



Archivos de Medicina Veterinaria  
ISSN: 0301-732X  
archmv@uach.cl  
Universidad Austral de Chile  
Chile

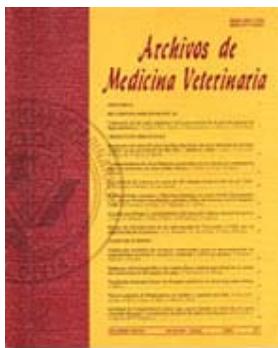
Aller, J.F.; Alberio, R.H.; Palma, G.A.  
Gestación con embriones producidos in vitro a partir de ovocitos recuperados de vacas  
ovariectomizadas  
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 32, núm. 1, 2000  
Universidad Austral de Chile  
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013741004>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en [redalyc.org](http://redalyc.org)

 Revistas Electrónicas UACH

Artículos Búsqueda artículos  
Tabla de contenido Anterior Próximo Autor Materia Búsqueda Inicio Lista

 Archivos de medicina veterinaria  
ISSN 0301-732X versión impresa

Como citar este artículo  
Aregar a favoritos  
Enviar a e-mail  
Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.32 n.1 Valdivia 2000

## Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas

## Gestation with *in vitro* produced embryos from oocytes of ovariectomized cows

J.F. Aller, M.V. MSc.; R.H. Alberio, M.V. PhD.; G.A. Palma, M.V. PhD.

Grupo de Biotecnología de la Reproducción, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce, C.C. 276 (7620) Balcarce, Argentina.

### SUMMARY

The objectives of this work were to evaluate the efficiency of *in vitro* production (IVP) of embryos from ovariectomized cows and the pregnancy rate of transferred frozen-thawed embryos. One hundred and twenty Argentine-Holland cows were ovariectomized in 6 sessions by using the effeminator by vaginal via. The ovaries were transported at 18-22°C into saline solution supplemented with antibiotics during 6 h and processed within of 11 h since the first ovary obtained. Cumulus-oocytes complexes (COCs) were aspirated from small antral follicles (2-8 mm in diameter). The COCs were matured in TCM 199 plus 10% oestrus cow serum for 22 h. Following maturation the oocytes were fertilised with frozen-thawed semen in TALP medium and cultured in CR1aa medium. At Day 7 and 8 after fertilisation, good quality blastocysts and expanded blastocysts were equilibrated in 1.5 M ethylene glycol. Two embryos were loaded into 0.25 ml straws and frozen. The embryos were thawed and directly transferred into the recipients. A total 57

dairy heifer was used as recipients. Pregnancy diagnosis was performed by rectal palpation 55 d after embryo transfer.

The efficiency of IVP technology was 9.5 oocytes and 2.7 embryos *per ovary*. The overall pregnancy rate was 31.5%. A higher pregnancy rate ( $P<0.05$ ) was obtained for Day-7 (35.5%) versus Day-8 (16.6%) IVF embryos. It can be concluded from the results that a culled cow could produce 0.82 additional pregnancy after application of this technology. These data demonstrate that IVP embryos originating from ovaries of ovariectomized cows is a good alternative to preserve genetic resources and for commercial purposes.

*Palabras clave:* bovino, *in vitro*, embrión, ovariectomía.

*Key words:* bovine, *in vitro*, embryo, ovarectomy.

## INTRODUCCION

El nacimiento del primer ternero producto de la fecundación *in vitro* (FIV) fue anunciado por [Brackett y col. \(1982\)](#), en este estudio se utilizó semen fresco y el embrión resultante (estadio de 2 a 4 células) fue transferido al oviducto de la hembra receptora. Extensa literatura científica ha sido publicada hasta la actualidad con el objeto de mejorar la técnica de producción *in vitro* (PIV) de embriones y la viabilidad *in vivo* de los mismos. Desde 1992, esta tecnología fue aplicada en forma exitosa a programas comerciales de mejoramiento genético ([Hasler, 1993](#)).

La obtención de ovocitos para FIV puede realizarse en el animal vivo a través de la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (ovum pick-up), mediante laparoscopía u ovariectomía.

En Argentina, alrededor de 200.000 vacas de alto valor genético para producción de leche y carne son faenadas anualmente debido a que finalizan su ciclo productivo. La recuperación de sus gametos es una alternativa para preservar y potenciar una fuente genética utilizando tecnología *in vitro* de embriones. La PIV de embriones de hembras faenadas presenta las ventajas de la sencillez y economía de la obtención de los ovarios. Sin embargo, la falta de una adecuada identificación durante el desposte puede conducir a errores en la identidad. La falta de cuidado en la separación de los genitales de la carcasa puede aumentar el riesgo de contaminación de la superficie ovárica y por lo tanto de los ovocitos durante el cultivo posterior. En cambio, la obtención de los ovarios por medio de la ovariectomía presenta condiciones más higiénicas y mayor confiabilidad en la identificación con respecto a la recuperación en el matadero.

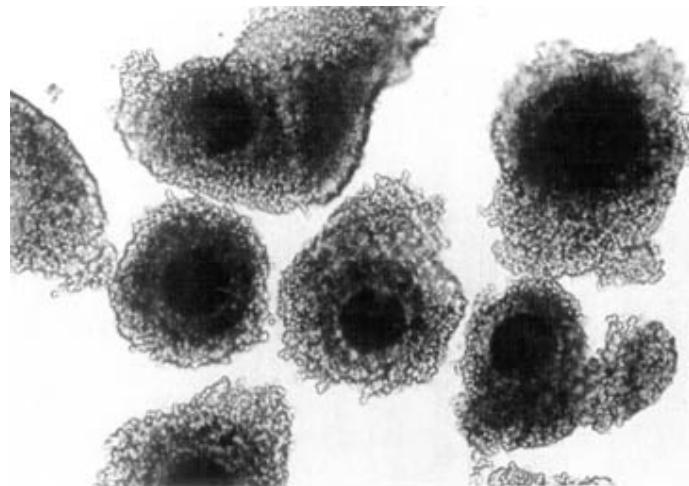
Los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar la eficiencia en la PIV de embriones a partir de ovocitos de vacas de rechazo ovariectomizadas y determinar la tasa de preñez de esos embriones descongelados de 7 y 8 días de edad, después de la transferencia directa a vacas receptoras.

## MATERIALES Y METODOS

*Ovariectomía y transporte de ovarios.* Ciento veinte vacas Holando-Argentino de alta producción ( 8.000 litros/lactancia), ubicadas entre 500 y 650 km del Laboratorio de PIV de embriones, fueron utilizadas para este ensayo. Se realizaron 6 sesiones de ovariectomía de 18-25 vacas por sesión. La ovariectomía se realizó por vía transvaginal utilizando un bisturí de Dutto (Laboratorio Dutto, Uruguay) y un dilatador vaginal. Una vez realizada la colpotomía dorsal del fornix vaginal, se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios con el castrador

Effeminator de Reisinger modificado por Richter (Hauptner, Alemania) en forma semejante a un emasculador (hemostasia y corte). Los ovarios fueron transportados en un recipiente térmico a 18-20C en solución salina con antibióticos (penicilina G sódica 100 UI/ml y sulfato de estreptomicina 0,5 mg/ml) durante 6 horas y procesados dentro de las 11 horas de comenzada la sesión de ovariectomía.

*Producción in vitro de embriones.* Los Complejos Cumulus-Ovocitos (CCOs) ([Foto 1](#)) fueron aspirados de folículos de 2-8 mm de diámetro por medio de una bomba aspirante y aguja 21G de diámetro. Los CCOs fueron recolectados del líquido folicular con ayuda de una lupa estereoscópica. El cultivo se realizó en grupos de 30-40 ovocitos en 400  $\mu$ l de TCM 199 (Sigma, EEUU) suplementado con 10% de suero de vaca en estro (SVE) y Hormona menopáusica humana (HMG-0,05 UI/ml) u Hormona folículoestimulante recombinante humana (r-hFSH-0,05 UI/ml) (Serono, Italia) en estufa a 38,5°C, en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad máxima durante 18-20 horas. Luego de la maduración, todos los CCOs fueron inseminados con semen descongelado de un toro de raza Holstein Friesian comercial. El semen fue centrifugado durante 10 minutos a 600 g a través de un gradiente discontinuo de Percoll (45-60-90%). El sobrenadante fue aspirado y el pellet resuspendido en 5 ml de medio de capacitación TALP sin suero ([Parrish y col., 1986](#)) y centrifugado nuevamente. El sobrenadante fue descartado y el pellet de semen evaluado en calidad y concentración. La fecundación se llevó a cabo con  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml en 400  $\mu$ l de medio TALP, suplementado con 10  $\mu$ g/ml de heparina (Sigma, EEUU) bajo las mismas condiciones atmosféricas de la maduración durante 18-22 horas. Después de la fecundación, los ovocitos fueron separados de las células de la granulosa y de los espermatozoides por medio de agitación mecánica (vortex) durante 1 minuto y cultivados posteriormente en 400  $\mu$ l de medio CR1aa ([Rosenkrans y First, 1994](#)) a 38,5°C en 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> durante 7 a 8 días.



**Foto 1. Complejos Cumulus-Ovocitos de excelente calidad.**

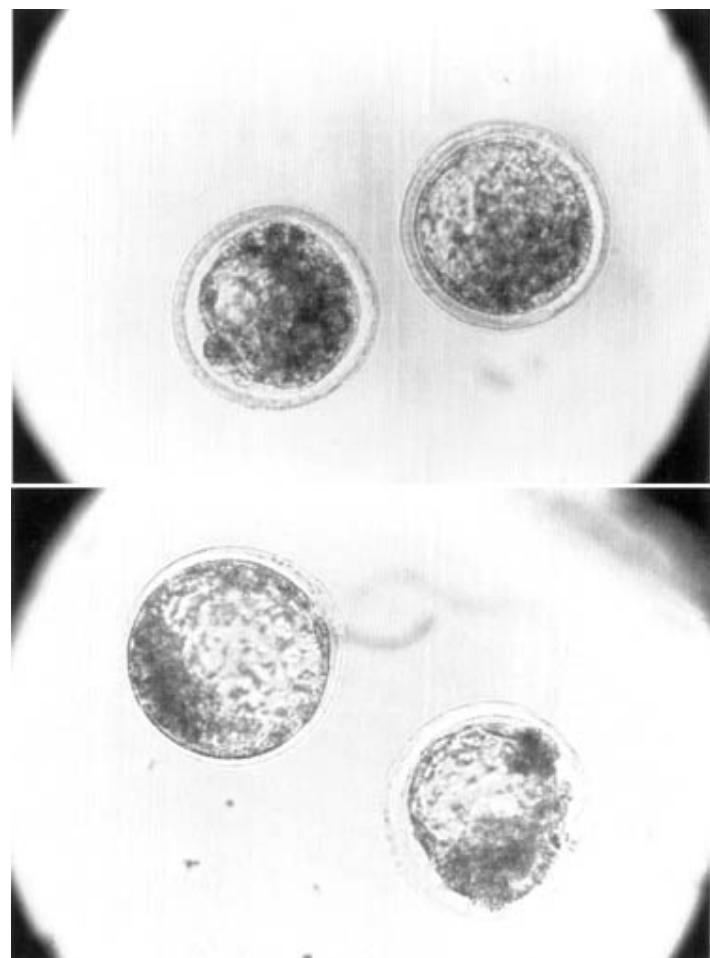
**Excellent quality Cumulus-oocytes complexes.**

*Criopreservación de embriones.* Blastocitos y blastocitos expandidos ([Foto 2](#)) de 7 y 8 días de edad (Día 0 = día de la inseminación) fueron seleccionados para la congelación y lavados en PBS + 20% SVE. Los embriones fueron luego equilibrados durante un máximo de 15 minutos a temperatura ambiente en una solución con 1.5 M etilenglicol + 20% SVE + 0,4% BSA y cargados en pajuelas francesas de 0,25 ml (2 embriones/pajuela). Las pajuelas fueron colocadas en una congeladora programable (Haake SK 91, Alemania) a 7°C y mantenidas por 2 minutos. Al finalizar este período, el "seeding" fue inducido manualmente con una barra metálica enfriada en nitrógeno líquido. El enfriamiento fue continuado a una tasa de 0,5°C/minuto hasta 30°C, después del cual las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, acondicionadas en gobelets y mantenidas hasta la transferencia. La descongelación se realizó exponiendo las pajuelas al aire (21-23°C) durante 10 segundos y luego en agua a 30°C durante 1 minuto.

*Transferencia de embriones.* Se utilizaron como receptoras 57 vaquillonas Holando-Argentino vírgenes

(1820 meses de edad y 330-350 kg) con celo sincronizado mediante una aplicación de 500 mg de cloprostenol. La transferencia se realizó en el día 7 del ciclo estral (Día 0 = día del celo) en forma directa (sin observación de los embriones) 510 minutos después de la descongelación, por la técnica transcervical no quirúrgica, depositando dos embriones por receptora en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Todas las transferencias fueron realizadas por un mismo operador. El diagnóstico de preñez fue realizado por palpación rectal 55 días después de la transferencia.

*Análisis estadísticos.* Para determinar si la diferencia obtenida entre las tasas de gestación de embriones de 7 y 8 días fue estadísticamente diferente de lo que se obtendría por azar, se utilizó el test de Chi cuadrado utilizando el programa estadístico PCS2T (Lambda, Alemania).



**Foto 2. Blastocistos expandidos producidos *in vitro* seleccionados para congelación.**

***In vitro* produced expanded blastocysts selected for freezing.**

## **RESULTADOS**

De 120 vacas ovariectomizadas se obtuvieron 237 ovarios. En 3 vacas sólo se pudo extraer un ovario. El tiempo transcurrido entre el primer ovario obtenido y el comienzo de la maduración fue aproximadamente de 11 horas en todas las sesiones. Se obtuvo por el método de aspiración un promedio de 9,5 ovocitos/ovario, o sea 18,8 ovocitos/vaca ovariectomizada.

Los resultados de la eficiencia en la producción *in vitro* de embriones son presentados en el [cuadro 1](#).

**CUADRO 1. Eficiencia en la producción *in vitro* de embriones a partir de vacas ovariectomizadas.**

**Efficiency of *in vitro* production of embryos from ovariectomized cows.**

Nº vacas ovariectomizadas	Nº ovarios obtenidos	Nº ovocitos recuperados	Nº embriones congelados	Nº embriones/ ovario	Nº embriones/ vaca
					Día 7 Día 8
120	237	2262	391 240	2,7 (17,3)(10,6)	5,2

La tasa de gestación obtenida con embriones de 7 días (35,5%) fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) a la obtenida con embriones de 8 días (16,6%) ([cuadro 2](#)).

**CUADRO 2. Número (%) de receptoras preñadas luego de la transferencia de embriones PIV  
congelados/descongelados de 7 y 8 días de edad.**

**Number (%) of pregnant recipients after transfer of frozen/thawed Day-7 and Day-8 IVP embryos.**

Edad del embrión	Nº receptoras transferidas	Nº receptoras preñadas
7 días	45	16 (35,5) a
8 días	12 2	(16,6) b
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>18(31,5)</b>

a b: Porcentajes con letras diferentes  
dentro de una misma columna difieren  
significativamente ( $P<0,05$ )(Chi  
cuadrado test)

**DISCUSION**

Los resultados obtenidos indican que después de un período de 11 horas, transcurrido desde la obtención del primer ovario y el comienzo del cultivo de ovocitos para la maduración, es posible la producción de embriones por técnicas *in vitro* y obtener gestaciones.

El tiempo óptimo y temperatura para el transporte de los ovarios hasta el laboratorio y el comienzo de la

maduración de los ovocitos ha sido estudiado por [Yang y col. \(1990\)](#), quienes observaron que los ovarios pueden ser almacenados hasta 8 horas a 25°C sin una reducción en la tasa de fecundación o en la capacidad de desarrollar hasta estadio de blastocisto. En cambio, temperaturas extremas (4°C y 38°C) para el transporte de ovarios, resultaron en tasas de desarrollo embrionario menores a la obtenida con el mantenimiento a 23°C ([Shioya, 1993](#)). Existen resultados alentadores de PIV de embriones luego del almacenamiento de ovarios por 24 horas a 15 y 21°C (31% de blastocistos) ([Scherthaner y col., 1997](#)). Esto posibilitaría un mayor uso potencial de la PIV de embriones en programas comerciales, porque permitiría obtener ovarios de lugares más distantes del laboratorio. En nuestro trabajo, con un tiempo máximo de mantenimiento de los ovarios de 11 horas a 18-20°C, la tasa promedio de blastocistos seleccionados para la congelación a los 7 y 8 días de cultivo fue de 27,9% ([cuadro 1](#)) sobre el total de ovocitos colocados en cultivo para su maduración y fecundación.

Cada ovario contiene miles de ovocitos, pero con la tecnología corriente sólo una pequeña proporción del total de la población folicular puede ser utilizado. En este trabajo se obtuvieron 9,5 ovocitos/ovario. Estos resultados son similares a los obtenidos por [Katska y Smorag \(1984\)](#) y [Hamano y Kuwayama \(1993\)](#), quienes obtuvieron un promedio de 10,2 y 11,0 ovocitos/ovario respectivamente, utilizando el método de aspiración con jeringa. En cambio, [Gordon y Lu \(1990\)](#) obtuvieron 4,0 y 5,1 ovocitos/ovario empleando las técnicas de disección ovárica y aspiración respectivamente.

La tasa de PIV de embriones (blastocistos y blastocistos expandidos) de nuestro laboratorio utilizando el medio CR1 con aminoácidos fue similar a la obtenida por [Galli y Lazzari \(1996\)](#) quienes lograron un 28,5% de desarrollo utilizando un sistema de cultivo de embriones con medio SOF (Synthetic Oviduct Fluid) ([Takahashi and First, 1993](#)), suplementado con suero y sin células somáticas de soporte. Estos mismos autores no obtuvieron diferencias en la tasa de producción de blastocistos con otros sistemas empleados (cultivo en oviducto de oveja y cultivo con células epiteliales de oviducto bovino).

La mayor tasa de gestación fue obtenida con embriones de 7 días (35,5%). [Hasler y col. \(1995\)](#) obtuvieron tasas de preñez de 42 y 20% luego de la transferencia de un solo embrión congelado/descongelado de 7 y 8 días de edad respectivamente. Es difícil comparar estos resultados con los obtenidos en nuestro trabajo, debido a que aquellos autores realizaron la transferencia de embriones seleccionados (Grado I) después de la descongelación. En nuestro caso, luego de la descongelación, se realizó la transferencia de dos embriones por receptora (transferencia directa) sin observación previa.

En general, las tasas de gestación obtenidas con embriones PIV observadas en la literatura científica, son inferiores a las obtenidas por medio de la transferencia de embriones recuperados *in vivo* después de un tratamiento superovulatorio. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre embriones PIV e *in vivo* podrían explicar esa diferencia en viabilidad. Los embriones PIV presentan mayor sensibilidad al enfriamiento y congelación, menor número de células, mayor incidencia de anomalías cromosómicas, mayor resistencia a la protrusión y mayor contenido lipídico ([Massip y col., 1995](#)). Estos mismos autores sugieren que la criopreservación por procedimientos de vitrificación podrían ser más apropiados para los embriones PIV.

En conclusión, estos resultados indican que por cada vaca de rechazo se podría producir en promedio 0,82 gestación adicional después de la aplicación de esta tecnología. Además, estos datos demuestran que la producción de embriones por técnicas *in vitro* a partir de ovarios de vacas ovariectomizadas es una buena alternativa que podría ser considerada para preservar recursos genéticos y para uso comercial en programas de mejoramiento genético.

## RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la eficiencia de la producción *in vitro* (PIV) de embriones empleando ovocitos de vacas ovariectomizadas y determinar la tasa de preñez después de la transferencia

de embriones descongelados. Ciento veinte vacas Holando Argentino de alto valor productivo fueron ovariectomizadas en 6 sesiones de 18-25 vacas, utilizando un ovariotomo por vía vaginal. Los ovarios fueron transportados entre 18-20°C en solución salina con antibióticos durante 6 horas y procesados dentro de las 11 horas de comenzadas las ovariectomías. Los Complejos Cumulus-Ovocitos (CCOs) fueron aspirados de folículos antrales (2-8 mm de diámetro). Los CCOs fueron madurados en TCM 199 suplementado con 10% de suero de vaca en estro durante 22 horas. Luego de la maduración, los ovocitos fueron inseminados con semen descongelado y cultivados en medio CR1aa. A los 7 y 8 días después de la fecundación, los blastocitos y blastocitos expandidos de buena calidad fueron equilibrados en 1,5 M etilenglicol. Se colocaron dos embriones por pajuela de 0,25 ml y posteriormente fueron congelados. Los embriones descongelados fueron transferidos directamente a las receptoras. Un total de 57 vaquillonas lecheras fueron utilizadas como receptoras. El diagnóstico de preñez fue realizado por palpación rectal a los 55 días después de la transferencia.

La eficiencia en la PIV fue de 9,5 ovocitos y 2,7 embriones por ovario y la tasa total de preñez fue 31,5%. La tasa de gestación obtenida con embriones de 7 días (35,5%) fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) a la obtenida con embriones de 8 días (16,6%). Se concluye de estos resultados que por cada vaca de rechazo se podría producir 0,82 gestación adicional después de la aplicación de esta tecnología. Estos datos demuestran que la PIV de embriones a partir de ovarios de vacas ovariectomizadas es una buena alternativa para preservar recursos genéticos y para propósitos comerciales.

---

Aceptado: 28.03.2000.

## BIBLIOGRAFIA

- BRACKETT, B.G., D. BOUSQUET, M.L. BOICE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS, M.A. DRESSEL. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
- GALLI, C., G. LAZZARI. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 371-379.
- GORDON, I., K.H. LU. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87.
- HAMANO, S., M. KUWAYAMA. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology* 39: 703-712.
- HASLER, J.F. 1993. Applications of *in vitro* fertilization technology to infertile dairy cows. Proceedings 12th Annual Convention American Embryo Transfer Association, October 22-24, Portland, Maine, USA.
- HASLER, J.F., W.B. HENDERSON, P.J. HURTGEN, Z.Q. JIN, A.D. MC CAULEY, S.A. MOWER, B. NEELY, L.S. SHUEY, J.E. STOKES, S.A. TRIMMER. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- KATSKA, L., Z. SMORAG. 1984. Number and quality of oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7: 461-463.
- MASSIP, A., P. MERMILLOD, A. DINNYES. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10: 3004-3011.
- PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE, N.L. FIRST. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*

25: 591-600.

ROSENKRANS, C.F., N.L. FIRST. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72: 434-437.

SCHERNTHANER, W., F. SCHMOLL, G. BREM, K. SCHELLANDER. 1997. Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21°C does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology* 47: 297.

SHIOYA, Y. 1993. Calf production by *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *JARQ* 26: 287-293.

TAKAHASHI, Y., N.L. FIRST. 1993. *In vitro* culture of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 33-47.

YANG, N.S., K.H. LU, I. GORDON. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33: 352.