

IMPACTO DE LA VARIABILIDAD EN LA CALIDAD DEL SEMEN SOBRE LA EFICIENCIA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN *IN* *VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

Noticias y Comentarios

Abril 2023

ISSN Nº 0327-3059

Nº 604

Introducción

La producción de embriones por fecundación *in vitro* (FIV) ha crecido exponencialmente en los últimos 10 años. Según el último reporte de datos publicado por la IETS en el año 2021 (Sociedad Internacional de Tecnologías embrionarias) la producción de embriones de FIV ha ascendido a 1.521.018 respecto a los 386.374 producidos por la técnica de MOET (multiovulación y transferencia embrionaria) (Viana, 2022).

El éxito de los sistemas de FIV depende de varios factores, entre estos el estado y la calidad del semen utilizado podría jugar un rol preponderante. Durante el proceso de fecundación los espermatozoides deben emular los mismos cambios físicos y bioquímicos que suceden normalmente en el tracto reproductivo de la hembra (Georgadaki y col., 2016). Esta serie de cambios son inducidos por los componentes del medio de FIV (Brackett y Oliphant., 1975). No obstante, alteraciones que afecten la viabilidad de estos espermatozoides pueden reducir drásticamente el éxito del proceso de fecundación. Frente a esta situación se recurre a la evaluación de calidad seminal mediante la determinación de vigor, porcentaje de motilidad progresiva, espermatozoides vivos, anormales relacionados positivamente con la fertilidad a campo (Kjaestad y col., 1993). Sin embargo, en producción de embriones por FIV se observa de manera empírica variación en la producción de embriones según el padre utilizado a pesar de ser este considerado apto.

Debido a esto, en el presente trabajo se ha estudiado el impacto de la variabilidad del semen en la eficiencia de la producción *in vitro* y su relación con los resultados de análisis de la calidad.

Metodología

En el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la EEA INTA Mercedes se analizaron muestras comerciales congeladas de 5 toros Braford a fin de evaluar la relación entre calidad seminal y producción de embriones *in vitro*. Para esto se evaluó la relación entre los resultados de calidad seminal, la velocidad de desarrollo y el % de embriones producidos. Para esto las pajuelas de semen fueron descongeladas en baño maría a 37 °C y luego su contenido fue dividido en 2 partes. Una parte fue destinada a análisis de calidad seminal donde se registró la motilidad progresiva (PM) y vigor individual (IV) a las 0 y 2h y porcentaje de espermatozoides vivos (AS) y anormales mediante extendido de semen y coloración vital de Eosina-Nigrosina. La segunda porción de semen fue sometida a lavados a fin de retirar los crioprotectores y utilizada para fecundar ovocitos bovinos previamente madurados. Para esto, 24 horas antes se obtuvieron complejos cumulus ovocitos a partir de ovarios de matadero. Estos fueron madurados *in vitro* en medio TCM 199 durante 22 h. La fecundación se realizó en medio BO (Brackett y Oliphant, 1976) con 16×10^6

espermatozoides/ml/5h con muestra completa. Posteriormente, el cultivo embrionario se realizó en SOF suplementado con 2,5% de suero fetal bovino durante 7 días a 38,5 °C y 6,5 % de CO₂. Para evaluar el desarrollo individual, 20 presuntos cigotos pertenecientes a cada grupo se cultivaron individualmente en el sistema WOW (*well of the well* o micro-pozos), de forma paralela se mantuvo un cultivo de gotas convencional como control. La escisión y el número de blastómeros se registraron de 20 a 26 y 48 horas después de la FIV y las tasas de blastocistos se determinaron en el día 7 (Foto 1).

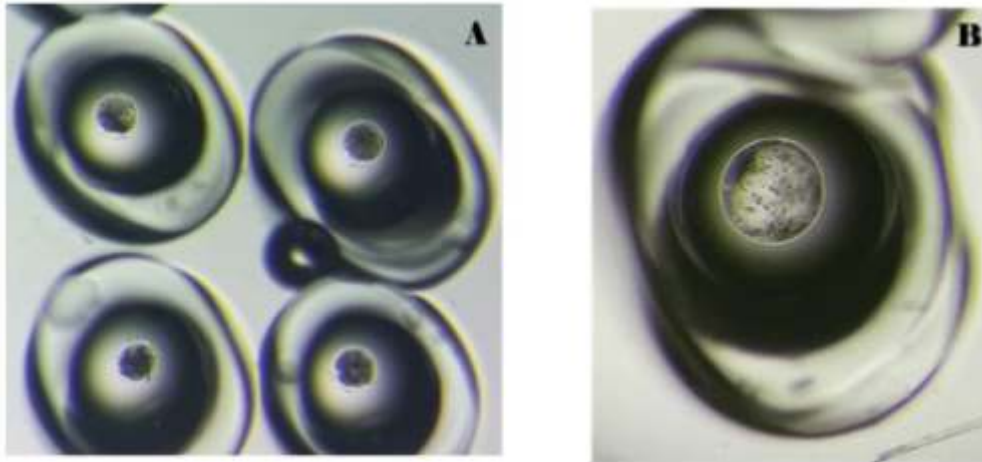


Foto 1. Embriones de 4 y 8 células (A) y blastocisto (B) cultivados en sistema WOW, en grupo de 20 individuos para seguimiento individual.

Resultados y discusión

Luego de la fecundación se inician complejos procesos que intervienen en la unión de las gametas. Debido a esto, el primer ciclo celular previo a la primera división celular o clivaje es el más largo que los subsiguientes. No obstante, se ha demostrado que aquellos embriones que comienzan a desarrollar antes de las 26 horas luego del inicio de la fecundación (FIV) poseen altas probabilidades de llegar hasta el estadio transferible de blastocisto (Somfai y col., 2010). En este trabajo la velocidad de clivaje resultó variable entre los padres analizados. Luego de 26 horas post FIV, los padres A, C y D mostraron alrededor del 50% de embriones que desarrollaron entre 2 y 4 células, mientras que los padres B y E esto no superó el 10% (Figura 1).

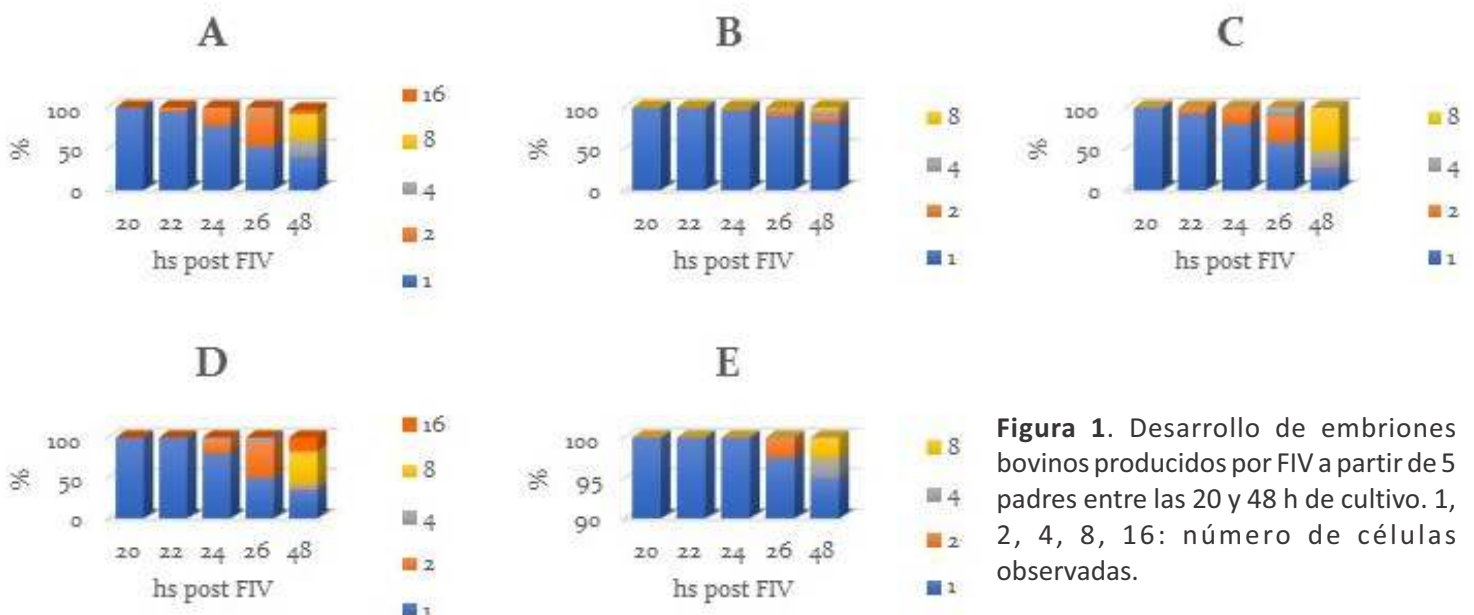


Figura 1. Desarrollo de embriones bovinos producidos por FIV a partir de 5 padres entre las 20 y 48 h de cultivo. 1, 2, 4, 8, 16: número de células observadas.

El porcentaje de clivaje a las 26 y 48 horas fueron estadísticamente inferiores en dos de las muestras evaluadas. Dichos padres no generaron blastocistos a día 7 (Tabla 1). Esta variabilidad entre toros en la capacidad de generar embriones puede deberse al tiempo demandado en producirse la penetración y formación de pronúcleos (Aoyagi y col., 1988).

Tabla 1. Clivaje y blastocistos logrados con 5 toros en sistema de cultivo con seguimiento individual y control convencional en gota.

Toros	N		Clivaje (%)			Blastocistos (%)	
	WOW	Gotas	WOW 26 h	WOW 48h	Gota	WOW	Gota
A	40	24	19 (48)a	23 (58)a	13 (54)a	5 (13)	9 (38)
B	40	36	4 (10)b	7 (18)b	4 (11)b	0 (0)	0 (0)
C	40	44	17 (43)a	29 (73)a	27 (61)a	12 (30)	12 (27)
D	40	36	20 (50)a	26 (65)a	21 (58)a	13 (33)	15 (42)
E	40	44	1 (3)b	2 (5)b	1 (2)b	0 (0)b	0 (0)

a, b: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En este trabajo no se encontró correlación entre el porcentaje de clivaje y de blastocistos producidos, a diferencia de otros reportes donde se seleccionó el semen mediante la técnica de *swim up* (Zhang y col., 1999). En parte puede deberse al toro A, el cual demostró tasas de clivaje medianas a altas, pero gran variación en las tasas de blastocistos producidos.

Los análisis de calidad mostraron valores similares para porcentaje de espermatozoides vivos, anormalidades espermáticas, motilidad progresiva y vigor individual a la hora 0. Luego de 2h de incubación se registraron pérdidas de motilidad y vigor. No se encontró correlación entre las variables de calidad del semen y las tasas de embriones, al igual que trabajos similares donde han realizado selección espermática con *swim up* (Zhang y col., 1999). Sin embargo, cuando la selección espermática se realiza utilizando gradiente de fases, se ha observado correlación superior al 50% $R^2 > 0.5$ (Tanghe y col., 2002).

Tabla 2. Variables indicadoras de calidad seminal en 5 toros utilizados para fecundación *in vitro*

Toros	Vivos (%)	AE (%)	MP 0h (%)	MP 2h (%)	MP conservada PM (%)	VI 0h (%)	VI 2h (%)	VI conservado IV (%)
A	38	9	58	28	48	4	2.2	55
B	35	12	43	0	0	3	0	0
C	34	12	65	15	23	4.2	1.2	29
D	40	11	65	33	51	4.5	3.5	78
E	42	12	65	32	49	3.8	2.3	61

AE: anormalidades espermáticas; MP: motilidad progresiva; VI: vigor individual.

Consideraciones finales

El resultado favorable del análisis de calidad seminal de la pajuela descongelada no es un factor predictor del éxito de producción de embriones *in vitro* cuando se aplican protocolos sin selección espermática.

Esta dificultad para generar embriones aptos puede tener diferentes orígenes, resta evaluar en el futuro la posibilidad de mejorar este desempeño mediante la utilización de técnicas de selección o pre-incubación.

La producción de embriones *in vitro* es cada vez más utilizada a nivel mundial. En los últimos 5 años el número de laboratorios dedicados a la producción de embriones *in vitro* se ha multiplicado de manera exponencial en Argentina. Debido a esto, es importante realizar trabajos de investigación de esta índole, que generen respuestas a interrogantes que se presentan frecuentemente en la práctica.

Med. Vet. Franco Dellavalle

dellavalle.franco@inta.gob.ar

Tec. Juan Manuel Benítez

Med. Vet. Domingo Emilio Aguilar

Med. Vet. Amada Eugenia Ynsaurralde-Rivolta

ynsaurralde.eugenia@inta.gob.ar

Bibliografía

Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H. Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1988;30(5):973-85. doi: 10.1016/s0093-691x(88)80060-8. PMID: 16726540.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 1982 Aug;27(1):147-58. doi: 10.1095/biolreprod27.1.147. PMID: 6896830.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 1975 Mar;12(2):260-74. doi: 10.1095/biolreprod12.2.260. PMID: 1122333.

Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med*. 2016 Oct;38(4):979-86. doi: 10.3892/ijmm.2016.2723. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27599669; PMCID: PMC5029953.

Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand*. 1993;34(3):299-303. doi: 10.1186/BF03548194. PMID: 8310902; PMCID: PMC8112497.

Parrish JJ. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 2014 Jan 1;81(1):67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005. PMID: 24274411; PMCID: PMC3886814.

Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V, Maes D, de Kruif A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod Domest Anim*. 2002 Jun;37(3):127-32. doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00343.x. PMID: 12071885.

Viana JHM, 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*. 2022.

I E T S D a t a R e t r i e v a l p p 1 9

https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf
Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Håård MG, Rodriguez-Martinez H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int J Androl*. 1999 Aug;22(4):253-60. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00178.x. PMID: 10442298.