* de embriones de ovino, también está la clonación de embriones, la cual se puede abordar desde dos puntos de vista distintos pero que buscan la misma finalidad; la primera es una perspectiva horizontal, la cual involucra a las técnicas de separación de blastómeros y la bipartición de embriones, en donde a partir de un solo embrión obtenido *in vivo* o por FIV se generan dos o más embriones y cada uno posee la misma información genética, generando de esta manera gemelos monocigóticos; por otra parte, la visión horizontal hace referencia a la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), básicamente consiste en que a partir de un cultivo de células somáticas del individuo a clonar se tomará la información genética, a esta célula donadora se le denomina carioplasto; el núcleo del carioplasto es insertado en un ovocito desprovisto de su núcleo que servirá como receptáculo citoplasmático, por lo tanto se le llama citoplasto, la unión entre el citoplasto y el carioplasto puede ser mediante fusión celular y para dar inicio a la segmentación se realiza una activación con estímulos eléctricos, químicos, mecánicos o una combinación de éstas. Una vez que se desarrolla el embrión clon, se transfiere a una hembra receptora para su implantación, gestación y finalmente el nacimiento de un cordero clon recién nacido, que es genéticamente idéntico al individuo de donde se obtuvieron las células somáticas (Figura 3) (Navarro-Maldonado et al., 2003).

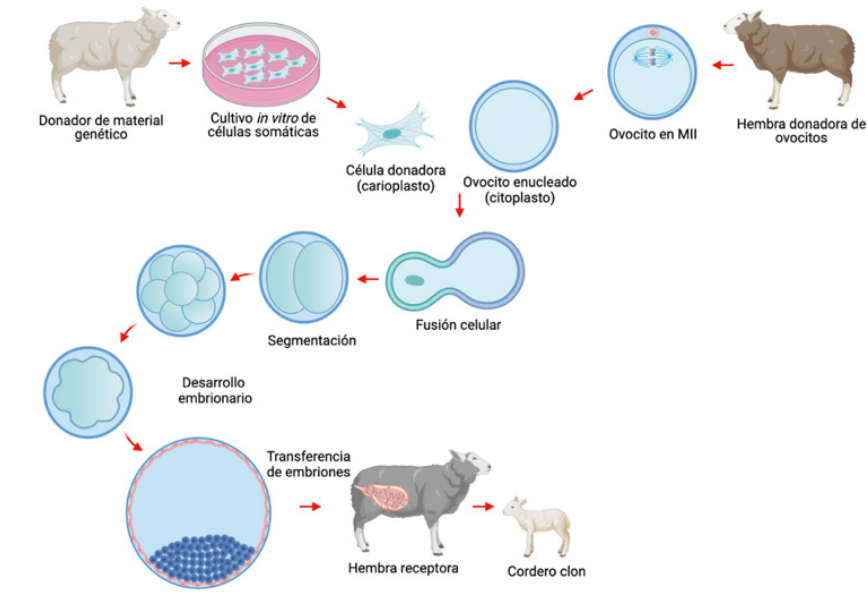


Figura 3. Proceso de la transferencia nuclear de células somáticas en ovinos, Tomado de Vázquez-Avendaño et al., 2022.

Los primeros ensayos de transferencia nuclear se llevaron a cabo en anfibios, posteriormente se extrapolaron a mamíferos, específicamente en ovinos, en donde se emplearon como células donadoras de información genética; blastómeros de embriones tempranos, así como también una línea celular derivada de la masa celular interna de un blastocisto, en ambos casos los embriones clones finalizaron con el nacimiento de crías recién nacidas (Willadsen, 1986; Campbell et al., 1996). Sin embargo, las células embrionarias son pluripotentes y poco diferenciadas, por lo cual, el reto era investigar si las células somáticas terminalmente diferenciadas serían capaces de generar embriones que finalizaran con corderos recién nacidos. La respuesta a esta pregunta fue el nacimiento de la oveja Dolly, en 1997, la cual se genera a partir de una célula epitelial de glándula mamaria. Con este acontecimiento se demostró que las células somáticas no pierden su información genética durante el proceso de diferenciación, sino que

es silenciado y pueden volverse a activar bajo determinadas condiciones (Figura 4) (Willmut *et al.*, 1997).

Una revisión en la base de datos de Web of Science dio como resultado 124 artículos sobre reproducción de ovinos mediante TNCS (Figura 3), de los cuales 118 son artículos de investigación y los restantes 6 son artículos de revisión. Como se puede observar en la Figura 3, el incremento en la publicación de artículos ha fluctuado de uno a doce artículos desde la publicación del nacimiento de la oveja Dolly, con un promedio de cinco publicaciones por año. El año con mayor número de publicaciones fue el 2013 (Vázquez-Avendaño *et al.*, 2023).

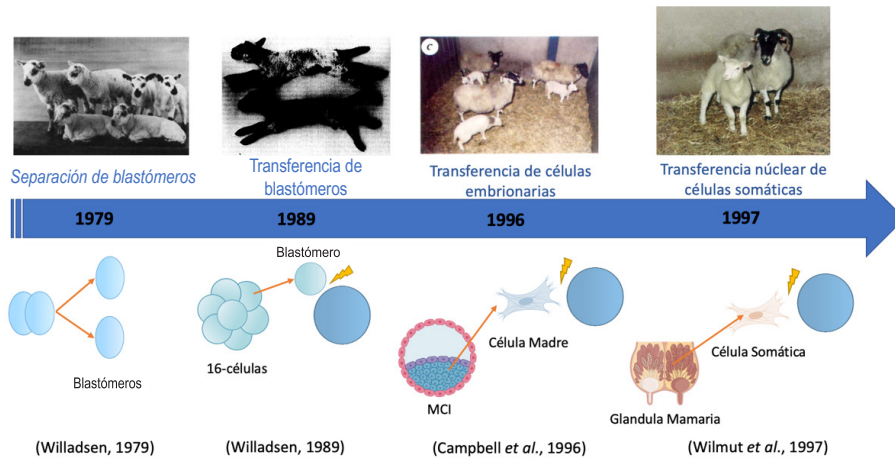


Figura 4. Transferencia nuclear a partir de células embrionarias y somáticas. Gráfico: Roberto Vázquez.

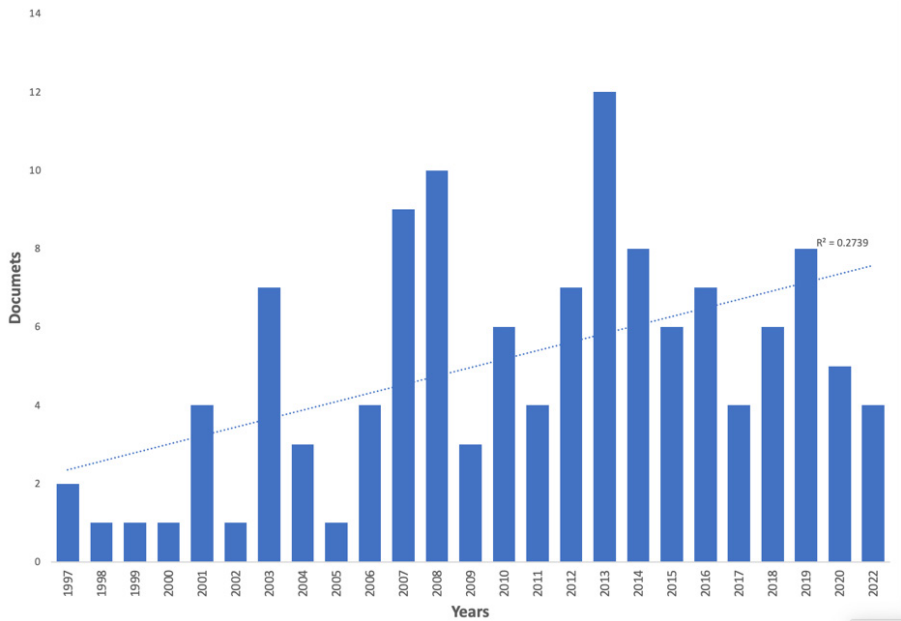


Figura 5. Publicaciones científicas sobre reproducción de ovinos mediante TNCS. Tomado de Vázquez-Avendaño *et al.*, 2023.

No obstante, el proceso de TNCS es muy ineficiente para todas las especies en general, en el caso particular de los ovinos, como se puede observar en la Tabla 1, se ha reportado del 5.3 al 42% de embriones en etapa de blastocisto, mientras que en la Tabla 2, la eficiencia de los embriones que son transferidos y que finalizan con el nacimiento de corderos es del 5.3 al 15% (Vazquez *et al.*, 2022). Este fenómeno se debe en parte a cuatro diferentes factores: el bajo potencial de reprogramación de los ovocitos utilizados como citoplastos, la resistencia a la reprogramación por parte de las células somáticas empleadas como carioplastos, al traumatismo que pueden sufrir las células durante el proceso de manipulación y a las condiciones de cultivo *in vitro* durante el desarrollo embrionario (Simmet *et al.*, 2021).

Tabla 1. Eficiencia de embriones in vitro de ovinos mediante transferencia nuclear de células somáticas.

Método de clonación	Tipo celular	Tratamiento	Tasa de blastocistos (%)		Cambio (%)	Referencia
			Antes	N/ES Después		
Convencional	FF	-	11.5	-	-	Li et al. (2021)
			37/323			
	FFT	-	13.1	-	-	
			31/236			
Convencional	FF	Agregación embrionaria	16 186/1192	13 703/5510	-3	McLean et al. (2021)
Convencional	CC	Zebularina y scriptaid	21.16 100/463	28.25 129/455	7.09*	Fang et al. (2020)
Convencional	FA ^D	Vitamina C	17.9 41/233	25.9 57/219	8*	Zhang et al. (2020b)
	FA ^{BM}	Vitamina C	32.3 39/114	42 52/122	7.7*	
Convencional	CC	Zebularina	11.8 12/101	25.4 30/117	13.2*	Cao et al. (2019)
Convencional	FF	Chaetocina	9.8 8/96	10.6 11/106	0.8	Zhang et al. (2018)
Convencional	FFT	KDM4D	11.3 17/157	19.2 31/162	7.9*	Zhang et al. (2018a)
Convencional	FA	-	5.3 5/105	-	-	Khan et al. (2018)
HMC	FA	-	12.5 8/59	-	-	

Método de clonación	Tipo celular	Tratamiento	Tasa de blastocistos (%)		Cambio (%)	Referencia
			Antes	N/ES Después		
Convencional	FF	iPSCs	10 17/178	2 3/158	-8*	German et al. (2015)
Convencional	FA	-	14.6 15/103	-	-	Ma et al. (2013)
Enucleación Manual	FA	-	11.2 323/36	-	-	Hosseini et al. (2013)
Convencional	CC	Scriptaid	8.6 5/59	25.7 17/66	17.1*	Wen et al. (2014)
Convencional	FF	BIX01294	18.7 10/53	18.3 11/63	-0.4	Fu et al. (2012)
Convencional	FF	-	22.6 83/367	-	-	Heidari et al. (2010)
	CC	-	23.6 27/114	-	-	

Número de blastocistos (N). Embiones segmentados (ES). Handmade cloning (HMC). Dorper (D), Booroola Merino (BM), Fibroblastos fetales (FF). Fibroblastos adultos (FA). Fibroblastos fetales transgénicos (FFT). Células del cumulus (CC).

Diferencia estadísticamente significativa *p < 0.05. Tomado y adaptado de Vazquez-Avenida et al., 2022.

Para mejorar el estado epigenético de los embriones clones se han empleado diferentes moléculas que funcionan como reguladores epigenéticos tales como scriptaid, zebularina, KDM4, chaetocina así como también la vitamina C, que aparte de servir como un antioxidante tiene un efecto de regulación epigenética. Algunas de estas moléculas se han utilizado directamente en el cultivo de las células somáticas, durante el desarrollo embrionario, o ambos. Sin embargo, se debe tener en consideración la concentración que se emplea porque se puede generar un efecto negativo (Tabla 1) (Vázquez *et al.*, 2022).

También se han seguido estrategias mediante el uso de extractos de huevos de anfibios para reprogramar el núcleo de las células somáticas previo al proceso de clonación, lo cual ha dado como resultado un 14.7% de embriones que finalizaron con el nacimiento de corderos, sin embargo, no todos lograron llegar a la etapa adulta (Rathbone *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha utilizado la agregación de mórulas previo a la compactación de éstas, si bien no hay diferencias estadísticamente significativas entre los blastocistos originados a partir de una o dos mórulas, si se observa un efecto positivo en la sobrevivencia de los blastocistos después de un proceso de vitrificación que se ve reflejado en el aumento del porcentaje de corderos clones obtenidos de embriones vitrificados (McLean *et al.*, 2021).

Tabla 2. Eficiencia de corderos recién nacidos mediante transferencia nuclear de células somáticas.

Método de clonación	Tipo celular	Tratamiento	Corderos (%)		Incremento (%)	Referencia
			Antes	Después		
Convencional	FF	Agregación embrionaria	9 11/120 BT	15 21/138 BT	6*	McLean et al. (2021)
Convencional	CC	Reducción de suero e ionómicina	0 0/11 CE	7.1 1/14 CE	7.1**	Demir et al. (2019)
Convencional	FF	-	22 8/36 FR	-	-	Koroghli et al. (2018)
Convencional	FT	-	10 23/232 CE	-	-	Li et al. (2016)
Convencional	FF	-	19.5 16/82 CE	-	-	Rutigliano et al. (2015)
HMC	FT	-	5.7 3/53 BT	-	-	Zhang et al. (2013)
Convencional	FA	CR1aa vs SOFaa	0 0/24 FR	15.3 4/26 FR	15.3	Xue et al. (2011)
Convencional	FF	Extractos de ovocitos ^s	3.1 2/65 BT	14.7 10/68 BT	11.6**	Rathbone et al. (2010)

Número de embriones (N). Embriones transferidos (ET). Embriones segmentados (CE). Blastocistos (BT). Hembras receptoras (FR). Medio Charles Rosenkrans suplementado con aminoácidos (CR1aa). Medio fluido sintético oviductal suplementado con aminoácidos (SOFaa). ^sExtractos de ovocitos de *Xenopus laevis*. Fibroblastos fetales (FF). Fibroblastos adultos (FA). Fibroblastos transgénicos (FT). Células del cumulus (CC).

Diferencia estadísticamente significativa *p < 0.045 or **p < 0.05. Tomado y adaptado de Vazquez-Avenida et al., 2022).

La aplicación de la TNCS en ovinos se centra en tres puntos principales, la clonación de animales con genética de alto valor comercial, la conservación de ovinos salvajes en peligro de extinción y la generación de ovinos modificados genéticamente para la investigación biomédica en la producción de proteínas, vacunas, modelos animales para el estudio de enfermedades humanas, etc.

La transferencia nuclear de células somáticas implica una serie de pasos desde la obtención de células somáticas y ovocitos hasta el cultivo *in vitro* de embriones clonados, gran parte de los estudios se ha centrado en mejorar aspectos técnicos en cada uno de estos pasos, con el fin de hacer más sencilla y eficiente a la técnica (Hosseini et al., Lagutina et al., 2007; 2013; Vajta et al., 2001). Esto solo ha solucionado una parte de los problemas de TNCS, ya que la principal limitación es la reprogramación nuclear de la célula somática, en el caso particular de las ovejas se presentan problemas epigenéticos en la línea celular del trofotodermo (Beaujean et al., 2004), lo que resulta en la formación de una placenta disfuncional, que compromete la viabilidad del feto (Ni et al., 2016). En este punto intervienen factores intrínsecos tanto en las células somáticas como en los ovocitos, parte de la literatura se ha centrado en este aspecto, por ejemplo, se han analizado diferentes tipos celulares en función de su edad (Heidari et al., 2010) o grado de diferenciación (Zhao et al., 2020). Por otro lado, se ha analizado el potencial de reprogramación de ovocitos obtenidos de diferentes fuentes como hembras *in vivo* o *post mortem*. También, muchos estudios se ha centrado en analizar el efecto de diferentes componentes químicos que funcionan como reguladores epigenéticos durante el cultivo de células somáticas o clones de embriones (Tabla 1). Finalmente, existen pocos estudios que eluciden los mecanismos involucrados en TNCS.

Referencias bibliográficas

Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., de Paz P., & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: a particular insight, *Reproduction in Domestic Animals*, 54: 32-40.

- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., & Young, L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 71: 185-93.
- Bobadilla-Soto, E. E. (2021). Dinámica de la producción y consumo de carne ovina en México 1970 a 2019. *Agronomía Mesoamericana*, 32: 963-982.
- Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- FAO, (2015). The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, edited by B. D. Scherf & D. Pilling. FAO commission on genetic resources for food and agriculture assessments. Rome.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAOSTAT, Crops and livestock products, Recuperado el 21 de Diciembre de 2021 de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Heidari, B., Shirazi, A., Tajic, P., Ahmadi, E., Nazari, H., Shams-Esfandabadi, N., & Ghasemzadeh-Nava, H. (2010). Effect of donor cell age on development of ovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Zygote*, 18, 331-338.
- Hosseini, S.M., Hajian, M., Moulavi, F., Asgari, V., Forouzanfar, M., & Nasr-Esfhani, M.H. (2013). Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette. *Cellular Reprogramming*, 15, 15-23.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., & Galli, C. (2007). Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, 67: 90-8.
- Loi, P., Czernik, M., Zacchini, F., Iuso, D., Scapolo, P.A., & Ptak, G. (2013). Sheep: the first large animal model in nuclear transfer research. *Cellular Reprogramming*. 15, 367-373.

- Loi, P., Toschi, P., Zacchini, F., Ptak, G., Scapolo, P., Capra, E., Stella, A., Ajmone, P., & Williams, J. (2016). Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. *Genetics. Selection. Evolution.* 48, 53.
- Kalds P., Zhou S., Cai B., Liu J., Wang Y., Petersen B., Sonstegard T., Wang X., & Chen Y. (2019). Sheep and Goat: From random transgenesis to the CRISPR era. *Frontier in Genetics.* 10: 750.
- Navarro-Maldonado, M.C., Rosado-García, A., & Serrano. H.F. (2003) Técnicas de clonación de embriones. In: Moreno CR. Ciencia Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. 9: 35-74.
- Ni, W., You, S., Cao, Y., Li, C., Wei, J., Wang, D., Qiao, J., Zhao, X., Hu, S., & Quan, R. (2016). Aberrant expression of miR-127, miR-21 and miR-16 in placentas of deceased cloned sheep. *Research in Veterinary Science*, 105, 200-204.
- Mechaca A., Barrera N., dos Santos Neto P. C., Cuadro F., & Crispo M. (2016). Advances and limitation of in vitro embryo production in sheep and goats, *Animal Reproduction*, 13: 272-278.
- McLean, Z., Appleby, S.J., Fermin, L.M., Henderson, H.V., Wei, D., Wells, D.N., & Oback B. (2021). Controlled cytoplasm arrest and morula aggregation enhance development, cryoresilience, and in vivo survival of cloned sheep embryos. *Cellular Reprogramming.* 23, 14-25.
- Paramino, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants, *Theriogenology*, 86: 152-159.
- Rathbone, A.J., Fisher, P.A., Lee, J.H., Craigon, J., & Campbell, K. (2010). Reprogramming of ovine somatic cells with xenopus laevis oocyte extracts prior to SCNT improves live birth rate. *Cellular Reprogramming.* 12, 609-616.
- Romanov, M.N.; Zinovieva, N.A., & Griffin, D.K. (2021). British Sheep Breeds as a Part of World Sheep Gene Pool Landscape: Looking into Genomic Applications. *Animals*, 11, 994.

- Simment, K., Wolf, E., & Zakhartchenko, V. (2021). Manipulating the epigenome in nuclear transfer cloning: where, when and how. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 236.
- Willadsen, S. M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320: 63-65.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, J., & Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385, 810-813.
- Vajta, G., Lewis, I., Hyttel, P., Thouas, G., & Trounson, A. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators, *Cloning* 3, 89-95.
- Vázquez-Avendaño, J. R., Ambríz-García, D. A., Cortez-Romero, C., Trejo-Córdova A., & Navarro-Maldonado, C. (2022). Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer. *Small Ruminant Research*, 212: 106702.
- Vázquez-Avendaño, J.R., Cortez-Romero, C., Bravo-Vinaja, Á., Ambríz-García, D.A., Trejo-Córdova, A., & Navarro-Maldonado, M.d.C. (2023). Reproduction of Sheep through Nuclear Transfer of Somatic Cells: A Bibliometric Approach. *Animals*, 13, 1839.
- Zhao, R., Zhang, Q., Liu, K., Yang, P., Sun, Y., Zhang, Y., & Liu, Z. (2020). Isolation, culture, and induced multiple differentiation of Mongolian sheep adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Histotechnology*. 43, 125-134.

CAPÍTULO 9

Uso potencial de Nanopartículas en la Producción Animal

Patricia Rodríguez Santillán¹

Resumen

La nanotecnología es una ciencia muy interesante, que “nano” de vávoç significa enano, techné es la técnica o habilidad, y logos, su estudio, donde un nanómetro equivale a una milmillonésima parte de un metro (10^{-9} metros). Los nanomateriales pueden medir de 1–100 nm y siguen transformándose (Sahani and Sharma, 2020). En el área de la salud, la Bionanotecnología ofrece grandes alternativas, como mejorar las formulaciones de nanopartículas (Nano-moléculas). Estas moléculas bioactivas pueden ser: antioxidantes, vitaminas, minerales, entre otros. Este tamaño Nano proporciona la liberación de forma controlada y prolongada en el tiempo, y dirigida a un determinado sitio específico del organismo, bajo ciertas condiciones (Wandrey et al., 2009). En ganado bovino, algunos estudios afirman que las alteraciones en la reproducción se asociaron con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en espermatozoides y ovocitos provocando una disfunción mitocondrial y en sus membranas. Por lo que el uso de la Nanobioingeniería en problemas de estrés oxidativo traerá consigo importantes descubrimientos y aplicaciones en la salud de las células, como los espermatozoides y ovocitos bovinos. En esta investigación, se utiliza la Bionanotecnología para prevenir el daño, causado por las ROS, sabiendo que no todas las moléculas donadoras de electrones (antioxidantes) ingresan fácilmente a la célula. El uso de curcumina en su estado natural tiene una baja tasa de biodisponibilidad, se metaboliza y elimina rápidamente, en forma nano, no trae esos problemas

1 Departamento de Alimentos y Nanotecnología. E mail: rsantillan.dra712@gmail.com, Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN) UANL, Ciudad Apodaca, Nuevo León, México.

(Sureshbabu et al., 2023). Se evaluó la citotoxicidad de Nanopartículas antioxidantes (NPs) (Curcumina 20 nm) en semen fresco “in situ”, así como “in ovo” en embriones de pollo, con 5 concentraciones diferentes (1, 5, 10, 50, 100µg), donde la viabilidad no se vio afectada significativamente a ninguna concentración, por lo que la concentración citotóxica al 50 % se estimó por encima de 1000 NPs en 0.2 mL. Ningún embrión mostró daño en su apariencia, tamaño, ni a nivel histológico. En cuanto al efecto antioxidante, se evaluó “in situ” en espermatozoides bovinos frescos, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a las 0 y 2 h post-descongelación y el vigor espermático. Se utilizaron 5 diluciones de NPs en el diluyente: 1, 5, 10, 50, 100 ml/lt, más un grupo control. A las cero horas se observó una diferencia significativa entre el grupo control y los demás tratamientos, observándose mayor motilidad en el grupo de 5 ml/lt de diluyente con NPs. Y en semen post-descongelado, las muestras tratadas con 5 ml/lt de diluyente con NPs presentaron una motilidad progresiva del 60% a las 0 hr del 55% a las 2 horas post-descongelado. Esta actividad antioxidante a dosis no citotóxicas permite considerar que el uso de NPs antioxidantes de origen natural (Curcumina) permitiría obtener espermatozoides más viables y sanos para ser utilizados con éxito en Inseminación Artificial (IA). La adición o suplementación de antioxidantes en su forma Nano podría contribuir a mejorar significativamente la viabilidad de las células reproductivas en bovinos.

Palabras clave: bionanotecnología, antioxidantes, cúrcuma, reproducción asistida, espermatozoides.

Introducción

Qué es la Nanotecnología

Nanotecnología es una ciencia nueva que está ganando terreno en todos los ámbitos, su etimología nos muestra que “nano” de vávoç significa enano, y corresponde a un factor 10^{-9} , aplicado a las unidades de longitud, un nanómetro equivale a una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} metros), techné es la técnica o habilidad, y logos, su es-

tudio. Es entonces que la Nanotecnología se define como el estudio de la manipulación de partículas con dimensiones inferiores a una micra (McClements *et al.*, 2009).

La Nanotecnología es el estudio, diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales (nanopartículas) y dispositivos que tienen su organización funcional en la escala de los nanómetros (nm), en un rango que puede variar desde pocos nanómetros hasta los 100 nm. (Sahani and Sharma, 2020). Sólo por comparar, tenemos que un eritrocito mide 10,000 nm, una bacteria mide 1000 nm, un virus 100 nm, una proteína 5-50 nm y el átomo 0.1nm (Cintas, 2006).

La unión de la Biotecnología con la nanotecnología se ha denominado Bionanotecnología que consiste en aplicar todas las técnicas y los nanomateriales que ofrece la nanotecnología y así poder potenciar los alcances de la Biotecnología (Delgado, 2007).

La nanotecnología, es considerada como el arte de manipular la materia, átomo por átomo, esto debido a que la materia a nanoescala, (entre 1 y 100 nm) se rige bajo las leyes de la *Mecánica Cuántica* por lo que sus propiedades serán totalmente distintas a las que presenta en su dimensión macro, estas nuevas propiedades son las de mayor interés para los científicos, creando nuevos materiales (nanomateriales) o dispositivos nanotecnológicos, por esto la Nanotecnología promete soluciones a múltiples problemas que enfrenta actualmente la humanidad, como problemas ambientales, energéticos, de salud (nanomedicina), etc., sin embargo, como toda nueva tecnología, si son mal utilizadas pueden generar riesgos y peligros (Coppo, 2009).

Uso de la Nanotecnología

La nanotecnología tiene incalculables aplicaciones en diversas áreas: ingeniería, electrónica, medicina, industria farmacéutica, construcción y medio ambiente, entre otras. Un uso importante puede evidenciarse en el tratamiento del cáncer y la diabetes, otro uso son nanosistemas para la liberación de fármacos, membranas para el tratamiento del agua, pinturas especiales; vidrios y telas que repelen agua y suciedad y otros usos que ya se comienzan a ver en la vida diaria (Romig *et al.*, 2007).

Necesidades en Medicina Veterinaria, para la reproducción y conservación de las especies

Ahora, en el campo Veterinario en general, la aplicación de la nanotecnología, podría ayudar en resolver problemas difíciles y diversos como la detección temprana de patologías, tratamiento y seguimiento, a partir del empleo de nano-sistemas orientados al diagnóstico y el tratamiento localizado. La nanotecnología puede ayudar en el diagnóstico de enfermedades, en el sistema de administración de fármacos, para el tratamiento de enfermedades, en la cría de animales, en productos pecuarios, en productos cárnicos, en la seguridad alimentaria y por supuesto, en la Reproducción Animal (Tomalia, 2005).

Al hablar de reproducción, específicamente reproducción asistida, un tema de gran importancia es la criopreservación de tejidos gonadales, espermatozoides, ovocitos, y embriones, tema que ha sido objeto de nuevos trabajos de investigación en reproducción animal. La inseminación artificial es utilizada en prácticamente todos los sectores pecuarios. Sin embargo, en producción bovina, esta técnica presenta desventajas considerables en la supervivencia espermática y por ende sobre las tasas de fecundación y fertilidad. En los espermatozoides se ha mencionado que una generación excesiva de ERO, se correlacionan con problemas en la funcionalidad espermática (movilidad, daño a la mitocondria y al ADN), sin embargo, producidas en cantidades adecuadas, se vinculan con aspectos de señalización celular y capacidad fertilizante (Rivlin, 2004).

Como trabaja la Bionanotecnología

Con los llamados “nanomateriales” que son las estructuras creadas por la investigación nanotecnológica, cuyo tamaño oscila entre 1 y 100nm y para comprender todo el potencial que tiene este nanomaterial, es fundamental saber que las propiedades físicas y químicas cambian, la conductividad eléctrica, el calor, la resistencia, la reactividad y la elasticidad se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala. Al emplear la nanotecnología me-

diente nanopartículas (NPs), que pueden ser nanotubos de carbono, puntos cuánticos, liposomas, polímeros etc. en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades es de suma interés (Feneque, 2009).

La bionanotecnología es prometedora para la medicación y la nutrición, porque los nanomateriales exhiben propiedades novedosas y diferentes a las de un átomo aislado y material en masa, esto es, porque las nanopartículas presentan un mayor volumen superficial con tamaño decreciente de la partícula, presentando además propiedades químicas, físicas, fotoelectroquímicas y electrónicas únicas en comparación con sus respectivos materiales a granel. Por lo que estas nanopartículas aventajan a las micropartículas por ofrecer mayor solubilidad y disponibilidad. El comportamiento de las nanopartículas es en función a su tamaño, forma y reactividad superficial con el tejido circundante. Mientras más pequeña es una partícula, mayor es la relación de área de superficie a volumen y cuanto mayor sea su reactividad química y actividad biológica. El suministro de nanofarmacos o nanominerales o nanoantioxidantes biológicamente más activos, debido a su área superficial muy grande aumentando su biodisponibilidad (Sahani and Sharma, 2020).

Algunas de las ventajas al utilizar estos nanosistemas es que aumentamos la posibilidad de suministrar fármacos, alimentos o metabolitos de interés como antioxidantes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés. Protegerlo de la degradación enzimática. Evitar la inactivación (antioxidantes, vitaminas, etc). Evitar la oxidación (hormonas esteroideas). Evitar la hidrólisis (Hormonas gonadotrópicas) (Wang et al., 2007).

Bionanotecnología en nutrición animal

En la producción animal, el hablar de fallas reproductivas en machos y hembras, los factores nutricionales (excesos o carencias) son de mayor importancia, ya que afectan generalmente a todo el hato, esto se traduce en que el sistema digestivo y hepático no pueden aportar la energía suficiente para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de estructuras involucradas en los procesos reproductivos, por lo

que urge el desarrollo de nanopartículas o liposomas nanométricos capaces de tener una liberación sostenida, nanosistemas de moléculas, incluyendo hormonas, vitaminas, antibióticos, antioxidantes, que tengan esa biodisponibilidad para ser aprovechado por el animal, los problemas reproductivos de tipo individual pasan a segundo plano, cuando el problema es que no se cubre los requerimientos nutricionales (Chen *et al.*, 2008).

Se sabe que, además de la materia seca, la energía y la proteína (también son causa de problemas reproductivos muy importantes), los minerales, vitaminas y antioxidantes, flavonoides y biomoléculas son elementos de la dieta que no podemos subestimar ya que intervienen en funciones fisiológicas que directamente o indirectamente pueden afectar el proceso reproductivo (Mahan *et al.*, 1999).

Una buena suplementación con macro y minerales en la dieta del animal es esencial, sin embargo debemos contemplar un detalle, la biodisponibilidad que tiene el mineral. La biodisponibilidad de un mineral en una fuente particular se determina en relación con su disponibilidad funcional de una fuente estándar. El uso de una fuente estándar permite la expresión de la biodisponibilidad en términos de disponibilidad biológica relativa (Chen *et al.*, 2006).

Esta biodisponibilidad se ve afectada por muchos factores, desde la especie animal (rumiante o no rumiante), el estado fisiológico (gestación, lactancia, parto), la nutrición previa, las interacciones con los nutrientes e ingredientes de la dieta, la elección de los criterios de respuesta, la elección de la fuente estándar y la forma química y la solubilidad del elemento mineral. Es por esto que se ha buscado la ayuda de tecnologías para aumentar la biodisponibilidad de los minerales, el nanomineral es un ejemplo. Los minerales a nanoescala mejoran la biodisponibilidad debido al aumento en la superficie. Además, la técnica de nanoencapsulación evita la interacción mineral-mineral o mineral-nutriente y mejora su disponibilidad. Se puede sintetizar por medios físicos, químicos y biológicos (Rajendran, 2013).

Bionanotecnología en reproducción animal

Un campo, de mucho interés, donde la nanotecnología puede florecer, es, sin duda, la Reproducción y Fertilidad Animal. Estos grandes esfuerzos innovadores no solo tienen como objetivo poder caracterizar y manipular la materia a nanoescala, sino desarrollar productos y procesos con valor económico, social y ambiental agregado, dirigido a solucionar problemas ya existentes en el área animal.

La mayor ventaja al utilizar estas nanopartículas es su liberación sostenida, mostrándose una baja toxicidad sistémica, permitiendo un tratamiento dirigido, y evitando inactivación o degradabilidad de biomoléculas que son sensibles a la luz (por ejemplo, vitaminas, antioxidantes), oxidación (por ejemplo, hormonas esteroideas) y/o hidrólisis por ejemplo, hormonas gonadotrópicas (Wang *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo afecta el potencial de fertilidad de los espermatozoides por la peroxidación lipídica que puede conducir a la disfunción del espermatozoide (Badade *et al.*, 2011). Los antioxidantes son necesarios para ayudar o prevenir problemas reproductivos, pero estas biomoléculas presentan varios inconvenientes, como son baja estabilidad, fácil degradación, tamaño, etc., por lo que una forma nanométrica o un liposoma cargado de un nanoantioxidante solucionaría estos problemas, haciéndolo más biodisponible y más protegido, para que actúe donde debe actuar. Por lo tanto, un nanoantioxidante promete prevenir problemas como: la retención de placenta y otros problemas reproductivos después del parto y también para mejorar los problemas de infertilidad (Govin, 2004).

Antioxidantes de origen natural como la Cúrcuma (molécula activa: Curcumina) que se obtiene de una raíz (*cúrcuma longa*) a la que se le atribuyen numerosas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Sin embargo, esta molécula tiene características que la hacen ser muy inestable y poco biodisponible, se metaboliza y se elimina rápidamente, por lo que se busca mejorar su tiempo de vida, aumentar su absorción, su farmacocinética y mejorar su solubilidad, así que se procede a la nanoencapsulación (Catania *et al.*, 2013, Sureshbabu *et al.*, 2023).

Aplicación de la Bionanotecnología (Nanopartículas antioxidantes) para mejorar la reproducción asistida, en bovinos de producción

Se identificaron y se recolectaron las plantas nativas que contienen los compuestos fenólicos de interés con potencial antioxidante. Para luego extraer y estandarizar de los bioactivos antioxidantes. Se sintetizaron, caracterizaron y funcionalizaron las NPs antioxidantes. Las NPs se resuspendieron en medio D-MEM/F12 para tener un stock de 2500 µg/mL, que se conservó en refrigeración hasta su utilización. A partir del stock se hicieron diluciones en medio PBS para obtener las concentraciones seleccionadas para la prueba de citotoxicidad “*in ovo*” y el efecto antioxidante, “*in situ*” en células espermáticas bovinas en fresco, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a las 0 y 2 h post-descongelación y el vigor espermático.

Se colectó semen de 5 toros, y se mezcló (pool) para bloquear el efecto individual de los toros. Este semen se dividió en 6 partes para los seis diferentes tratamientos (concentraciones de las NPs del antioxidante). Se realizaron 5 diluciones, más un grupo control. Las 6 alícuotas fueron procesadas en diluyente TRIS-yema de huevo. Se ajustó la dosis a 20×10^6 espermatozoides / mL en pajillas de 0.25 mL. El semen se adaptó al glicerol durante 4 horas y posteriormente se congeló 5 cm por encima de vapores de nitrógeno durante 15 minutos y posteriormente se hizo la inmersión directa al nitrógeno líquido.

- Pruebas de citotoxicidad “*in ovo*” de las NPs antioxidante

En esta investigación se implementó el uso de un modelo “*in ovo*” prometedor para la identificación de lesiones o daños que pudieran causar el uso de las NPs, cumpliendo como una herramienta muy útil, con ventajas sobre los modelos “*in vitro*” e “*in vivo*” al evaluar otras Nanopartículas (Díaz et al., 2016).

El modelo “*in ovo*” es una técnica económica, sencilla, lo más cercana al metabolismo de un ser vivo, sin necesitar de la aprobación de un Comité de Ética. Nuestros resultados muestran que las Nanopartículas antioxidantes no produjeron ningún efecto toxico para el embrión a do-

sis 1, 5, 10, 50, 100 μg de NPs en 0.2 mL, ni en la dosis concentrada 2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del stock original. A nivel histológico tampoco se encontraron lesiones por bioacumulación de las NPs (CE50). No se encontró ningún cambio de coloración ni lesiones aparentes o irritaciones aparentes en comparación con los embriones control no expuestos a las NPs antioxidantes, por lo que se obtuvo una concentración citotóxica al 50% arriba de los 1000 de NPs en 0.2mL.

- Efecto Viabilidad/citotoxicidad en semen fresco.

A las cero horas se vio diferencia entre el grupo control y los demás tratamientos, observando mayor motilidad en el grupo de 5 ml/lt de diluyente con NPs. Se procedió a congelar el semen para posteriormente evaluar la motilidad al descongelarlo.

- Efecto Viabilidad/citotoxicidad post-descongelación.

Se evaluaron las muestras de semen post-descongelación, las muestras con el tratamiento de 5 ml/lt de diluyente con NPs presentaron una motilidad progresiva de 60% a las 0 h y 55% a las 2 horas post-descongelación.

Otro efecto benéfico de las Nanopartículas a nivel membrana celular posiblemente dañada por los efectos de las especies reactivas (ERO) es que las Nanopartículas se han construido con bicapas lipídicas muy similares a la membrana celular, que al momento de entrar a la célula ésta se fusiona con los fosfolípidos de la membrana, sin provocar daño ni acumulación de algo extraño en la célula (espermatzoide). Podemos explicar también, que debido al tamaño de la NP (20 nm) entra fácil y directamente hasta la mitocondria que son las generadoras de ERO.

La adición o suplementación de antioxidantes en su forma Nano, podría contribuir a mejorar significativamente la viabilidad de las células reproductivas en bovinos y otras especies domésticas y silvestres.

Conclusión y Futuro de la Nanotecnología en Medicina Veterinaria y Producción Animal

Sin lugar a duda, la utilización de biotecnologías reproductivas en Medicina Veterinaria va en aumento, lo que nos obliga a realizar una revisión constante, e ir perfeccionando los métodos y las técnicas de aplicación, poco a poco. Por lo que la llegada de la nanotecnología a este campo, nos traerá cambios importantes y hasta radicales en la profesión Veterinaria, ya se muestra como una tecnología que ayuda a los profesionales a mantenerse al tanto y gestionar estos desarrollos aplicados (Coppo, 2009).

Para apreciar las ventajas de esta tecnología, las necesidades de la profesión, debemos entender también las nuevas tecnologías, como la clonación y las células madre. Al emplear la nanotecnología mediante nanopartículas como nanotubos de carbono, puntos cuánticos, liposomas, polímeros etc. en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades es de gran interés. Sin embargo, la investigación a través de la nanotecnología en el sector Veterinario todavía se requiere investigación profesional (como pruebas citotóxicas) para apoyar la efectividad y seguridad de la nanotecnología, y así evitar cualquier daño al medio ambiente, a seres humanos o a los mismos animales. La nanotecnología en la reproducción animal y la reproducción asistida, son áreas de oportunidades crecientes y florecientes para la investigación y desarrollo. Este campo emergente ofrece sobresalientes oportunidades para los investigadores desafiantes al proporcionar nuevas soluciones a viejos problemas, teniendo un gran potencial para demostrar el continuo avance hacia adelante en los próximos años.

La perspectiva de futuro inmediato en Producción Animal, vemos la posibilidad de la aplicación global de nanoselenio en nutrición, reproducción, así como en medicina clínica. En técnicas de Reproducción Asistida el uso de estas NPs con función antioxidante, puede ser valioso para enriquecer medios de cultivo y lograr un aumento en la viabilidad de gametos y de embriones contrarrestando o previniendo los daños causados por las especies reactivas (ERO). Un tema de gran importancia es la criopreservación de espermatozoides, ovocitos, y em-

briones. La IA presenta desventajas considerables en la supervivencia espermática y por ende en la tasa de fecundación y de fertilidad. La aplicación de estas NPs implicaría el poder crear y/o diseñar nuevas biotecnologías reproductivas, como el desarrollo de nuevos medios de cultivo para lograr una mejoría en la supervivencia y viabilidad de estas células sexuales y obtener un aumento en la producción de embriones. Es importante resaltar que esta tecnología también podría ser aplicada a otras especies de importancia productiva, tanto domésticas, silvestres y especies en peligro de extinción (Cintas-Izarra, 2006).

Referencias bibliográficas

- Badade, Z.G., & Narshetty, J. (2011). Oxidative stress adversely affects spermatogenesis in male infertility. *Biomedical Research*, 22(3): 323-328.
- Catania, E., & Barrajón-Catalán. (2013). Immunoliposome encapsulation increases cytotoxic activity and selectivity of curcumin and resveratrol against HER2 overexpressing human breast cancer cells *Breast Cancer Research Treatment*, 1(2):55-65.
- Chen, L., Remondetto, G.E., & Subirade, M. (2006). Materials based on food proteins as nutraceutical administration systems. *Food Trends Science Technology*, 17(5): 272-283.
- Chen, T., Wong, Y.S., Zheng, W., Bai, Y., & Huang, L. (2008). Selenium manufactured in polysaccharide solutions of *Undaria pinnatifida* induces mitochondrial-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 67(1): 26-31.
- Cintas-Izarra, L.M. (2006). Nanotecnología: La revolución industrial del siglo XXI. *Madrid (UCM)*, 2:11.
- Coppo, J. (2009). Nanotecnología, Medicina Veterinaria y producción agropecuaria. *Revista. Veterinaria*. 20(1): 61-71.
- Delgado-García, C. (2007). Nanotecnología: Avances y retos. *Ciencia y Desarrollo*, 33(206):19.2.

- Díaz-Torres, R., & Ramírez-Noguera, P. (2016). Evaluación de la citotoxicidad “in vitro” e “in vivo” de nanopartículas de polietilenoacrilato. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(1): 43 -54.
- Feneque, J. (2009). Brief introduction to the veterinary applications of nanotechnology. *Nanopaprika*.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Science Technology*, 15(7- 8): 330-347.
- Mahan, D.C., Cline, T.R., & Richart, B. (1999). Effects of dietary levels of yeast enriched with selenium and sodium selenite as selenium sources fed to growing pigs on yield, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, characteristics of the carcass and the quality of the loin. *Journal animal science*, 77(8): 2172-2179.
- McClements, D., & Lesmes, U. (2009). Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Science Technology*, 20(10): 448-57.
- Rajendran, D. (2013). Application of nano minerals in animal production system. *Research. Journal of Biotechnology*, 8(3): 1-3.
- Rivlin, J. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 70(2): p. 518-22.
- Romig, A., Baker, A., Justine, J., Zipperian, T., Eijkel, K., Kirchhoff, B., Mani, H.S., Rao, C.N., & Walsh, S. (2007). An introduction to nanotechnology policy: Opportunities and constraints for emerging and established economies. *In Techno Forecast Soc Change*, 74(9): 1634-1642
- Sahani, S., & Sharma, Y.C. (2021). Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. *Food Chemistry*, (342) p. 128318.
- Sureshbabu, A., Smirnova, E., Karthikeyan, A., Moniruzzaman, M., Kalaiselvi, S., Nam, K., Goff, G.L., & Min, T. (2023). The impact of curcumin on livestock and poultry animal's performance and

- management of insect pests. *Frontier Veterinary of Science*, 10:1048067. doi: 10.3389/fvets.2023.1048067.
- Tomalia, D.A. (2005). Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress Polymer Science*, 30 (3): 294-324.
- Wang, H., Zhang, J., & Yu, H. (2007). Elemental selenium at nanometric size has a lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10): 1524-1533.
- Wang, X.F., Zhang, S.L., Zhu, L.Y., Xie, S.Y., Dong, Z., & Wang, Y. (2012). Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *Veterinary Journal*, 191(2):115–20.

CAPÍTULO 10

Uso de las técnicas de reproducción asistida para el estudio de la mutación SLICK en el receptor de prolactina (PRLR) – una alternativa para reducir las consecuencias negativas del estrés calórico en ganado bovino

Froylan Sosa^{1,2}

Resumen

El aumento en la temperatura de manera gradual alrededor del mundo ha ocasionado varios estragos que pueden verse reflejados, no únicamente, en alteraciones climáticas y catástrofes naturales nunca vistas, sino también en alteraciones fisiológicas y celulares en diversos organismos. Estas alteraciones en la función celular de los organismos son consecuencias del estrés calórico ocasionado por el aumento en la temperatura global y la incapacidad del organismo para disipar el calor. Los organismos homeotérmicos, como el ganado bovino, utilizan diversas estrategias fisiológicas para perder calor, por ejemplo, conducción, convección, radiación y evaporación. Sin embargo, el gasto energético de los sistemas fisiológicos de enfriamiento que utiliza el organismo homeotérmico puede tener consecuencias negativas en su rendimiento productivo, reproductivo y homeostasis. En los sistemas de producción

¹ Department of Animal Sciences, D.H. Barron Reproductive and Perinatal Biology Research Program, and Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0910, USA.

² Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA.

E-mail: fsosa@kumc.edu; froylan_sosa@hotmail.com

lechera, por muchos años, se han utilizado sistemas de enfriamiento, tales como: ventiladores y aspersores de agua para mitigar las altas temperaturas en los establos lecheros durante el verano, que es el periodo cuando se presenta el estrés calórico. A pesar del uso de estos sistemas de enfriamiento, la producción lechera, reproducción y función inmune se ven sumamente comprometidas durante el estrés calórico, y esto es un indicador de que los sistemas de enfriamiento usados no funcionan de manera efectiva para mitigar los estragos del estrés calórico. Además, estos sistemas de enfriamiento utilizan energía eléctrica para su funcionamiento, contribuyendo así, a la generación de gases de efecto invernadero exacerbando las consecuencias negativas del estrés calórico, por lo que es necesario otras alternativas para mitigar los estragos del estrés calórico. Las soluciones genéticas para el estrés calórico, a través del desarrollo de una vaca que sea genéticamente resistente al estrés calórico, podrían complementar los sistemas de enfriamiento y posiblemente conducir a la reducción en su uso. La introducción de la mutación SLICK1 en receptor de prolactina (PRLR) en el genoma de vacas de alta producción es una estrategia potencial para evitar los efectos negativos del estrés calórico en la producción y la reproducción. Las vacas Holstein Slick son más capaces de regular la temperatura corporal durante el estrés calórico y muestran una menor reducción de la producción de leche durante las estaciones cálidas en comparación con las vacas Holstein no slick. La mutación SLICK en PRLR, que se caracteriza por resultar en un fenotipo de pelaje muy corto, probablemente sea una de tantas mutaciones que confieren una mejor termorregulación en los bovinos que portan esta mutación, por lo que es posible que otros genes con este mismo fenotipo (mejor termorregulación) aún no han sido descubiertos, y esto abre una gran oportunidad para futuras investigaciones de alto impacto en el mundo. Sin embargo, antes de introducir esta mutación en razas de ganado lechero, es importante asegurarse de que el gen no tenga efectos negativos que comprometan las funciones celulares y biológicas.

Palabras clave: estrés calórico, prolactina, mutación slick, receptor de prolactina, termorregulación

Introducción

En la actualidad, la industria lechera y de carne a nivel mundial enfrentan grandes desafíos que repercuten negativamente en la economía de países que, en parte, dependen de estas industrias, principalmente debido al cambio climático. Uno de los grandes desafíos que enfrenta el sector ganadero es el impacto negativo del estrés calórico. Se predice que el calentamiento global en un futuro cercano será todavía un mayor problema de lo que ya es hoy en la actualidad (Battisti and Naylor, 2009). En bovinos, el estrés calórico sucede cuando el organismo se expone a altas temperaturas ambientales, lo que conduce a que la temperatura corporal exceda la temperatura fisiológica de homeostasis, indispensable para mantener funciones vitales, resultando en la incapacidad del organismo para disipar calor hacia el medio ambiente que lo rodea causando disfunción y alteración celular. La magnitud de los efectos negativos del estrés calórico se traduce en reducción de la fertilidad (Flamenbaum and Galon, 2010; Guinn *et al.*, 2019; Guinn *et al.*, 2019) y de la producción láctea (Dikmen *et al.*, 2008; Menta *et al.*, 2022), compromete la función inmune (do Amaral *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2021), aumenta la incidencia de algunas enfermedades como cojeras y mastitis (Nienaber *et al.*, 2007) y afecta negativamente el crecimiento fetal (Bell *et al.*, 1989; Galan *et al.*, 1999) y de la descendencia (Monteiro *et al.*, 2016), por mencionar algunos ejemplos.

Los estragos negativos del estrés calórico, sin lugar a duda, tienen un impacto negativamente considerable sobre la economía de los países que dependen de este sector agropecuario. Para ilustrar lo anterior, en Estados Unidos de América, se ha estimado que el estrés calórico causa pérdidas anuales de más de \$1,300 millones de dólares americanos en establos lecheros (aún con el uso de tecnologías de enfriamiento de los corrales en donde se alojan a las vacas lecheras) (St. Pierre *et al.*, 2003). Una de las estrategias más comunes para mitigar el estrés calórico ha sido la modificación física del entorno en donde se encuentran las vacas, y esto se ha logrado mediante la provisión de sombras, el uso de ventiladores y aspersores de agua, entre otros (Armstrong, 1994; Renaudeau *et al.*, 2012). Sin embargo, estas estrategias

no han resultado ser la mejor solución frente a los estragos negativos del estrés calórico, y una prueba de esto está en el hecho de que la fertilidad y la producción de leche aún declinan durante la época de calor a pesar de usar las estrategias de enfriamiento anteriormente mencionadas (Dikmen *et al.*, 2014).

Un aspecto adicional para considerar es que estos sistemas de enfriamiento generan un costo sustancial adicional para las industrias lecheras. Por ejemplo, Ferreira *et al.* (2016) calculó que aproximadamente se requiere invertir \$4,500 dólares americanos para enfriar a una vaca productora de leche en los Estados Unidos de América. Lo anterior conduce a considerar otras alternativas para solucionar el problema del estrés calórico en ganado lechero altamente especializado o en ganado de tipo europeo, que originalmente fueron seleccionados para ser criados en lugares templados, pero que por diversas circunstancias como el deseo de adquirir algunos de sus rasgos genéticos relacionados con productividad se pretende adaptarlos a condiciones tropicales, en donde tal vez, su adaptación al nuevo ambiente sea muy lento y desfavorable para el ganado comprometiendo su productividad, fertilidad y bienestar animal.

El uso de la selección genética ha sido una herramienta muy determinante para discriminar animales que son tolerantes al calor y posiblemente seleccionar usando estos criterios genéticos para crear un hato que resista los efectos adversos del estrés calórico. La idea es buena y novedosa, sin embargo, existe un grave problema al llevar a cabo esta medida de selección. El problema radica en que los parámetros productivos están negativamente correlacionados con los genes que confieren termo-tolerancia (Sigdel *et al.*, 2019). Es decir, genes que confieren termo-tolerancia afectan negativamente, por ejemplo, la producción de leche, y seleccionar animales basados en estos criterios podría, sin lugar a duda, afectar la productividad de los animales.

Una alternativa muy prometedora sería identificar genes que confieren termo-tolerancia en algunas razas de ganado bovino e introducirlas en el genoma de razas de bovinos que son muy susceptibles al estrés calórico. Algunas razas de ganado bovino han adquirido la habilidad de termo-regularse debido a mutaciones genéticas producto de

la adaptación a nuevos climas, ecosistemas o ambientes. En otras palabras, podríamos hacer uso de esas mutaciones genéticas naturales que han sucedido por selección natural a lo largo de cientos de años en algunas razas de ganado para hacer que otras razas que evolucionaron en condiciones o climas menos adversos tengan la habilidad de termo-regular su temperatura corporal frente al estrés calórico. Se ha identificado que algunas razas de ganado bovino en la región del Caribe y algunas regiones del norte Sudamérica tienen mejor habilidad para regular la temperatura corporal y esto es principalmente debido a que presentan un pelaje muy corto comparado con otras razas o especímenes dentro de la misma raza (Flórez-Murillo *et al.*, 2020). A este fenotipo en particular se le conoce como fenotipo slick (Sosa *et al.*, 2022), y los animales que presentan este fenotipo tienen mejor habilidad para regular la temperatura corporal en época de calor (Olson *et al.*, 2003; Dikmen *et al.*, 2008; 2014; Sosa *et al.*, 2022). El fenotipo slick es causado por una mutación en el receptor de prolactina (PRLR) que introduce prematuramente un “stop codon” resultando en una versión truncada de la proteína PRLR (Littlejohn *et al.*, 2014). Antes de abordar el tema de esta mutación en PRLR es preciso discutir brevemente los efectos negativos del estrés calórico y las adaptaciones fisiológicas que los organismos homeotérmicos, como los bovinos, utilizan para sobrevivir a estas condiciones adversas.

Adaptaciones biológicas contra el estrés celular en bovinos causado por el estrés calórico

El bovino es un organismo homeotérmico, es decir, tiene la habilidad de experimentar adaptaciones fisiológicas y celulares que le permitan sobrevivir a los estragos negativos del estrés calórico. Uno de los principales procesos de adaptación fisiológica que emplean los bovinos durante el estrés calórico es la disminución en la ingesta de alimento con la finalidad de reducir la producción de calor metabólico (Knapp y Grummer, 1991; Rhoads *et al.*, 2013). Es importante aclarar que esta reducción en la ingesta de alimento podría ser un efecto secundario producto de un efecto primario a nivel del hipotálamo. Por ejemplo, en aves, el estrés calórico tiene efectos a nivel del hipotálamo provo-

cando una disminución en la expresión del neuropéptido Y afectando negativamente el consumo de alimento (He et al., 2019).

Otros mecanismos de adaptación fisiológica al estrés calórico incluyen el incremento en la tasa de sudoración, de jadeo o respiración (Kadzere et al., 2002; Collier et al., 2019). Los organismos continuamente están en constante evolución y frente a las condiciones ambientales hostiles los organismos experimentan mutaciones genéticas que les permitan adaptarse a las nuevas condiciones para sobrevivir. Los bovinos no son la excepción, y también pueden experimentar adaptaciones genéticas que les permitan reducir el impacto negativo del estrés calórico. En otras palabras, con el paso del tiempo y producto de las nuevas condiciones ambientales en las que los bovinos se han desarrollado han surgido genes que les confiere mejor habilidad para regular la temperatura corporal. Un ejemplo, de las tantas mutaciones que pudieran existir y que confiere a los bovinos superior habilidad para regular la temperatura corporal, es la mutación en el receptor de prolactina, mejor conocido como la mutación SLICK en PRLR (Littlejohn et al., 2014; Porto-Neto et al., 2018). Los nuevos desafíos de la actualidad, en donde es urgente optimizar el uso de los recursos naturales, es necesario optar por nuevas estrategias para reducir los estragos del estrés calórico sobre la producción animal, reproducción y salud. El uso de estrategias genéticas evita el uso de recursos naturales para mitigar los efectos del estrés calórico, por lo tanto, implementar estas nuevas alternativas en la industria ganadera ayudaría a reducir los efectos perjudiciales del estrés calórico sin afectar el uso de recursos naturales como el agua y disminuir el uso de electricidad.

La magnitud del efecto negativo del estrés calórico puede reflejarse en perturbaciones de diversas funciones biológicas que pueden ser resultado de alteraciones en aspectos fisiológicos o efectos directos a nivel celular y molecular del organismo. El estrés calórico impacta negativamente en diversos aspectos relacionados con fisiología de la reproducción. Estudios en ganado lechero han demostrado que la estacionalidad (época fría vs época de calor) afecta la fertilidad en los hatos lecheros (Flamenbaum y Galon, 2010; Nabenishi et al., 2011; Guinn et al., 2019). Durante el invierno, las tasas de gestaciones son

más altas comparado con las tasas de gestaciones durante el verano. Esta reducción en la fertilidad debido a la estacionalidad es causada por el estrés calórico. Experimentalmente, se ha demostrado que eliminar los sistemas de enfriamiento durante el verano afecta negativamente la tasa de gestación o supervivencia embrionaria en ganado lechero (Putney et al., 1988; Ealy et al., 1993; Ealy et al., 1994). Además, exponer vacas lactantes a estrés calórico no solo reduce el desarrollo embrionario al día 7 sino también compromete la foliculogénesis, supervivencia embrionaria y crecimiento fetal (Bell et al., 1989; Roth et al., 2000; Wolfenson y Roth, 2018).

Los estragos negativos del estrés calórico en reproducción bovina son, probablemente, uno de los temas más investigados debido a su gran impacto económico. Se ha reportado que tan solo un incremento de 0.5° C en la temperatura uterina disminuye la tasa de concepción en un rango de 6.9 a 12.8% (Gwazdauskas et al., 1973). Adicionalmente, la temperatura fetal se determina, principalmente, por la temperatura materna (Schröder y Power, 1997), esto directamente sugiere que la gestación puede estar comprometida o puede perderse (aborto) en vacas que experimentan estrés calórico. Otros aspectos relacionados con la productividad de la vaca tales como producción láctea, trastornos de salud incluyendo cojeras y mastitis también se ven afectados bajo condiciones de estrés calórico. Las adaptaciones celulares también permiten a los organismos adaptarse a las condiciones adversas del estrés calórico y mitigar los efectos negativos del estrés celular provocado por la elevación en la temperatura. Estas adaptaciones celulares podrían ser, tal vez, reguladas por un gen o grupo de genes que pueden expresarse para conferir protección celular contra la temperatura corporal elevada. Como un ejemplo de lo anteriormente citado es la mutación por delección en la región promotora del gen conocida como *HSPA1L* (heat shock protein 70). Esta mutación se caracteriza por un incremento de la respuesta transcripcional de *HSPA1L* al choque térmico o estrés calórico resultando en mayor supervivencia celular (Sakatani et al., 2012). Este gen, en otras palabras, codifica por proteínas que funcionan chaperonas que tienen la función de reparación celular bajo condiciones de estrés celular.

Otro gen que podría estar involucrado en adaptaciones celulares contra el estrés calórico es el gen *HELB*. Un estudio reciente que comparó la divergencia genética entre ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* reportó la existencia de una variación genética de 430-kb pares de bases nitrogenadas en el cromosoma 5 abarcando 5 genes. Uno de estos genes fue el gen *HELB*, que mostró 8 de 9 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) cercano a regiones de codificación y promotoras en razas índicas, aunque también fueron encontradas en razas taurinas, principalmente, razas que han sido sujetos a introgresión de razas índicas (Naval-Sánchez et al., 2020).

La particularidad del gen *HELB* es que está involucrado en reparación del ADN causado por la exposición de luz ultravioleta y se asocia con buenos parámetros reproductivos en ganado de regiones tropicales (Naval-Sánchez et al., 2020). El hecho de que este gen sea casi exclusivo de razas índicas sugiere hipotetizar que este gen podría tener un rol importante en la protección celular contra el estrés calórico en ganado.

La información que se tiene a la fecha sobre el gen *HELB* es limitado y se reduce a estudios basados en asociación por lo que se requiere más investigación en este nuevo tema. En general, más investigación que aborde el descubrimiento de genes que confieran a los bovinos mejor habilidad para mitigar los efectos negativos del estrés calórico son fundamentalmente requeridos para crear un mejor criterio de selección genética de ganado basado en tolerancia al estrés calórico, pero sin comprometer la productividad. Sin embargo, una de las limitantes para el descubrimiento de genes que confieran mejor termorregulación es, en parte, la poca cantidad de estudios que se realizan para descubrir nuevos genes, y la otra, porque las variaciones genéticas que conllevan a adaptaciones fisiológicas o celulares para mitigar los efectos negativos del estrés calórico sean producto de la expresión en conjunta de un grupo de genes o de un grupo mucho más grande de genes en la que cada gen es responsable de una pequeña proporción en su papel de conferir termo-regulación.

Además, genes que pudieran conferir mejor habilidad para tolerar el estrés calórico podrían estar asociados con efectos negativos en reproducción y producción de los bovinos. Por lo tanto, es crucial explorar nuevas y más seguras alternativas genéticas para mitigar los efectos negativos del estrés calórico.

Estrategias para la reducción del estrés calórico en bovinos

El estrés calórico en bovinos puede considerarse como una cuestión de carácter de bienestar animal. A lo largo de los años, se han implementado varios métodos para mitigar los efectos negativos del estrés calórico sobre la fisiología de la reproducción y rendimiento productivo, sobre todo en ganado lechero especializado. El intento más común ha sido la modificación física del entorno en la que se encuentra alojado el ganado. Uno de estos métodos, probablemente el más común y económico, es el uso de sombra. El principal objetivo del sistema de sombra es reducir la alta temperatura causada por radiación solar y la temperatura ambiental en el entorno que rodea al organismo. Sin embargo, este sistema no ha resultado ser eficiente para reducir los efectos negativos del estrés calórico, ya que el sistema de provisión de sombras no cambia la temperatura del aire ni la humedad relativa en el ambiente que rodea a la vaca (West, 2003; Renaudeau *et al.*, 2012).

Por otra parte, el sistema de enfriamiento usando aspersores de agua y ventiladores ha sido uno de los métodos más populares en el sector lechero para combatir los estragos del estrés calórico sobre los aspectos productivos y reproductivos, además de brindar confort a las vacas. Este último sistema ha resultado eficiente para reducir la temperatura corporal de las vacas de 0.3 a 0.7°C en las horas del día de más intensidad de calor, favoreciendo de manera positiva la producción láctea en meses de estrés calórico (Chen *et al.*, 2016). Aunque estos sistemas de enfriamiento para ganado han resultado benéficos, principalmente para ganado lechero en épocas de calor, presentan un serio problema, el uso de grandes cantidades de agua para operar estos sistemas, por lo tanto, es urgente encontrar otras alternativas para mitigar los efectos del estrés calórico.

La mutación *SLICK1* en el receptor de prolactina (PRLR) como una alternativa sustentable frente a los estragos negativos del estrés calórico en ganado bovino

¿Qué es la mutación *SLICK*?

La mutación *SLICK* es una mutación en el PRLR que hace que los animales tengan un pelaje muy corto, a esta característica del pelaje se le conoce como el fenotipo slick. Este fenotipo está presente en animales que son heterocigotos u homocigotos para la mutación *SLICK* (Olson et al., 2003; Sosa et al., 2022). En un estudio reciente de Sosa et al. (2022) se reportó que los animales heterocigotos y homocigotos para la mutación *SLICK* son fenotípicamente similares porque la regulación de la temperatura corporal (temperatura ruminal y rectal) fue similar entre ambos genotipos (Sosa et al., 2022), ver figura 1.

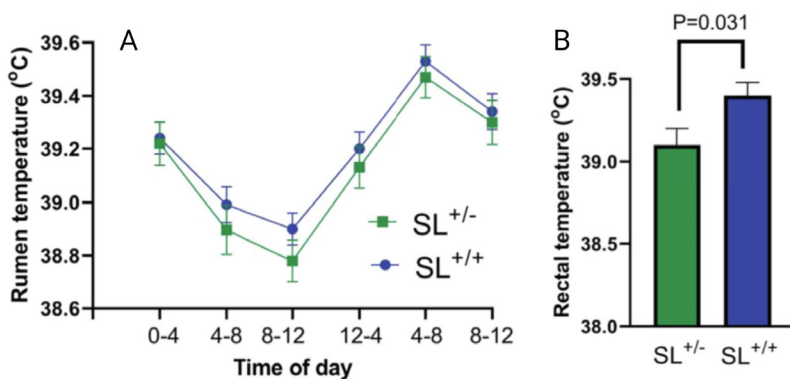


Figura 1. Regulación de temperatura corporal entre animales slick heterocigotos (*SL +/-*) y homocigotos (*SL +/+*). El panel A representa la temperatura ruminal y el panel B representa la temperatura rectal entre ambos genotipos. La figura se reproduce de Sosa et al. 2022. Effects of the *SLICK1* mutation in PRLR on regulation of core body temperature and global gene expression in liver in cattle. Animal 2022;16:100523. Reproducido bajo el número de licencia 5315000420679.

La mutación SLICK es una mutación “nonsense” o sin sentido del PRLR que ocurre en el exón 11 del cromosoma 20 y se caracteriza por la introducción prematura de un “stop codon” lo que resultan en una versión trunca de la proteína PRLR (Littlejohn *et al.*, 2014; Porto-Neto *et al.*, 2018), ver figura 2. La mutación SLICK fue observada y caracterizada fenotípicamente por Olson *et al.* (2003), en ganado Senepol y Carona, razas de ganado bovino con influencia criollo de la región del Caribe.

Posteriormente Littlejohn *et al.* (2014) reportó que el fenotipo slick era resultado de una mutación en el PRLR caracterizado la pérdida parcial del dominio C-terminal resultando en una versión trunca de la proteína PRLR, ver figura 2. Estudios subsecuentes reportaron hasta seis mutaciones SLICK en el mismo gen de PRLR (Flórez Murillo *et al.*, 2021) enumeradas del 1 al 6, todas estas mutaciones resultan en el fenotipo slick. La mutación SLICK1 se encuentra en razas tales como Senepol, Romosinuano, Carora, Blanco Orejinegro, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle. La mutación SLICK2 se encuentra en razas como Limonero, Carora, Caracu Caldeano, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle y Romosinuano. La mutación SLICK 3 la poseen algunas razas como Limonero y Criollo Lechero Tropical. La mutación SLICK4 la posee la raza Criollo Lechero Tropical. La mutación SLICK5 se ha identificado en razas bovinas como Blanco Orejinegro, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y Carora. Y, por último, la mutación SLICK6 se encuentra en razas tales como Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y Carora. Es importante resaltar que algunas razas poseen más de una mutación SLICK en el PRLR. Esto sugiere que la mutación SLICK podría ser una de tantas mutaciones que podrían conferir mejor habilidad a los bovinos para regular la temperatura corporal en condiciones de estrés calórico.

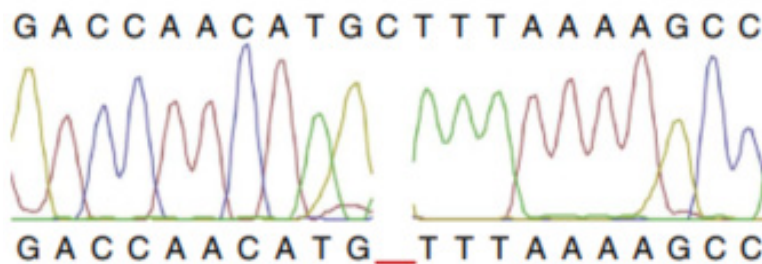


Figura 2. Representación gráfica de la mutación SLICK1 en el gen PRLR. El panel superior representa la secuencia genética en donde ocurre la mutación y el panel inferior muestra gráficamente la introducción del “stop codon” resultando en una versión corta de la proteína PRLR. La figura se reproduce de Littlejohn et al. 2014. Functionally reciprocal mutations of the prolactin signaling pathway define hairy and slick cattle. Nat Commun 2014;5:5861. Reproducido bajo licencia de acceso abierto (CC BY 4.0).

Uso de la mutación SLICK para reducir los efectos negativos del estrés calórico – estudios previos

La mutación SLICK ha resultado ser una opción prometedora como una alternativa para reducir los efectos negativos del estrés calórico en ganado bovino. Para citar un ejemplo, en un estudio de Olson et al. (2003) los animales con fenotipo slick mostraron mejor habilidad para regular la temperatura corporal comparado con animales de pelaje normal o no slick. Estudios posteriores por Dikmen et al. (2008, 2014) y Sosa et al. (2022), quienes estudiaron la mutación SLICK1, reportaron resultados similares en vacas lecheras y vaquillas Holstein, en donde los animales slick regularon mejor la temperatura vaginal y ruminal, respectivamente. Los efectos de la mutación SLICK también pueden observarse en parámetros productivos, por ejemplo, en la producción de leche. Los animales slick producen más leche en épocas de calor comparado con los animales que no son slick (Olson et al., 2003; Dikmen et al., 2014). Sin embargo, el tamaño de muestra usado en esos estudios no es grande por lo que es necesario realizar más investiga-

ción sobre el efecto de la mutación SLICK sobre la producción láctea usando un tamaño de muestra grande.

Uso de las técnicas de reproducción asistida para incrementar el número de animales slick para fines de aplicación en campo e investigación

Uno de los beneficios de la mutación SLICK es que los animales tienen una habilidad superior para regular la temperatura corporal en épocas de calor. Esta habilidad es principalmente debido al pelaje muy corto que presentan los animales slick. Sin embargo, toda mutación también conlleva efectos secundarios en otras funciones biológicas. Una de las incógnitas importantes es si la mutación SLICK tiene otras consecuencias en funciones biológicas que podrían resultar benéficas o dañinas para los animales. La investigación sobre los efectos secundarios de la mutación SLICK son pocas y, además, no se cuenta con una población grande de animales para hacer investigación. La investigación es crucial porque esto determinará si existen efectos secundarios que podrían comprometer otras funciones biológicas en el organismo de los animales o si no existen consecuencias negativas de la mutación SLICK. Si los resultados indican que la mutación SLICK no presenta efectos secundarios dañinos, el siguiente paso sería diseminar la mutación SLICK en razas bovinas que son muy susceptibles al estrés calórico.

Las técnicas de reproducción asistida proporcionan las herramientas necesarias para poder hacer investigación y responder a preguntas biológicas importantes sobre la mutación SLICK. A la fecha, se han reportado dos estudios que han examinado el efecto de la mutación SLICK en reproducción. En un estudio realizado en Puerto Rico por Ortiz-Colón *et al.* (2018) se reportó que los animales slick fueron más fértiles que los animales no slick. En otro estudio por Sosa *et al.* (2021) se reportó que la mutación SLICK no afecta la supervivencia embrionaria o fetal. En ese estudio la frecuencia observada del alelo SLICK fue similar a la frecuencia esperada del alelo.

En la figura 3 se muestra el diseño experimental del estudio realizado por Sosa *et al.* (2021), en donde es posible apreciar técnicas convencionales de reproducción como la monta natural y la inseminación artificial (panel A). Estas técnicas convencionales, a pesar de que se han usado con éxito durante los años, la desventaja que presentan es que lleva mucho tiempo producir el número de animales necesario para tener un tamaño de muestra grande para fines de investigación. En el panel B se muestra una alternativa más eficaz, en donde se puede hacer el uso de técnicas de reproducción asistida más sofisticadas como la aspiración folicular guiada por ultrasonido o OPU (por sus siglas en inglés) de vacas que puede ser o no slick en combinación con la producción *in vitro* de embriones usando semen de toros slick para producir un mayor número de embriones para ser transferidos a vacas receptoras y, de este modo, producir de manera acelerada animales slick y no slick para fines de investigación.

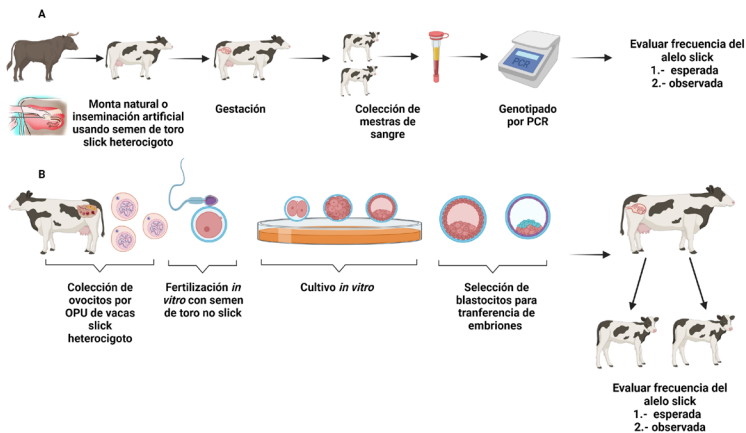


Figura 3. Diseño experimental para evaluar la frecuencia de heredabilidad de la mutación SLICK1 en PRLR. El panel A representa el uso de técnicas de reproducción convencionales como la monta natural e inseminación artificial usando semen de un toro slick para producir crías slick o no slick. El panel B representa el uso de técnicas más sofisticadas de reproducción asistida para producir crías slick y no slick. Por ejemplo, los ovocitos pueden ser aspirados por OPU de vacas slick y fertilizados con semen de toro no slick.

Otra alternativa para acelerar la producción de animales slick para fines de investigación (aunque también puede ser fines de investiga-

ción aplicada) es el uso de técnicas más modernas como el knock out de genes de interés. Usando esta técnica no es necesario usar vacas o toros slick. Con esta técnica es posible colectar ovocitos no slick ya sea por OPU o por aspiración de ovarios de rastro, y fertilizarlos con semen de toros no slick. En la etapa embrionaria de cigoto se realiza microinyección para depositar en el citoplasma del cigoto el “small guide RNA” (sgRNA) que tiene como principal objetivo identificar el gen a alterar, en este caso es el gen *PRLR*, y se deposita también Cas9 mRNA, la enzima que cortará la secuencia que codifica para la proteína *PRLR*. De esta manera se produce el knock out del gen *PRLR*, los embriones se transfieren al día 7 a vacas receptoras y se esperaría que una parte de la descendencia fuera slick y otra parte no slick, es decir, animales editados genéticamente, ver figura 4.

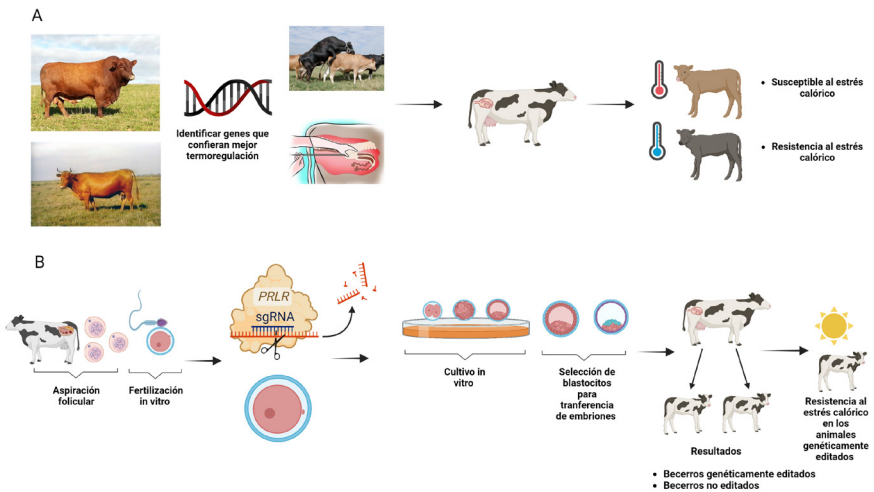


Figura 4. Modelo para generar animales slick para investigación. Se propone identificar genes que confieran termo-tolerancia en algunas razas de ganado bovino (heterocigotos en su mayoría) y hacer introgresión usando inseminación o monta natural para establecer gestaciones. Se esperaría que un porcentaje de terneros sean slick y otro porcentaje de pelaje normal (A). Alternativamente, el uso de CRISPR-CAS9 aceleraría la generación de crías slick para fines de investigación básica y posteriormente para investigación aplicada.

Conclusiones

La mutación SLICK en el PRLR es una alternativa muy prometedora para mitigar los estragos negativos del estrés calórico durante el verano en bovinos productores de leche o bovinos que se encuentran en condiciones tropicales. Algunas razas de ganado como el Brahman también son muy resistentes al calor, sin embargo, esta raza no presenta la mutación SLICK en el PRLR. Lo anterior sugiera que la habilidad que tiene la raza Brahman para resistir a condiciones ambientales extremas es probablemente debido a la acción de otros genes que pudieran conferir superior habilidad para termo-regularse. Por lo tanto, es necesario continuar con investigación para descubrir nuevos genes que podrían conferir mejor termo-regulación e introducirlos en el genoma de razas de ganado susceptibles al estrés calórico.

Referencias bibliográficas

- Ahmed, B.M.S., Younas, U., Asar, T.O., Monteiro, A.P.A., Hayen, M.J., Tao, S., & Dahl, G.E. (2021). Maternal heat stress reduces body and organ growth in calves: Relationship to immune status. *J. D. S. Communication*, 2(5): 295-299.
- Armstrong, D.V. (1994). Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci*, 77(7): 2044–2050.
- Battisti, D.S., & Naylor, R.L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911): 240-244.
- Bell, A.W., McBride, B.W., Slepatis, R., Early, R.J., & Currie, W.B. (1989). Chronic heat stress and prenatal development in sheep: I. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. *Journal Animal Science*, 67(12): 3289-3299.
- Chen, J.M., Schütz, K.E., & Tucker, C.B. (2016). Cooling cows efficiently with water spray: Behavioral, physiological, and production responses to sprinklers at the feed bunk. *Journal Dairy Science*, 99(6): 4607-4618.

- Collier, R.J., Baumgard, L.H., Zimbelman, R.B., & Xiao, Y. (2019). Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontier*, 9(1): 12-19.
- Dikmen, S., Alava, E., Pontes, E., Fear, J.M., Dikmen, B.Y., Olson, T.A., & Hansen, P.J. (2008). Differences in thermoregulatory ability between slick-haired and wild-type lactating Holstein cows in response to acute heat stress. *Journal Dairy Science*, 91(9): 3395–3402.
- Dikmen, S., Khan, F.A., Huson, H.J., Sonstegard, T.S., Moss, J.I., Dahl, G.E., & Hansen, P.J. (2014). The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. *Journal Dairy Science*, 97(9): 5508–5520.
- do Amaral, B.C., Connor, E.E., Tao, S., Hayen, J., Bubolz, J., & Dahl, G.E. (2010). Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(1): 38-45.
- Ealy, A.D., Aréchiga, C.F., Bray, D.R., Risco, C.A., & Hansen, P.J. (1994). Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. *Journal Dairy Science*, 77(12): 3601-3607.
- Ealy, A.D., Drost, M., & Hansen, P.J. (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal Dairy Science*, 76(10): 2899-2905.
- Ferreira, F.C., Gennari, R.S., Dahl, G.E., & De Vries A. (2016). Economic feasibility of cooling dry cows across the United States. *Journal Dairy Science*, 99(12): 9931-9941.
- Flamenbaum, I., & Galon, N. (2010). Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. *Journal Reproduction Development*, 56(6): S36-S41.
- Flórez-Murillo, J. M., Landaeta-Hernández, A.J., Kim, E.S., Bostrom, J.R., Larson, S.A., Pérez O'Brien, A.M., Montero-Urdaneta, M.A., Garcia, J.F., & Sonstegard, T.S. (2021). Three novel nonsense mutations of

- prolactin receptor found in heat-tolerant *Bos taurus* breeds of the Caribbean Basin. *Animal Genetics*, 52(1), 132-134.
- Galan, H.L., Hussey, M.J., Barbera, A., Ferrazzi, E., Chung, M., Hobbins, J.C., & Battaglia, F.C. (1999). Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. *American Journal Obstetrics Gynecology*, 180(5): 1278-1282.
- Guinn, J.M., Nolan, D.T., Krawczel, P.D., Petersson-Wolfe, C.S., Pighetti, G.M., Stone, A.E., Ward, S.H., Bewley, J.M., & Costa, J.H.C. (2019). Comparing dairy farm milk yield and components, somatic cell score, and reproductive performance among United States regions using summer to winter ratios. *Journal Dairy Science*, 102(12): 11777-11785.
- Gwazdauskas, F.C., Thatcher, W.W., & Wilcox, C.J. (1973). Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *Journal Dairy Science*, 56(7): 873-877.
- He, X., Lu, Z., Ma, B., Zhang, L., Li, J., Jiang, Y., Zhou, G., & Gao, F. (2019). Chronic heat stress alters hypothalamus integrity, the serum indexes and attenuates expressions of hypothalamic appetite genes in broilers. *Journal Thermal Biology*, 81: 110-117.
- Kadzere, C.T., Murphy, M.R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock. Production Science*, Volume 77(1): 59-91.
- Knapp, D.M., & Grummer, R.R. (1991). Response of lactating dairy cows to fat supplementation during heat stress. *Journal Dairy Science*, 74(8): 2573-2579.
- Littlejohn, M.D., Henty, K.M., Tiplady, K., Johnson, T., Harland, C., Lopdell, T., Sherlock, R.G., Li, W., Lukefahr, S.D., Shanks, B.C., Garrick, D.J., Snell, R.G., Spelman, R.J., & Davis, S.R. (2014). Functionally reciprocal mutations of the prolactin signalling pathway define hairy and slick cattle. *Natural Communication*, 5: 5861.
- Menta P.R., Machado, V.S., Piñeiro, J.M., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., Vieira-Neto, A. 2022. Heat stress during the transition period is

- associated with impaired production, reproduction, and survival in dairy cows. *J Dairy Sci*, 105(5): 4474-4489.
- Monteiro, A.P.A., Tao, S., Thompson, I.M.T., & Dahl., G.E. (2016). In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *Journal Dairy Science*, 99(10): 8443-8450.
- Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., & Tsuzuki, T. (2011). Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *Journal Reproduction and Development*, 57(4): 450-456.
- Naval-Sánchez, M., Porto-Neto, L.R., Cardoso, D.F., Hayes, B.J., Dae-tywyler, H.D., Kijas, J., & Reverter, A. (2020). Selection signatures in tropical cattle are enriched for promoter and coding regions and reveal missense mutations in the damage response gene HELB. *Genetics, Selection and Evolution*, 52(1):27.
- Nienaber, J.A., & Hahn, G.L. (2007). Livestock production system management responses to thermal challenges. *International Journal Biometeorology*, 52(2): 149–157.
- Olson T.A., Lucena, C., Jr Chase, C.C., & Hammond, A.C. (2003). Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. *Journal Animal Science*, 81(1): 80–90.
- Ortiz-Colón, G., Fain, S.J., Parés, I.K., Curbelo-Rodríguez, J., Jiménez-Cabán, E., Pagán-Morales, M., & Gould, W.A. (2018). Assessing climate vulnerabilities and adaptive strategies for resilient beef and dairy operations in the tropics. *Climatic Change*, 146: 47–58.
- Porto-Neto, L.R., Bickhart, D.M., Landaeta-Hernandez, A.J., Utsunomiya, Y.T., Pagan, M., Jimenez, E., Hansen, P.J., Dikmen, S., Schroeder, S.G., Kim, E.S., Sun, J., Crespo, E., Amati, N., Cole, J.B., Null, D.J., Garcia, J.F., Reverter, A., Barendse, W., & Sonstegard, T.S. (2018). Convergent evolution of slick coat in cattle through truncation mutations in the prolactin receptor. *Frontier Genetics*, 9:57.

- Putney, D.J., Drost, M., & Thatcher, W.W. (1988). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, 30(2): 195-209.
- Renaudeau D, Collin, A., Yahav, S., de Basilio, V., Gourdine, J.L., & Collier, R.J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animals* 6(5): 707-728.
- Rhoads, R.P., Baumgard, L.H., Suagee, J.K., & Sanders, S.R. (2013). Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress. *Advances Nutrition*, 4(3): 267-276.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2000). Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal Reproduction and Fertility*, 120(1): 83-90.
- Sakatani, M., Alvarez, N.V., Takahashi, M., & Hansen, P.J. (2012). Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *Journal Dairy Science*, 95(6): 3080-3091.
- Schröder, H.J., & Power, G.G. (1997). Engine and radiator: fetal and placental interactions for heat dissipation. *Experimental Physiology*, 82(2): 403-414.
- Sigdel, A, Abdollahi-Arpanahi, R., Aguilar, I., & Peñagaricano, F. (2019). Whole Genome Mapping Reveals Novel Genes and Pathways Involved in Milk Production Under Heat Stress in US Holstein Cows. *Frontier Genetics*, 10:928.
- Sosa, F., Carmickle, A.T., Jiménez-Cabán, E., Ortega, M.S., Dikmen, S., Negrón-Pérez, V., Jannaman, E.A., Baktula, A., Rincon, G., Larson, C.C., Pagán-Morales, M., Denicol, A.C., Sonstegard, T.S., & Hansen, P.J. (2021). Inheritance of the SLICK1 allele of PRLR in cattle. *Animals Genetics*, 52(6): 887-890.
- Sosa, F., Santos, J.E.P., Rae, D.O., Larson, C.C., Macchietto, M., Abrahante, J.E., Amaral, T.F., Denicol, A.C., Sonstegard, T.S., & Hansen, P.J.

- (2022). Effects of the SLICK1 mutation in PRLR on regulation of core body temperature and global gene expression in liver in cattle. *Animals*, 16(5): 100523.
- St-Pierre, N.R., Cobanov, B., & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal Dairy Science*. 86: E52–E77.
- West, J.W., Mullinix, B.G., & Bernard, J.K. (2003). Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, 86(1): 232-242.
- Wolfenson, D., & Roth, Z. (2018). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animals Frontier*, 9(1): 32-38.

CAPÍTULO 11

Investigación sobre la producción de embriones bovinos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana

Rodolfo Canseco Sedano, Oscar E. Zárate Guevara, Itziar E. Lepe Anasagasti, Juan M. Pinos Rodríguez, Violeta T. Pardío Sedas, Anabel Cruz Romero, Alejandro Romero Mercado, Gustavo Contreras Hernández, Vicente E. Vega Murillo y Belisario Domínguez Mancera

Resumen

El presente documento resume tres de los más recientes trabajos de investigación realizados por el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. El primer estudio comparó dos métodos de criopreservación de tejido testicular bovino sobre la viabilidad espermática. Los testículos se obtuvieron del rastro local. Se extrajo aproximadamente 3 g de tejido testicular. El tejido se dividió en tres partes, una parte fue tejido control, otra parte se criopreservó por curva lenta y la tercera parte fue criopreservada por vitrificación. Los túbulos seminíferos (TS) fueron cortados y el contenido extraído. Se tomó 50 µl del contenido de TS y se colocó en un plato de Petri en un microscopio invertido a 20X para localizar los espermatozoides y someterlos a tres pruebas de viabilidad: Hyposmotic swelling (HOS), pentoxifilina y el toque mecánico. Las tres pruebas resultaron igualmente efectivas para detectar viabilidad espermática en tejido fresco o después de haber sido criopreservado. En este estudio, la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana
Email: rcanseco@uv.mx

congelación lenta fue más eficiente que la vitrificación para criopreservar tejido testicular de bovinos adultos. El siguiente experimento determinó la diferencia en la tasa de fecundación y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados *in vitro* frescos o vitrificados, al ser fertilizados por espermatozoides descongelados o por inyección intracitoplasmática de espermatozoides congelados o provenientes de tejido testicular fresco o descongelado. El tejido testicular se procesó igual que en el experimento anterior. En bovinos, es necesario causar la desestabilización de la membrana espermática, de lo contrario no se logra disolver y no puede haber descondensación del núcleo, por lo cual se compararon tres desestabilizadores de membrana espermática que fueron Gluthatione (GSH)-Heparine (Hep), Lysolecithine (LL) y Triton X-100 (TX-100). En este trabajo se demostró que los espermatozoides bovinos provenientes de tejido testicular fresco o descongelado, tienen la capacidad de fecundar un ovocito por ICSI y promover el desarrollo hasta el estadio de blastocisto (6 a 14% de desarrollo a blastocisto). En este experimento, Tx-100 y LL fueron mejores agentes desestabilizadores que Hep-GSH. Debido al bajo número de presuntos cigotos que alcanzan a formar blastocistos, es necesario explorar alternativas para hacer más eficiente este proceso. El siguiente experimento fue “Tasa de gestación y pérdida gestacional temprana en vacas transferidas con embriones y hemiembriones producidos *in vitro*”. Se bipartieron blastocistos bovinos producidos *in vitro* y se transfirieron embriones y hemiembriones. No se encontró diferencia en tasas de gestación entre ambos grupos comprobando que la aplicación en conjunto de las técnicas de bipartición y vitrificación a embriones bovinos producidos *in vitro* no mejora la tasa de preñez en comparación con los embriones enteros vitrificados. Como conclusión general, en conjunto, estos estudios van dirigidos hacia incrementar la eficiencia de los programas de producción y transferencia de embriones producidos *in vitro*. La formación de blastocistos a partir de ICSI con espermatozoides testiculares y la producción de gestaciones con embriones de FIV bipartidos, vitrificados y calentados, son resultados promisorios para la creación de bancos de germoplasma de especies o razas en peligro de extinción.

Palabras clave: embriones, criopreservación, ICSI, bipartición.

Introducción

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana se ha caracterizado en los últimos años por el incremento en trabajos de investigación en diferentes áreas. El objetivo del presente capítulo es describir trabajos de investigación que se han realizado en el área de la reproducción bovina. Estos trabajos han sido producto de tesis de posgrado de varios estudiantes.

El primer trabajo que vamos a describir se intituló “Comparación de dos métodos de criopreservación de tejido testicular bovino (Lepe, 2019).”

La criopreservación de tejido germinativo, se ha utilizado como una forma de preservar la fertilidad en diferentes especies. Es común criopreservar células germinales y embriones, sin embargo, la criopreservación de tejido ovárico o testicular, se considera aún en fase experimental en la mayoría de las especies. En bovinos existen pocos estudios con la criopreservación de células espermatogénicas (Barbosa *et al.*, 2011).

La pérdida de células madre que dan lugar a espermatogonias debido a distintos tratamientos, enfermedades o edad pueden causar infertilidad permanente. Por lo tanto, la criopreservación del tejido testicular para preservar células espermáticas, podría ser una opción para ganado doméstico como los bovinos (Sadri-Ardekani *et al.*, 2016).

Comprender y aplicar adecuadamente la criopreservación de tejido es fundamental en laboratorios y bancos de células. Sin embargo, aunque se han implementado protocolos para criopreservación, aún no se tienen los ideales en la mayoría de los casos (Ávila *et al.*, 2006).

En bovinos en el trópico de México, se encuentran toros que, aunque no han sido probados genéticamente de una manera organizada, se conoce su descendencia, la cual es muy valiosa al ser comparada con la descendencia de otros toros. Muchos de estos toros producen semen de calidad suficiente para lograr gestar a las vacas, pero no con la calidad suficiente como para ser congelado.

La criopreservación tiene como objetivo principal el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajo cero, generalmente, entre -80 y -196°C, lo que permite disminuir las funciones de las células y mantenerlas en condiciones de vida suspendida de manera indefinida (Mazur, 2012). Esta técnica se ha convertido en una herramienta esencial para la reproducción en bovinos, por permitir la conservación de semen, que conlleva al mejoramiento genético de los hatos ganaderos (Hidalgo, et al., 2004; Jang et al., 2017).

En la actualidad, los procesos de criopreservación se realizan mediante la técnica de congelamiento lento y vitrificación, esta última implica la solidificación del medio acuoso en una fase vítrea no cristalina (Jang et al., 2017). Para la crioconservación se utiliza agentes protectores en las células y tejidos antes de iniciar el proceso de enfriamiento, posteriormente las células son sometidas a temperaturas bajas y su almacenamiento principalmente en nitrógeno líquido (Elliott et al., 2017).

Existen publicaciones que han informado que la congelación lenta es una estrategia de crioconservación exitosa para el tejido testicular de diferentes especies animales. (Honrarooz et al., 2002); el método de curva lenta utiliza equipos programables, que congelan las células a temperatura y tiempo determinados (Saragusty y Arav, 2011).

En la última década, los avances en fertilización *in vitro* en bovinos permiten fertilizar muchos óvulos con cantidades muy pequeñas de espermatozoides.

Se ha comprobado que existen individuos, por ejemplo vasectomizados o con azoospermia en los cuales, los espermatozoides testiculares tendrían mayor capacidad fecundante que los que se encuentran en el eyaculado. Por lo tanto, es importante el desarrollar sistemas para criopreservar tejido testicular. Al lograr esto, es posible que a través de la fertilización *in vitro*, se pueda obtener descendencia de estos animales.

El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de dos métodos de criopreservación de tejido testicular bovino sobre la viabilidad

espermática. Los testículos se obtuvieron del rastro local y se mantuvieron en solución salina fisiológica (SSF) a 37°C para su transporte al laboratorio. Se lavó cada testículo con SSF y se hizo una disección de la región media del testículo para extraer aproximadamente 3 g de tejido testicular. El tejido extraído se dividió en tres partes (1 g c/u aproximadamente), una parte sirvió de tejido control, otra parte fue preparada para ser criopreservada por curva lenta y la tercera parte fue criopreservada por vitrificación. Los túbulos seminíferos (TS) fueron finamente cortados y el contenido fue extraído (Fleming, 2009). Se tomaron 50 µl del contenido de los TS y se colocaron en un plato de Petri. El plato de Petri con las gotas conteniendo la suspensión de contenido de los TS, se colocó en un microscopio invertido a 20X para localizar los espermatozoides y someterlos a tres pruebas de viabilidad. La prueba modificada de *Hypotonic swelling* (HOS), la prueba de pentoxifilina y la prueba del toque mecánico.

Los dos métodos de criopreservación evaluados fueron:

a) Criopreservación por Curva lenta (CL)

Las porciones de TS fueron colocadas en el diluyente Tryladil® Se mantuvieron en refrigeración de 5 a 8°C durante 4 a 8 h y se colocaron en pajillas de 0.25 cc. Después las pajillas fueron colocadas en vapor de nitrógeno durante 20 minutos y de ahí sumergidas en nitrógeno líquido. El tejido testicular permaneció congelado por 15 días antes de su descongelación y evaluación.

Descongelación de curva lenta

Se colocaron las pajillas en agua a 37°C durante 1 min. El contenido de las pajillas se lavó en HTF-Hepes a 37°C para remover el diluyente. Realizado esto, se procedió a extraer el contenido como ha sido descrito previamente para extraer y localizar los espermatozoides de los TS para someterlos a las pruebas de viabilidad.

b) Criopreservación por Vitrificación (Vit)

Para vitrificar se utilizó el protocolo descrito por Kuwayama *et al.* (2005). Solución de equilibrio (SE) y solución de vitrificación (SV), compuestas de PBS (Phosphate Buffered Saline, Bioniche, Pharmaa, Canadá), sustituto de suero sintético (SSS), etilenglicol (EG) y dimetil-sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich).

Calentamiento

En el caso de la vitrificación, el proceso de reanimación se denomina calentamiento ya que en su proceso sólo se llevan a cabo cambios de temperatura y no de descongelación de cristales de hielo. Por lo tanto, se utilizó una solución de calentamiento (SC), compuesta de PBS con SSS más sacarosa; una solución de dilución (SD), compuesta de PBS con SSS más sacarosa y una solución de lavado (SL), compuesta de PBS, con SSS (Kuwayama, 2007).

Pruebas de evaluación de viabilidad espermática

Hypo-osmotic swelling (HOS)

Esta prueba evaluó el estado anatomo-funcional de la membrana plasmática. Los espermatozoides se suspendieron en una gota de 25 µl de contenido de los TS y 75 µl de agua destilada. Después de un máximo de 10 segundos, los espermatozoides viables presentaron curvatura e hinchazón en la cola (Sallam *et al.*, 2005). En cada muestra se analizaron 30 espermatozoides y se obtuvo el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.

Prueba de Pentoxifilina

Se extrajo el contenido de los túbulos seminíferos como se ha descrito previamente, con esta suspensión se hacen gotas de 10 µl en un plato de Petri de 35 mm de diámetro. A cada microgota se le añadieron 90 µl de pentoxifilina (1.0 mg/ml). El plato de Petri fue incubado a 37°C durante 5 minutos (Tournaye *et al.*, 2016). Una vez hecho esto, se contaron 30 espermatozoides para determinar el porcentaje de espermatozoides móviles.

Prueba de toque mecánico

El procedimiento de obtención de los espermatozoides fue igual que en las pruebas anteriores, se colocaron gotas en un plato de Petri de 30 µl y se observó la presencia de espermatozoides con ayuda de un microscopio invertido equipado con un micromanipulador (Nikon®). La técnica de toque mecánico consistió en presionar lateralmente el tercio superior de la cola del espermatozoide con una pipeta de PZD (Partial zone dissection), posteriormente la aguja se elevó y se observó la respuesta. Si la cola era flexible y recobraba su posición original, fue considerado un espermatozoide viable. Los espermatozoides rígidos e incapaces de retomar su posición original fueron clasificados como no viables (De Oliveira, 2004). Se realizó esta prueba en 30 espermatozoides y se obtuvo el porcentaje de aquellos que respondieron al toque mecánico.

Para la sobrevivencia de los espermatozoides se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con PROC GLIMMIX (SAS, 2014). Las comparaciones entre medias de los efectos fijos considerados en el modelo se realizaron con base en la diferencia mínima significativa protegida de Fisher.

El efecto del protocolo de criopreservación sobre la viabilidad espermática se puede observar en el cuadro 1. En el presente estudio, se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides viables con la congelación por el método de curva lenta que con el de vitrificación (52 vs 10% respectivamente), y ambos protocolos fueron inferiores al tejido fresco (74%: $p < 0.0001$).

Cuadro 1. Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad espermática.

Trt	Viabilidad (%)	SE
Control	76 ^a	0.13
Curva lenta	53 ^b	0.13
Vitrificación	10 ^c	0.14

Porcentajes con diferente literal difieren estadísticamente ($P < 0.05$)

Cuadro 2. Comparación de la viabilidad espermática obtenida por medio de las pruebas de viabilidad en cada protocolo de criopreservación.

	Control (%)	Curva lenta (%)	Vitrificado (%)
Hipo- osmotic swelling	77±0.15	56±0.15	10±0.16
Pentoxifilina	77±0.15	52±0.14	8±0.16
Toque mecánico	74±0.15	51±0.14	11±0.16

(P>0.05)

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres pruebas utilizadas para medir viabilidad espermática. En general, las tres pruebas resultaron igualmente efectivas para detectar viabilidad espermática en tejido fresco o después de haber sido criopreservado.

En este estudio se demostró que, la congelación lenta es más eficiente que la vitrificación para criopreservar tejido testicular de bovinos adultos. Aunque la técnica debe seguir siendo probada con diferentes concentraciones de CPA's, quizá con distintos tiempos de exposición para lograr una mejor penetración del tejido testicular y así, llegar a los espermatozoides y lograr, en el caso de curva lenta, una mayor viabilidad a la obtenida en el presente trabajo.

Después de este trabajo, la siguiente pregunta era saber si estos espermatozoides eran capaces de fecundar a un ovocito que fuera capaz de desarrollarse por lo menos 8 días para producir blastocistos, por lo que el siguiente experimento fue "Inyección intracitoplasmática de espermatozoides provenientes de tejido testicular congelado"(Lepe, 2023).

Debido a que los espermatozoides testiculares tienen poca o nula movilidad, fue necesario utilizar la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para intentar la fertilización. El desarrollo de esta técnica es importante ya que es una excelente alternativa cuando se cuenta con muy pocos espermatozoides, y junto con la criopreservación de tejido testicular, es ideal para formar bancos de germoplasma en especies o razas en peligro de extinción.

Así se determinó la diferencia en la tasa de fecundación y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados *in vitro* frescos o vitrificados, al ser fertilizados por espermatozoides descongelados o por inyección intracitoplasmática de espermatozoides congelados o provenientes de tejido testicular fresco o descongelado.

El tejido testicular se procesó igual que en el experimento anterior. En bovinos, a diferencia de lo que sucede en humanos o equinos, para hacer ICSI es necesario causar la desestabilización de la membrana espermática, de lo contrario no se logra disolver y no puede haber descondensación del núcleo, por lo cual se compararon tres desestabilizadores de membrana espermática que fueron Gluthatione (GS-H)-Heparine (Hep), Lysolecithine (LL) y Triton X-100 (TX-100).

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de rastro, fueron madurados *in vitro* y de ahí se dividieron en cuatro grupos:

Grupo 1 (control) – ovocitos fertilizados por Fertilización *in vitro* (FIV) convencional.

Grupo 2 (ED) - ovocitos fertilizados por ICSI con espermatozoides descongelados.

Grupo 3 (TTF) - ovocitos fertilizados por ICSI con espermatozoides de tejido testicular fresco.

Grupo 4 (TTD) – ovocitos fertilizados por ICSI con espermatozoides de tejido testicular descongelado.

Después de la fertilización los presuntos cigotos se cultivaron, a 38°C en una atmósfera de 5%O₂, 6%CO₂, balanceado a nitrógeno. El desarrollo embrionario se evaluó a las 48 h (división embrionaria) y al día 8 de cultivo (desarrollo a blastocisto). Los datos fueron analizados por ANOVA.

No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos de ICSI al analizar los efectos principales (fuente de espermatozoides y desestabilizador). El tratamiento control fue mejor que los demás.

Cuadro 3. Efecto de la fuente de espermatozoides sobre el desarrollo embrionario (% $\pm$ SE) 48 h y D8 después de la ICSI.

Fuente de espermatozoides	Ovocitos inyectados (N)	% División 48 h	% Blastocistos D8
FIV (control)	64	61 $\pm$ 6 ^a	23 $\pm$ 5 ^a
ICSI E/D	113	57 $\pm$ 5 ^a	13 $\pm$ 3 ^b
ICSI TTF	96	43 $\pm$ 5 ^b	6 $\pm$ 3 ^b
ICSI TTD	92	41 $\pm$ 5 ^b	6 $\pm$ 3 ^b

^{a,b} porcentajes con diferentes literales difieren significativamente (P<0.05).

E/D = espermatozoides descongelados, TTF = Tejido Testicular Fresco, TTD = Tejido Testicular Descongelado.

Cuadro 4. Efecto del agente desestabilizador sobre el desarrollo embrionario (% $\pm$ SE) 48 h y D8 después de la ICSI.

Agente desestabilizador	Ovocitos inyectados (N)	% División 48 h	% Blastocistos D8
ICSI-Hep-GSH	95	35 $\pm$ 5 ^a	5 $\pm$ 2 ^b
ICSI-LL	101	50 $\pm$ 5 ^b	6 $\pm$ 3 ^b
ICSI-Tx-100	105	56 $\pm$ 5 ^b	14 $\pm$ 3 ^b

^{a,b} porcentajes con diferentes literales difieren significativamente (P<0.05).

Hep-GSH = Heparine-Glutathione, LL = Lisolectithina, Tx-100 = Triton X -100

En porcentaje de desarrollo a las 48 h y a D8, los grupos de ICSI fueron inferiores al del grupo control en ambos efectos principales. Sin embargo, la interacción entre los efectos principales si afectó el desarrollo embrionario significativamente.

El desarrollo a las 48 h de la mayoría de los grupos fue similar al del grupo control, Sin embargo, la interacción de Tx-100 con los tres gru-

pos de ICSI y la de Hep-GSH con E/D fueron similares al grupo control en cuanto desarrollo a blastocisto.

En este trabajo se demostró que los espermatozoides bovinos provenientes de tejido testicular fresco o descongelado, tienen la capacidad de fecundar un ovocito por ICSI y promover el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Bajo las condiciones de este experimento, Tx-100 y LL fueron mejores agentes desestabilizadores que Hep-GSH. Se necesitan más experimentos con espermatozoides obtenidos de diferentes fuentes para mejorar el desarrollo del embrión después de la ICSI.

Debido al bajo número de presuntos cigotos que alcanzan a formar blastocistos, es necesario explorar alternativas para hacer más eficiente este proceso. Fue así que se decidió realizar el siguiente estudio llamado “Tasa de gestación y pérdida gestacional temprana en vacas transferidas con embriones y hemiembriones producidos *in vitro*” (García, 2018)

La bipartición de embriones es una técnica antigua que ha dado excelentes resultados en embriones frescos o crío preservados producidos *in vivo* para aumentar el número de gestaciones de una donadora. Por otra parte, la bipartición en embriones producidos *in vitro* generalmente arroja resultados inferiores a los obtenidos con embriones producidos *in vivo* especialmente si se hace en embriones criopreservados.

En este trabajo se siguió una estrategia diferente a la presentada por investigaciones previamente publicados, en vez de realizar la bipartición después de cultivar o criopreservar los embriones, se realizó la FIV, la bipartición y después la vitrificación. Ambos hemiembriones fueron calentados y transferidos a la misma receptora.

Los embriones FIV fueron producidos como en los experimentos anteriores. Los blastocistos obtenidos fueron bipartidos modificando la técnica usada por López *et al.* (2001) y vitrificados de acuerdo con Kuwayama *et al.*, 2007. Los hemiembriones calentados fueron transferidos a receptoras previamente sincronizadas para transferencia de embriones a tiempo fijo (Bó *et al.*, 2002).

Cuadro 5. Número de vacas gestantes al día 30 y 60 pos transferencia y porcentajes (Media $\pm$ EE).

Trt	n	Gestaciones D 30 (% $\pm$ EE)	Gestaciones D 60 (% $\pm$ EE)
Enteros	30	6 (20 $\pm$ 7.3) ^a	5 (16.6 $\pm$ 2.5) ^a
Hemi- embriones	30	11 (36.6 $\pm$ 8.7) ^a	10 (33.3 $\pm$ 4.0) ^a

n= Número de transferencias de embriones individuales y hemi embriones en pares, a= literales iguales en la misma columna no indican diferencia significativa ($P < 0.05$), Trat.= Tratamiento, EE = Error estándar

Aunque existió una diferencia numérica en porcentaje de gestación a favor de los hemiembriones, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre tratamientos. Esto probablemente se debió al número de transferencias realizadas.

En cuanto a las pérdidas gestacionales, solo se perdió una gestación de cada grupo entre los días 30 y 60, por lo que tampoco hubo diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 6. Pérdida gestacional entre el día 30 y 60 pos transferencia (Media $\pm$ EE).

Trt	n	Pérdida gestacional D 60(% $\pm$ EE)
Enteros	6	1 (16.6 $\pm$ 15.21) ^a
Hemi-embriões	11	1 (9 $\pm$ 8.66) ^a

n= Número de transferencias de embriones individuales y hemi embriones en pares, a= literales iguales en la misma columna no indican diferencia significativa ($P < 0.05$), Trat.= Tratamiento, EE = Error estándar

Los resultados de este estudio comprobaron que la aplicación en conjunto de las técnicas de bipartición y vitrificación a embriones bovinos producidos *in vitro* no mejora la tasa de preñez en comparación con los embriones enteros vitrificados, sin embargo, se evidencia que los embriones PIV tienen la capacidad de sobrevivir y desarrollarse

aun después de la bipartición y posteriormente ser criopreservados mediante vitrificación.

En cuanto a la pérdida gestacional temprana, la bipartición no tuvo un efecto negativo, el porcentaje evidenciado en este trabajo se encuentra entre los parámetros anteriormente publicados al transferir embriones *in vitro* enteros.

Conclusiones generales

En conjunto, estos estudios van dirigidos hacia incrementar la eficiencia de los programas de producción y transferencia de embriones producidos *in vitro*. La formación de blastocistos a partir de ICSI con espermatozoides testiculares y la producción de gestaciones con embriones de FIV bipartidos, vitrificados y calentados, son resultados promisorios para la creación de bancos de germoplasma de especies o razas en peligro de extinción. Claramente estas tecnologías requieren aumentar su eficiencia, por lo que seguramente veremos más investigaciones acerca de esta fascinante área de la biotecnología de la reproducción.

Referencias bibliográficas

- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, Diciembre, 291-300.
- Barbosa, A. P. M., Martins, C. F., & Sereno, J. R. B. (2011). Criopreservação de células espermatozoides bovinas utilizando diferentes moléculas protetoras. *Archivos de zootecnia*, 60(230), 293-296.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., y otros. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 53-72.

- De Oliveira, N. M., Sánchez, R. V., Fiesta, S. R., Salgado, T. L., Rodríguez, R., Bethencourt, J. C. A., & Zamora, R. B. (2004). Pregnancy with frozen-thawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability. *Human Reproduction*, 19(2), 262-265.
- Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91.
- Hidalgo, C. O., Gómez, E., Prieto, L., Duque, P., Goyache, F., Fernández, L. & Díez, C. (2004). Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 62(3), 664-676.
- García, B. L. A. (2018) Tasa de sobrevivencia de embriones bovinos producidos in vitro vitrificados y bipartidos”. Tesis de Maestría de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. 78pp
- Honaramooz A., Snedaker, A., Boiani, B., Schöler, H., Dobrinski, I., Schlatt S. (2002). Espermatozoides de testículos neonatales de mamíferos injertados en ratones, *Nature*, 418, 778-781.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12.
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Leda, S., & Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, (11), 608-14.

- Lepe, A. I. E. (2019) Comparación de dos métodos de criopreservación de tejido testicular bovino. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, 43pp
- Lepe, A. I. E. (2023) “Inyección intracitoplasmática de espermatozoides provenientes de tejido testicular congelado” Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana.
- Mazur, P. (2012). 2. Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallization of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. *Cryobiology*, 65(3), 339.
- Sadri-Ardekani, H., McLean, T. W., Kogan, S., Sirintrapun, J., Crowell, K., Yousif, M. Q., & Zeller, K. (2016). Experimental testicular tissue banking to generate spermatogenesis in the future: a multidisciplinary team approach. *Methods*, 99, 120-127.
- Sallam, H.N., Farrag, A., Agameya, A., El-Garem, Y., Ezzeldin, F., & Sallam, A. (2005). Using the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in ICSI - A randomized controlled study. *Fertility and Sterility*, 84, S373-S4.
- Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, 1-19.
- Tournaye, H., Verheyen, G., & Goossens, E. (2016). Testicular Tissue Cryopreservation. In *Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation*. Springer, Tokyo. Pp. 141-148.



Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco, Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1ª Sección
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, CDMX