

Proyecto de investigación

Caracterización espermática del ganado Blanco Orejinegro (BON) y Cebú Brahman para la producción de embriones bovinos *in vitro* (IVP).

Rosa Amparo Sierra, Bact., Jesús Alfredo Berdugo, DMV, MSc., Juan Felipe Cuartas, Est., Víctor Asdrubal Aguirre, Est., Marta Olivera Ángel, Dr.Sci.Agr.
Programa Biotecnología Animal, BIOGENESIS. Universidad de Antioquia.
A.A. 1226. Medellín, Colombia.

La producción *in vitro* (PIV) de embriones se está haciendo rutinaria como un método para optimizar el recurso animal, para estudios de biología reproductiva y como fuente de embriones para las diferentes técnicas de biotecnología. Dentro del desarrollo de las metodologías se hace imperativo el conocimiento de la biología de cada una de las especies o razas que se utilizan en este procedimiento. Es aceptado en la literatura que existen diferencias en la fertilidad de diferentes animales dentro de la raza, validando la necesidad de estudiar y caracterizar el comportamiento de cada raza usada, para una optimización del recurso animal.

En la rutina de la FIV se necesita inducirle al espermatozoide todos los cambios necesarios para fertilizar, que naturalmente ocurren dentro del tracto reproductor de la hembra. El conocimiento de la biología de la capacitación, de la RA, de la forma de seleccionar la mejor concentración de heparina o de espermatozoides y la adición de algunos fármacos, han de ser rutina en el programa, gracias a que hoy en día existen formas de identificar con certeza cada una de los fenómenos planteados, todo ello tendiente a la obtención de un mayor número de embriones.

Se conoce desde 1980 que se puede obtener descendencia viable a partir de embriones bovinos obtenidos por FIV, pero poco o nada se sabe de la biología reproductiva del ganado criollo y del brahman. Enmarcado dentro de los conceptos modernos de estudio de la biodiversidad, esta falta de conocimiento refuerza aún más la necesidad de este tipo de trabajos.

Se trabajará con ganado de la raza blanco orejinegro (BON), como representante de la especie *Bos taurus*, dado que el conocimiento de

los parámetros funcionales del ganado criollo son parte del proyecto para la preservación y propagación del ganado criollo colombiano, y además porque es una raza en peligro de extinción; y con el ganado de la raza Brahman como representante de la especie *Bos indicus*, que es una raza de importancia económica en nuestro país, ya que produce el 90 % de la carne que se consume. Además, el semen de ganado BON y del Brahman están sin caracterizar para producción *in vitro* de embriones.

Dentro de las actividades del programa de Biotecnología Animal de la Corporación Biogénesis, está la obtención de embriones *in vitro* para ello se hace necesario la profundización en el conocimiento de la biología reproductiva de las razas o especies a estudiar; es por eso que la identificación de los parámetros biológicos funcionales de los espermatozoides utilizados se hace prioritaria.

Una de las prioridades del programa de Biotecnología es la preservación y propagación de razas en peligro o en vía de extinción así como de razas de importancia zootécnica en la producción animal de nuestro país; sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la biología reproductiva de estas especies, dado que existen variaciones importantes en la capacidad de fertilizar óvulos *in vitro* entre las razas y entre los toros (1,2), el primer paso dentro de este proceso son los estudios sobre las características espermáticas de las especies o individuos.

Este estudio pretende aportar información referente al comportamiento *in vitro* de los espermatozoides de la raza (BON) reconocida por su resistencia a las enfermedades, rusticidad y adaptación a las duras condiciones del trópi-

co; y de la raza cebú Brahman ya que el 90% de la carne producida en el país tiene su influencia

Con el presente estudio se espera conocer algunas características de los procesos biológicos que debe sufrir el espermatozoide previos a la fertilización: la compactación de la cromatina, la hiperactivación, la capacitación, la reacción acrosómica (RA) y además, evaluar cómo estos factores pueden afectar la capacidad de producir embriones *in vitro* para una optimización del recurso animal. Se tratará de establecer la mínima concentración espermática y de heparina con las que se puedan obtener las mejores tasas de fertilización, se determinará la proporción de espermatozoides que tienen la cromatina normal o anormal, que se capacitan, que tienen las membranas intactas y que están viables; se intentará hacer una correlación con los resultados obtenidos en fertilización, división embrionaria y proporción de blastocistos.

Para ello se tomará semen congelado de 10 toros BON y 10 toros brahman, después de descongelar las pajillas de los toros se procederá a evaluar diferentes concentraciones, teniendo como base un control preestablecido dentro del laboratorio, posteriormente se utilizarán diferentes concentraciones de heparina y finalmente se realizarán las técnicas de evaluación funcional del desarrollo embrionario.

- Evaluar la tasa de espermatozoides que sufren reacción acrosómica durante el proceso de FIV.
- Determinar la proporción de espermatozoides que tienen la cromatina sin alteraciones.
- Determinar la proporción de espermatozoides que se capacitan durante el proceso de FIV
- Encontrar la concentración espermática óptima de semen BON y Brahman, con la que se obtienen las mejores tasas de fertilización y desarrollo embrionario.
- Hallar la concentración de heparina con la que se logran las más altas tasas de capacitación y fertilización espermática del semen BON y Brahman.
- Comparar el comportamiento de los espermatozoides BON y Brahman en presencia de penicillamine hypotaurine ephinephrine (PHE) en las tasas de fertilización y desarrollo de embriones.

Materiales y métodos:

Los oocitos para los embriones serán obtenidos de ovarios recolectados en el matadero, se aspirarán con jeringa los folículos entre 4y 10 mm de diámetro. Los oocitos serán clasificados en 3 categorías de acuerdo a lo reportado por Sirard y madurados por 24 horas. Los oocitos de categorías I y II serán fertilizados con semen de BON o Brahman. El semen será capacitado con heparina a una concentración de 20ug/ml en el medio de fertilización. La evaluación de la fertilización se realizará a las 18 horas mediante el uso de la coloración de Hoesch para determinar la presencia de pronúcleos, con la ayuda de un microscopio de fluorescencia a 420 nm. Los oocitos fertilizados se transferirán a medio de crecimiento y se evaluará su desarrollo a las 96 y a las 184 horas. Todos los procedimientos se realizarán en condiciones de esterilidad y el cultivo se realizará en atmósfera de 5% de CO₂ en aire, a 39°C.

Fase I:

Se evaluará el efecto de la concentración espermática sobre las tasas de fertilización de oocitos madurados *in vitro*.

Fase II:

Evaluará el efecto de la concentración de heparina sobre la tasa de fertilización de oocitos madurados *in vitro*, (*se utilizará la mejor concentración de espermatozoides obtenidas en la fase I).

Fase III:

Se evaluará el efecto de la adición de PHE (con y sin PHE), sobre las tasa de fertilización y desarrollo.

Fase IV:

Se harán estudios funcionales del espermatozoide bovino. Viabilidad, kit comercial diseñado para tal fin (Sperm viability kit Molecular Probes Inc.); integridad de las membranas se utilizará la técnica de Jeyendran y col (4); capacitación, se realizará mediante la técnica de la clortetraciclina (5); reacción acrosómica, se realizará mediante la técnica de coloración con la lectina Pissum sativum (6); y la calidad de la cromatina espermática, se realizará mediante la técnica de Tejada y col (7).

Finalmente, se realizarán los análisis estadísticos pertinentes tendientes al planteamiento de hipótesis frente a la respuesta de los embriones

en los diferentes tratamientos propuestos y frente a los aspectos biológicos encontrados. Se usará prueba de t de Student y un análisis de varianza.

Resultados esperados

Al final del estudio se espera conocer más de la biología de los espermatozoides de las razas planteadas, determinar la concentración

espermática y la concentración de heparina que permitan obtener el mayor número de blastocistos posible tanto de ganado BON como de Brahman, conocer el efecto de la PHE en la fertilización y desarrollo embrionario. Establecer el potencial fértil de una pajilla, al conocer no solamente sus parámetros descriptivos (concentración, movilidad) sino funcionales (viabilidad, integridad de las membranas, reacción acrosómica, capacitación).

Referencias :

- 1.- Foote RH, Parks J. Factors affecting preservation and fertility of bull sperm : A brief review. *Reprod Fertil Develop* 1993; 5: 665 - 673.
- 2.- Miller DJ, Hunter A. Individual variation for in vitro Fertilization Success in Dairy Bulls. *J Dairy Sci.* 1987; 70: 2150 - 2153.
- 3.- Sirard MA, Lambert RD, Menard DP, and Bedoya M. Pregnancy after in vitro cow follicular oocytes, their incubation in the rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J Reprod Fert* 1985; 75: 551 - 556.
- 4.- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson F W. Two simple methods for detecting acrosome reacted sperm. *Gamete Res* 1986; 15: 213 B 226.
- 5.- Amin A, Bailey JL, Storey BT. A comparison of three methods for detecting acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 741 B 745.
- 6.- Jeyendran RS, Van der Ven, Perez-Pelaez B., Crabo B, Zaneveld J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 1984; 70: 219.
- 7.- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87 - 91.