

## Capítulo LXXX

### Producción de embriones *in vivo* e *in vitro* utilizando novillas Gyr lechero como donadoras

Rumualdo González Fernández

---

En la actualidad existen dos métodos para la producción de embriones en bovinos, los mismos han sido conocidos como *in vivo* e *in Vitro*. Ambos métodos han tenido como principal objetivo incrementar de forma más acelerada la descendencia de donadoras elite para conformar rebaños genéticamente superiores.

La producción *In vivo* de embriones es lograda a través de la superovulación, inseminación artificial y el posterior lavado no quirúrgico del útero de las donadoras para la obtención de los embriones. Este método es también conocido por sus siglas en inglés como MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*). La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una tecnología que requiere inicialmente de una fuente primaria de oocitos, los cuales son generalmente obtenidos por aspiración folicular transvaginal (OPU) de las hembras seleccionadas como donadoras o mediante aspiración folicular de ovarios procedentes de matadero. Los oocitos recolectados después de la selección son sometidos a un proceso de maduración, el cual será seguido de su fertilización y por el posterior desarrollo de los cigotos generados hasta lograr alcanzar el estadio embrionario de mórula o blastocisto. Todo este proceso es llevado a cabo a nivel de laboratorio de allí su denominación "*In-vitro*", el cual es identificado a nivel internacional con las siglas OPU-PIVE.

El método MOET aún cuando fue la primera tecnología desarrollada para producir embriones, su utilización todavía continua vigente. Esto se debe a su menor costo y a una mayor tasa de preñez después de la transferencia embrionaria en comparación con el sistema OPU-PIVE. Por el contrario, el método OPU-PIVE ofrece la ventaja de poder ser repetido con intervalos cortos entre sesiones de 7 a 15 días, lo que permite lograr más embriones y preñeces comparado con el método MOET, el cual requiere de un periodo de descanso mayor de 45 días, entre dos procedimientos consecutivos (Ponte *et al.*, 2009). El objetivo de este Capítulo fue desarrollar un Programa Genético de mejora productiva en un rebaño tropical adoptando los métodos MOET y OPU-PIVE para mostrar los resultados de superovulación y producción de embriones, a la vez que evaluar la tasa de preñez obtenida luego de su transferencia de los em-

briones utilizando novillas Gyr lechero como donadoras, en una zona tropical (28-32° C de temperatura).

## **PROGRAMA DE DESARROLLO GENÉTICO DE LA RAZA GYR LECHERO EN EL ESTADO ZULIA**

### **Manejo de las hembras donadoras**

Como donadoras de oocitos y embriones se utilizó un grupo de 27 novillas Gyr lechero de 340kg de peso vivo promedio y una condición corporal entre 3,0 y 3,5 en una escala de 1-5. Inicialmente se procedió a evaluar la actividad ovárica de cada donadora por palpación rectal y ultrasonografía; todas las novillas seleccionadas como donadoras habían mostrado un tracto genital desarrollado y ovarios cíclicos, que las capacitaba para ser sometidas a un programa OPU-PIVE y posteriormente, a una sesión MOET. Los animales fueron mantenidos bajo pastoreo y se les suministró sales minerales, agua fresca *ad libitum* y una suplementación de 2kg de alimento concentrado/animal/día.

### **Producción *in-vitro* de embriones (PIVE)**

**Aspiración folicular:** Antes de iniciar la aspiración folicular (OPU = *ovum pick-up*), los animales fueron sometidos a una adecuada inmovilidad, lavado y desinfección del tren posterior. A continuación, se aplicó una dosis de anestesia epidural con 4cc de lidocaína al 2%. Para la OPU se utilizó un procedimiento previamente descrito (Seneda *et al.*, 2001; Pontes *et al.*, 2009). Los ovarios y sus folículos visibles fueron ubicados utilizando un equipo de ultrasonido en tiempo real modo B (Aloka® UST – 5541-75), con transductor convexo de 7,5Mhz que contaba con su respectiva guía transvaginal.

Los folículos visibles fueron punzados y los oocitos aspirados utilizando un catéter desechable 16G × 1,70mm (Jelco®, Smiths Medical, USA), el cual estuvo conectado a través de una sonda fina a un tubo cónico colector de 50ml (Corning®, Acton, USA). La aspiración folicular fue realizada por medio una bomba de vacío (WTA® Biotecnología, S. Paulo, Brasil) con una presión negativa de 12-15ml/min. El medio de colección fue una solución salina fisiológica (0,9% de cloruro de sodio), suplementada con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®, Life technologies, USA), 10μl/ml de sulfato de gentamicina (Schering-Plough, USA) y 5.000UI/Lt de heparina sódica (Gland Pharma Ltda. Hyderabad).

El material aspirado de cada donadora fue pasado a través de un filtro colector (Agtech, USA) con el fin de concentrar los complejos-cúmulus-oocitos (COCs). A través de un estereomicroscopio, los COCs fueron clasificados de acuerdo con los siguientes parámetros: *calidad 1*, con más de tres capas de células de cumulus; *calidad 2* con menos de dos capas de células del cumulus; *calidad 3*, aquellos oocitos desnudos sin células del cumulus, y *calidad 4*, oocitos en estado de atresia o con citoplasma en degeneración.

### **Maduración *in-vitro* (MIV)**

Una vez clasificados los COCs, se procedió a su lavado y disposición para el proceso de MIV. La maduración se realizó durante un periodo de 24h a 38,8°C, en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, en medio TCM-199 (Gibco®, Life technologies, USA); el medio estaba suplementado con 10% SFB (suero fetal bovino), 5µg de hormona Luteinizante (LH- Ayerst®, Rouses Point, NY, USA), 0,5µg de hormona folículo estimulante (FSH- Folltropin®, Vetrepharm, Belleville, Ontario, Canadá), 1µg de estradiol (Estradiol® 17β Sigma, USA), 2,2µg piruvato (Piruvate®, Sigma, USA) y 50µg/ml de sulfato de gentamicina.

### **Fecundación *in-vitro* (FIV)**

Para la FIV de los óvulos desarrollados, se procedió a la descongelación de una pajueta de semen sexado introducida en agua a una temperatura de 35°C por 20 segundos. El semen fue lavado y centrifugado en gradientes de Percoll 90% y 45% a 13000rpm por 5 minutos. Los espermatozoides fueron capacitados usando heparina (30µg/ml) y su motilidad fue estimulada por adición de 40µl/ml de PHE. Seguidamente se procedió a la fertilización de los oocitos en medio TL Semen suplementado con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma® USA), 5,5µg de piruvato, 44µl/ml de una solución de PHE y 11µl/ml de heparina.

### **Cultivo *in-vitro* (CIV)**

A los presuntos cigotos, 20 h después de la inseminación les fue removido parcialmente el cumulus de células mediante pipeteo. Finalmente, los embriones después de tres lavados consecutivos en presencia de medio de fertilización fueron cultivados a 38,5°C en aire con 5% CO<sub>2</sub> utilizando gotas del medio de cultivo CR4 suplementado con BSA.

Las estructuras embrionarias resultantes fueron clasificadas de acuerdo a las normas internacionales de la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones) y posteriormente empacadas en pajuelas de 0,25ml para la transferencia de los embriones a tiempo fijo (TETF) en receptoras previamente sincronizadas.

## **PRODUCCIÓN *IN VIVO* DE EMBRIONES (MOET)**

### **Superovulación de donadoras**

Las novillas donadoras cíclicas, con presencia de un cuerpo lúteo fueron tratadas el día 0 (cero) con un dispositivo intravaginal de progesterona (DIB® Syntex, Buenos Aires, Argentina) más 2,0mg de benzoato de estradiol (Estrosol, Farmaveca, Venezuela). Entre los días 5 y 7 se inyectaron con FSH (Pluset®, Calier, Barcelona, España) dos veces diaria en dosis decreciente de 70, 60 y 40 UI (dosis total de 170UI). El día 8 se inyectó eCG (Folligon, Intervet, Unión Europea), 200 UI, am y pm (dosis total 400 UI). El día 7 pm las mismas donadoras recibieron 150mcg de Cloprostenol® (Veteglan®, Calier, Barcelona, España). El día 8 am GnRH (5,0cc im de Conceptal, Intervet), i.m. complementado pm con otra dosis 2,0cc Veteglan im, al tiempo que fue removido el dispositivo La inseminación artificial (IA) fue realizada a tiempo fijo a

las 12 y 24h después de haber removido el dispositivo (DIB) empleando semen congelado convencional de toros de raza Gyr. Seis días después de la IA, es decir 24h antes de la recolección no quirúrgica de los oocitos, se procedió a evaluar la respuesta ovárica mediante conteo del número de cuerpos lúteos y/o folículos anovulatorios mediante ultrasonografía.

### **Recolección y evaluación morfológica de los embriones**

La recolección de los embriones fue realizada una semana después de la inseminación artificial utilizando un catéter de Foley de dos vías fr 18 y balón 5,0cc. Después de una adecuada inmovilidad del animal utilizando un brete mecánico, se procedió al lavado y desinfección del tren posterior de las novillas, seguido de la aplicación de una anestesia epidural con 4,0-5,0cc de lidocaína 2%.

El catéter después de traspasar el cérvix fue emplazado en el cuerpo del útero con el fin de realizar el lavado simultáneo de ambos cuernos. Un volumen de 1.000ml de un medio especial Vigro Complete Flush® (Bioniche, USA) fue empleado para el lavado. Los embriones recuperados fueron colectados sobre un filtro de separación (Agtech, USA). Finalizado el proceso de recolección, las donadoras recibieron 300mcg de Veteglan® con el objeto de inducir la luteolisis.

El concentrado de líquido residual presente en el filtro fue vertido en placas de petri 100x100mm para luego proceder a la búsqueda microscópica de los embriones mediante una lupa estereoscópica 40x. Las diferentes estructuras embrionarias identificadas fueron depositadas en placas de petri 35mm, conteniendo medio de mantenimiento Vigro Holding® (Bioniche, USA). La evaluación y clasificación morfológica de los embriones fue realizada de acuerdo a los criterios de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Los embriones grado I, II y III fueron considerados transferibles (ET), y los embriones grado IV fueron clasificados como no transferibles (degenerados) al igual que los óvulos no fertilizados.

### **Técnica de Transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)**

Los embriones obtenidos tanto de producción *In vivo* como *In vitro* fueron transferidos en novillas receptoras mestizas (cebú x razas lecheras) según procedimiento previamente descrito (González, 2008). Para la sincronización se utilizó un dispositivo intravaginal (Pregnaheat-E®, VIATECA, Venezuela) más 2ml im de benzoato de estradiol (BE) y 1ml im de prostaglandina PGF<sub>2</sub>α (Veteglan, Calier, Barcelona) como tratamiento inicial (día 0). El dispositivo fue retirado el día 8 aplicando en ese momento 400UI de eCG (Folligon, Intervet, Venezuela) más 1ml de Veteglan y 0,5mg de Cipionato de Estradiol (Pharmacia & Upjon, Kalamazoo USA). Seis días después de finalizado el tratamiento de sincronización se procedió a evaluar ecográficamente los ovarios, para identificar la presencia y calidad de los cuerpos lúteos (CL) en ambos ovarios. Al siguiente día (día 7) se llevó a cabo la transferencia de los embriones los cuales fueron depositados individualmente en el cuerno ipsilateral al CL de cada receptora.

Luego de 35 días de la transferencia convencional del embrión, se realizó el diagnóstico precoz de preñez de las receptoras por medio de la ecografía de ultrasonido, siendo confirmado el resultado de la evaluación mediante palpación rectal a los 60 días.

### Resultados y comentarios

Los datos que aparecen en el Cuadro 1 corresponden a los primeros resultados de producción tanto de embriones *In vivo* como *In vitro* obtenidos de un lote de donantes novillas Gyr lechero en el estado Zulia, Venezuela.

**Cuadro 1**  
**Producción *In vivo* e *In vitro* de embriones en novillas Gyr lechero y tasa de preñez por transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)**

| Técnica         | N° de Sesiones | Embriones |               | Tasa de Preñez         |          |
|-----------------|----------------|-----------|---------------|------------------------|----------|
|                 |                | N°        | Promedio Vaca | Embriones Transferidos | % Preñez |
| <i>In vivo</i>  | 28             | 119       | 4,2           | 101                    | 37,6     |
| <i>In vitro</i> | 34             | 101       | 2,9           | 101                    | 28,7     |

En relación a la producción *In vivo* de embriones obtenidos a través del procedimiento MOET se lograron 119 embriones para un promedio de 4,2 embriones transferibles (ET) por donadora colectada. De 101 embriones transferidos a tiempo fijo se obtuvieron 38 preñeces lo que representa un porcentaje de 37,6% de efectividad. Esta tasa de preñez puede considerarse algo inferior a la reportada recientemente por Pontes *et al* (2009) de 45,6% utilizando embriones cebuínos. Probablemente la condición corporal y/o la fertilidad de las novillas receptoras haya podido influir en estos resultados de preñez.

Con respecto a la producción *in-vitro* de embriones de un total de 34 sesiones OPU-PIVE se lograron 101 ET, para un promedio de 2,9 ET por cada hembra aspirada. De 101 embriones transferidos a tiempo fijo se obtuvieron 29 gestaciones lo que representa una tasa de preñez efectiva de 28,7%. Este valor preliminar de preñez utilizando embriones producidos *In vitro* puede considerarse como aceptable ya que se encuentra dentro del rango de los porcentajes de preñez reportados entre 25 y 35%, en diversos estudios utilizando embriones FIV con semen sexado hembra en ganado Gyr (Ferreira *et al.*, 2009).

Estos resultados demuestran las posibilidades de potenciar los programas de mejora genética utilizando las biotecnologías de punta y las ventajas de utilizar semen sexado en las ganaderías mestizas en el medio tropical.

### AGRADECIMIENTOS

Al equipo de investigación que participó en el desarrollo de este trabajo: Prof. Juan Carlos Gutiérrez, de la Unidad de Investigación en la Reproducción Animal (UNIRA), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Al Mé-

dicoVeterinario Nelson Sánchez, de la Empresa Venezolana de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones (VIATECA) y a los Médicos Veterinarios Johana Cruz y Esvaldo Villasmil de la Empresa Agropecuaria del Sur, C.A.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ferreira MBD, Lopez BC, Vasconcelos AB, Barbosa CP, Ribeiro SHA, Garcia JM. 2009. Influencia da idade de doadoras da raça Gir leitero na produção in-vitro de oocitos e embriões. XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Abstr.

González R, Ávila G. 2008. Vacas doble propósito en anestro utilizadas como receptoras en programas de trasplante de embriones a tiempo fijo, En: Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito. C González-Stagnaro, N Madrid-Bury, E Soto-Belloso (Eds). Ediciones Astro Data, Venezuela. LXIV: 769-772.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sánchez BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology 71 (4): 690-697.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. Anim Reprod Sci. 67: 37-43.