

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES A PARTIR DE DONANTES CUT

Noticias y Comentarios

Nº 618

Julio 2024 | ISSN Nº 0327-3059

Autores: Med. Vet. Amada Eugenia Ynsaurralde Rivolta, Med. Vet. Franco Dellavalle, Lic. Juan Manuel Benitez y Med. Vet. Domingo Aguilar

Introducción

La producción *in vitro* de embriones ha crecido constantemente en la última década, ya que permite incrementar el número de crías obtenidas durante la vida útil de las hembras. Para esto se obtienen ovocitos inmaduros o COCs (complejos cumulus ovocitos) de las hembras donantes mediante la técnica de aspiración folicular u ovum pick up (OPU) o a partir de ovarios recuperados de la industria frigorífica, para luego madurarlos, fecundarlos y cultivarlos en condiciones *in vitro* (FIV, fecundación *in vitro*) (Galli y col., 2001; Lonergan y Fair, 2008).

Una de las principales ventajas de la OPU es que puede realizarse sin necesidad de realizar la utilización hormonal en el manejo de la donante (Oliveira y col., 2016). No obstante, es posible que la cantidad y la calidad de los COCs recuperados estén sujetos a los factores endógenos inherentes al individuo como ser el estadio del ciclo estral en el que se encuentre la hembra al momento de la aspiración, el estado metabólico, o edad de la donante, o externos como la nutrición o manipulación de la actividad ovárica. En este contexto, en los sistemas productivos de cría bovina donde se utiliza como criterio de selección la fertilidad de la madre, expresado en la entrega de un ternero por año, las hembras CUT (cría ultimo ternero) representan nuestras hembras más fértiles y con mayor grado de adaptación al ambiente de producción. Lamentablemente, estas hembras cuentan con al menos 8 años de vida lo que la convierte en madres añosas o viejas. Esta ampliamente descripto como la fertilidad decrece en la hembra, determinando en gran parte disfunciones hormonales, y reducción en número y calidad de la reserva ovocitaria a nivel ovárica. Si bien, técnicas como la producción *in vitro* han facilitado el “rescate genético” de animales silvestres o domésticos de *Elite*, la tasa de

éxito esperada es aún desconocida cuando esta es aplicada en animales provenientes de rodeos comerciales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad en la eficiencia de producción de embriones bovinos *in vitro* cuando se utilizan como donantes hembras de añosas, CUT, provenientes de rodeos comerciales con 2 sistemas de recuperación de COCs.

Materiales y métodos

A fin de estudiar dicha variabilidad en ambos sistemas de recuperación de ovocitos se realizaron 2 experimentos. Se realizaron sesiones de FIV en las cuales, para el *Experimento 1*, se utilizaron COCs de ovarios obtenidos de matadero de 15 vacas CUT; y para el *Experimento 2*, se utilizaron COCs obtenidos por aspiración folicular, de 15 vacas CUT. Las vacas CUT utilizadas en este trabajo fueron identificadas mediante seguimiento de su historia productiva, marca líquida y pertenecientes a la unidad de cría de la EEA Mercedes.

Para la obtención de ovarios de matadero las vacas CUT fueron previamente identificadas en playa de faena y luego de la evisceración los ovarios fueron removidos del tracto y conservados a 38°C individualizados hasta su traslado al laboratorio. Posteriormente, los ovarios fueron lavados con agua tibia 25°C y se obtuvo el contenido de los folículos de entre 2 y 8 mm mediante aspiración con jeringa y aguja. El producto fue depositado en un tubo cónico de 15 ml y luego en una placa de 100 mm con medio TALP-Hepes para la búsqueda y clasificación de los COCs bajo lupa estereoscópica solo aquellos con al menos 3 capas de células de cúmulos compactas y citoplasma granulado homogéneo fueron sometidos a maduración en medio de maduración TCM199 (Tissue Medium Culture) durante 22 horas.

Para la obtención de ovocitos por aspiración folicular las vacas fueron previamente tranquilizadas y se realizó un bloqueo a nivel de la articulación sacro-coccígea (anestesia). Se realizó la aspiración folicular guiada por ultrasonografía de los ovarios a través de la pared vaginal.

El producto de la aspiración fue filtrado en filtros Emcon de 100 μ para la posterior clasificación de los COCs bajo lupa estereoscópica. En criterio de selección y protocolo de maduración fue similar al descrito anteriormente.

La fecundación *in vitro* (FIV) se realizó con medio de fecundación BO (Brackett y Oliphant, 1975) por 5hs con una concentración de 10×10^6 de espermatozoides. Los presuntos cigotos (ovocitos fecundados) fueron cultivados en SOF (fluido oviductal sintético) por 7 días. La maduración y cultivo se realizó en estufa de cultivo a 38 °C y 6,5% de CO₂ (atmosfera de dióxido de carbono).

Se registró el número total de COCs aspirados, el número de presuntos cigotos ingresados a cultivo (COCs cultivados), el número de embriones clivados (embriones que comenzaron a dividirse) a día 2 y de blastocistos a día 7 (embriones ya desarrollados, listos para ser transferidos).

Los resultados obtenidos en el *Experimento 1* se evaluaron mediante estadística descriptiva ya que al ser de matadero contamos con una única observación por animal. Se realizó un análisis de correlación de Pearson a fin de evaluar la asociación entre variables. En el *Experimento 2* los datos de número total de COCs recuperados, COCs cultivados, clivados y blastocistos se analizaron mediante una ANOVA ($p < 0.05$). Las medias fueron comparadas mediante un test de Duncan. Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson entre variables, como también se realizó un análisis de regresión para las variables número de COCs/número de blastocistos. Se realizaron entre 2 y 4 sesiones de aspiración por cada vaca, tomándose a cada vaca como unidad experimental. Aquellos animales que fueron aspirados en una sola oportunidad no fueron incorporados al análisis estadístico.

Resultados

Experimento 1. El número de total de COCs recuperados, cultivados, embriones clivados a las 48 h, blastocistos logrados como el porcentaje (%) de embriones clivados varió según la donante (Tabla 1). No se encontró correlación entre el número de COCs obtenidos y el porcentaje de Blastocistos logrados.

Tabla 1. Producción de embriones *in vitro* a partir de ovarios de matadero provenientes de madres individualizadas.

Vaca	COCs	Clivados (%)	Blastocistos (%)
8	4	1 (25)	0 (0)
10	7	2 (29)	1 (14)
15	8	7 (87)	2 (25)
2	9	7 (78)	5 (56)
9	10	0 (0)	0 (0)
3	14	9 (64)	6 (43)
4	21	11 (52)	7 (33)
5	22	18 (82)	8 (36)
13	23	19 (83)	2 (9)
7	25	5 (20)	3 (12)
11	25	5 (20)	0 (0)

14	27	21 (78)	13 (48)
6	40	14 (35)	8 (20)
12	40	10 (25)	3 (7)
1	47	24 (51)	10 (21)
Promedios:D.E.	21,47±19,19	10.20±7,52	4,53±4,02
MIN-MAX	4-47COCs	0-88%	0-56%

COCs: complejo cummulus ovocitos. Los datos se encuentran ordenados por número de ovocitos para facilitar su visualización y análisis. D.E.: desvío estándar.

Experimento 2. El número de COCs recuperados, ingresados a cultivo, el número embriones clivados a las 48 h, el número de blastocistos logrados como el porcentaje (%) de embriones clivados varió según la donante (Tabla 2).

En el porcentaje (%) de blastocistos no se encontraron diferencias, tal vez debido la gran variabilidad.

Se observó una alta y significativa correlación entre número de COCs cultivados y número de embriones clivados y blastocistos producidos (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficiente de correlación evaluado entre variables de producción.

Variables	Coeficiente de correlación
Cigotos cultivados/ número de embriones clivados	0.94*
Cigotos cultivados/ porcentaje de embriones clivados	0.35*
Cigotos cultivados/ número de blastocistos	0.85*
Cigotos cultivados/ porcentaje de blastocistos	0.39*
Porcentaje de embriones clivados/ porcentaje de blastocistos	0.47*

*Variables correlacionadas estadísticamente con un p-VALOR <0,005.

Tabla 2. Producción de embriones *in vitro* a partir de COCs obtenidos por aspiración folicular (OPU).

Vaca	N° sesiones de aspiración	COCs recuperados	COCs cultivados	Embriones clivados	Blastocistos	Embriones clivados %	Blastocistos %
1	2	10.5±4.9 abc	9±2.8abcdef	6.5±2.1abc	3±4.2ab	72±0.9abc	27.2±38.5
2	4	3.5±2.6c	3±2.2	2±1.4bc	0.5±1b	70.8±21abc	8.3±16.7
3	4	13.2±4.6 abc	9.5±5.6abcde	7.2±6.2abc	3.7±2.7ab	67.8±24.8abc	38.7±16.9
4	4	13.7±7.3 abc	10.2±5.3abcd	8.5±4.6ab	5.7±3.7a	81.6±10.2abc	53.1±13.5
5	4	6.2±2.2 abc	5.5±1.7bcdef	2.7±2.2bc	0.5±0.6b	72.2±9.6abc	25±21.5
6	2	13.5±6.4 abc	7.5±2.1abcdef	5.5±0.7abc	3±1.4ab	75±11.7abc	38.9±7.9
7	1	4±0	3±0	0±0	0±0	0±0	0±0
8	2	12±5.6 abc	11.5±4.9abc	7.5±6.36abc	6±5.6a	58.7±30abc	45.9±29.4
9	4	2.75±2.9c	1.75±2.2f	0.7±1.5c	0.5±1b	15±30d	10±20
10	4	11±12.8 abc	2.5±1ef	1±0.8c	0.2±0.5b	37.5±25cd	12.5±25
11	2	6.5±0.7 abc	4.5±0.7cdef	3±1.4bc	1±1.4ab	65±21.2abc	20±28.3
12	2	15±4.2abc	11±7.0abc	6.5±6.36abc	3.5±5ab	51±25bcd	0±0
13	2	3±1.4c	2.5±0.7ef	1.5±0.7bc	0±0	58.3±11.8abc	0±0
14	2	16±2.8ab	14±5a	11.5±2.1a	5±1.4ab	81.2±26.5abc	35.6±15
15	2	17.5±7.8a	12.5±6.36ab	7.5±4.95abc	3±4.24ab	57.3±10.4abc	17.6±25
16	2	6.5±0.7 abc	4.5±2.1cdef	4±1.4bc	1.5±2.1ab	91.6±11.8ab	25±35.4
17	4	4.5±3.9bc	3±1.6def	1.7±1bc	0.5±0.6b	65±27.4abc	30±47.6
18	1	16±0	14±0	8±0	5±0	57±0	35.7±0
19	1	2±0	2±0	1±0	0±0	50±0	0±0
20	2	6.5±2.1 abc	6.5±2.1bcdef	6.5±2.1abc	1.5±0.7ab	100±0a	26.2±19.4
21	2	13±2.8 abc	10±4.2abcde	8.5±3.5ab	1.5±0.7ab	85.1±0.8ab	18.1±14.8
22	1	3±0	2±0	2±0	0±0	100±0	0±0
Promedios:D.E.	2,45	9,06±5,12	6,82±4,22	4,70±3,27	2,07±2,02	0-100%	0-53,10%
MIN-MAX	1-4	2-17	1-14	0-14	0-6		

Mediante un análisis de regresión encontramos una relación lineal entre el número de ovocitos cultivados y el número de blastocistos logrados, quiere decir que a medida que aumenta el número de ovocitos ingresados a cultivo aumenta el número de embriones logrados (Figura 1).

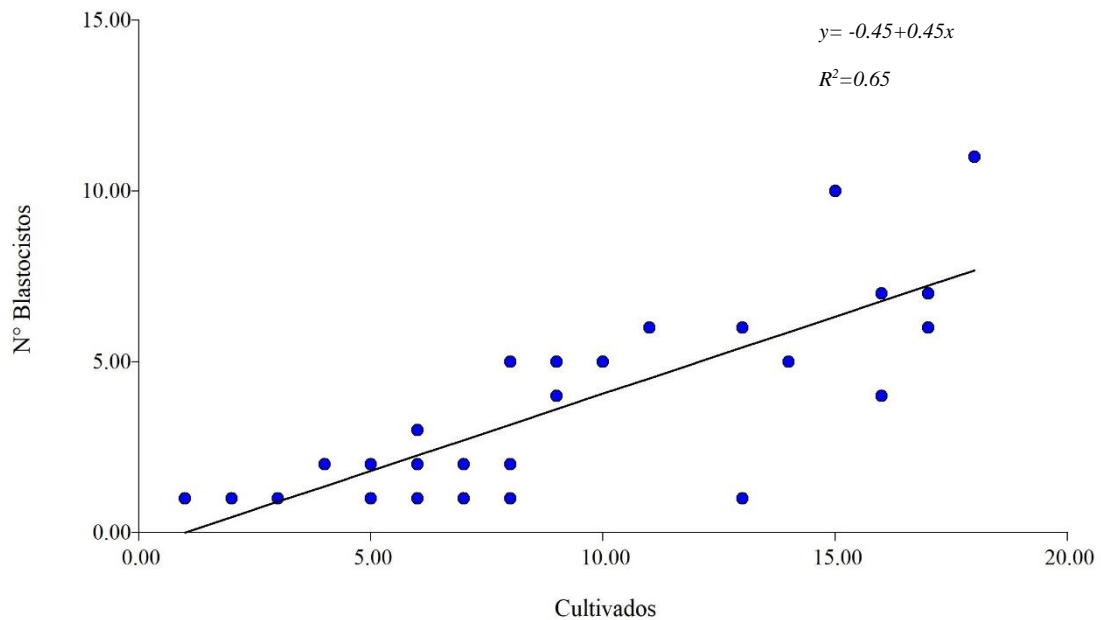


Figura 1. Diagrama de dispersión entre embriones cultivados y número de blastocistos logrados.

Finalmente, para determinar un posible punto de corte en el número de COCs recuperados en función de la eficiencia de producción de embriones se establecieron rangos con escala de 5 COCs (Figura 2), y se determinó la presencia de efecto del número de COCs cultivados sobre el porcentaje de blastocistos logrados.

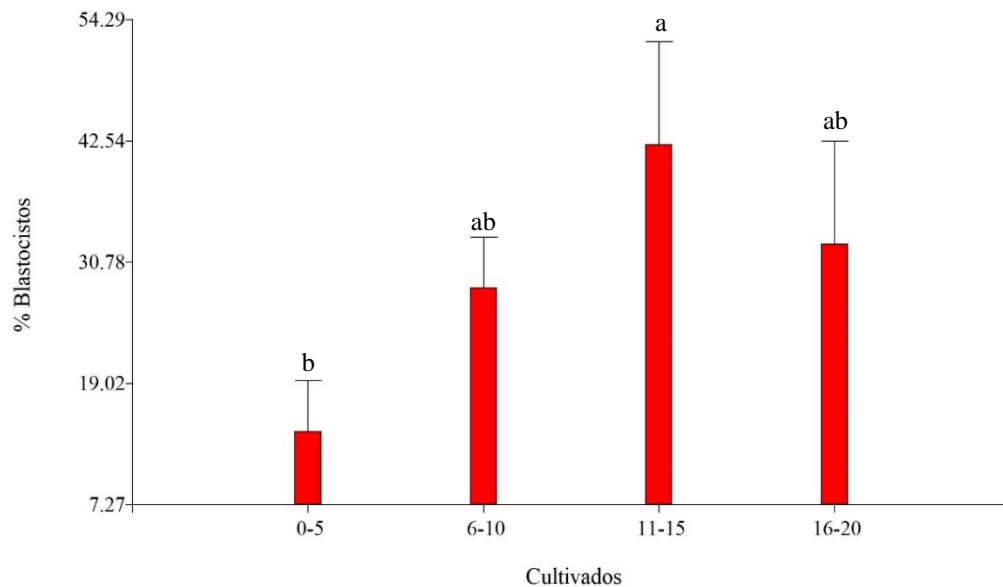


Figura 2. Producción de embriones bovinos *in vitro* clasificada por rangos de COCs cultivados.

Como se puede observar en la Figura 2 en los casos donde se cultivan 6 o menos ovocitos el porcentaje de blastocistos logrados se ve reducido significativamente. En este trabajo, se han obtenido un bajo número de COCs por OPU respecto a la aspiración directa de ovarios de matadero, evidenciándose de igual manera la gran variabilidad individual observada. La diferencia en la recuperación se debe meramente a la técnica donde mediante la aspiración directa de ovarios podemos visualizar y acceder a la totalidad de la población folicular sin recaudos de generar daño en la corteza o estroma. La baja tasa de recuperación por OPU probablemente se deba a la fase del ciclo estral en la que se encuentra al momento de realizarse la aspiración folicular (crecimiento folicular/atresia) (Adams 1999) o la disminuida capacidad para reclutar folículos regulado por mecanismos hormonales causado por la edad de la donante lo que condiciona no solo la cantidad sino además la calidad de los COCs obtenidos (Hendriksen y col. (2000). Numerosos trabajos han reportado que los COCs de hembras añosas son menos competentes que aquellos provenientes de hembras en edad productiva. Se debe recordar que las hembras nacen con una determinada población folicular, de la cual cierto número es reclutado en cada ciclo estral y, por lo tanto, cualquier tipo de daño durante vida de la hembra es acumulativo.

Por otra parte, existen herramientas para intentar incrementar estos resultados. Investigadores como Ongaratto y col. (2015) han logrado incrementar el número de COCs viables recuperados mediante estrategias como la sincronización de la onda folicular con protocolos basados en progestágenos, estrógenos y prostaglandinas.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos concluimos que cuando se produce embriones por fecundación *in vitro* a partir de vacas CUT existe una amplia variabilidad de eficiencia que va desde un 0 hasta un 50%, Por otra parte, existe una clara relación entre el número de COCs recuperados y la tasa de producción de blastocistos. En el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la EEA Mercedes nos encontramos trabajando para incrementar estos índices.

Bibliografía

Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J Reprod Fertil Suppl. 54:17-32. PMID: 10692842.

Brackett BG, Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod., 12(2):260-274

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology, 55(6):1341-1357

Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology. Jan 1;53(1):11-20. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00236-8. PMID: 10735058.

Lonergan P, Fair T. 2008. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. Theriogenology, 69(1):17-22

Oliveira LH, Sanches CP, Seddon AS, Veras MB, Lima FA, Monteiro PLJ Jr, Wiltbank MC, Sartori R. 2016. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro embryo production in Holstein cows. J Dairy Sci., 99(11):9307-9312

Ongaratto F.L., Rodriguez-Villamil P., Tribulo A., Bó G.A. 2015. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. Anim Reprod, vol.12, n4, p.876-883