



UBA
Universidad de Buenos Aires

SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.
www.fvet.uba.ar



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires



SUPERVIVENCIA DE EMBRIONES BOVINOS VITRIFICADOS, DESARROLLO *IN VITRO* Y PORCENTAJE DE PREÑEZ

Bioquímica de las Gametas y Embriones

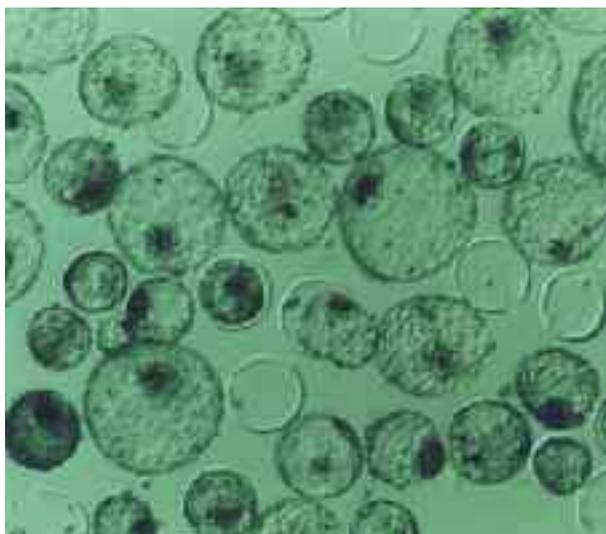
Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA)

Facultad de Ciencias Veterinarias - UBA

Introducción

Aunque la criopreservación de embriones bovinos es una técnica bien conocida y ha sido ampliamente utilizada comercialmente, todavía sus resultados son de aproximadamente de 50% de viabilidad. La vitrificación podría convertirse en una alternativa para la producción *in vitro* de embriones debido a que se obtienen en gran número, en el mismo momento y puede no disponerse de receptoras sincronizadas, pero aún no se utiliza rutinariamente en la especie bovina.

La vitrificación consiste en incubar las células en soluciones que contienen altas concentraciones de crioprotectores, seguido por un enfriamiento ultra-rápido, resultando un estado vítreo sin formación de cristales de hielo. Los métodos de vitrificación actuales conducen a resultados muy variables, tal vez debido a las diferencias en la composición de las soluciones de vitrificación o las técnicas utilizadas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la vitrificación de mínimo volumen en embriones bovinos producidos *in vitro* sobre las tasas de viabilidad y preñez.



Trabajo realizado

Los ovarios bovinos se obtuvieron de un matadero, fueron transportados al laboratorio, los complejos ovocito-cumulus fueron recuperados por aspiración de los folículos antrales (2 a 5 mm de diámetro) y cultivados en medios de maduración por 22 horas.

La fecundación *in vitro* se realizó con semen congelado-descongelado de un toro Holstein de fertilidad probada capacitado con heparina. A las 48 hs se determinó la cantidad de ovocitos que se dividieron en 2 células o más (embriones). La proporción de blastocistos producidos se determinó en el día 7 luego de la fertilización.

Todos los blastocistos fueron vitrificados y descongelados por el método de mínimo volumen (Cryo Tech Lab®). Brevemente, se equilibraron en una solución que contiene etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) en MEM durante 10 a 15 minutos. Luego transferidos a la solución de vitrificación que contiene además sacarosa y fueron colocados en un delgado dispositivo de congelamiento (cryotec) con el que ingresan directamente al nitrógeno líquido. Para descongelar el dispositivo se sumerge en un medio a 37° C que contiene sacarosa en MEM, luego en medios de dilución y lavado.

De la fertilización *in vitro* se obtuvieron 109 blastocistos de día 7. La evaluación de la viabilidad se realizó sobre 77 blastocistos con la técnica fluorescente de FDA (diacetato de fluoresceína) resultando los 77 vivos con una fluorescencia verde brillante (100% de viabilidad).

El resto de los blastocistos producidos *in vitro* (n=32) fueron descongelados en la granja y transferidos a 32 vaquillonas receptoras sincronizadas de la siguiente manera: en el día 0, se les colocaron dispositivos intravaginales (CIDR; Bioniche Animal Health Canada Inc., Belleville, ON, Canadá) y 1 mg de cipionato de estradiol + 100 mg de progesterona. En el Día 8, se retiraron

los CIDR y las vaquillonas recibieron 25 mg de dinoprost. 24 h después (día 9), recibieron 0,5 mg de ECP im considerando el día 10 arbitrariamente como el día del estro y el día 17 se transfirieron los embriones. Se realizaron ecografías transrectales para el diagnóstico de preñez 35 días después, resultando 15 preñadas (46,8%). De esas 15 preñeces se obtuvieron 11 terneros sanos (33,3%).



Conclusiones

Mediante la metodología empleada de vitrificación ha sido posible obtener los mismos resultados que regularmente se obtienen utilizando embriones frescos, comparando los valores a campo citados en publicaciones internacionales.

El uso extendido de esta metodología se traducirá en grandes ventajas para el campo de la embriología de los animales domésticos y la reproducción ya que transforma la realidad actual del 50-60% de viabilidad de embriones criopreservados, a una nueva realidad de embriones 100% vitales para ser transferidos a vacas receptoras. Esta técnica abre el camino de una amplia aplicación de la criopreservación en todas las fases del desarrollo del embrión preimplantatorio en los bovinos y otras especies mamíferas.

Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado Universidad de Buenos Aires. Agradecemos a JICA (Agencia Japonesa de Cooperación Internacional) por la transferencia de tecnología y equipos, Frigorífico Deltacar por el suministro de ovarios, Laboratorios Astra por el agua ultra pura utilizada en los experimentos, ETC Internacional por el suministro de insumos y materiales plásticos.