



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



INITRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

LA VITRIFICACION DE OVOCITOS POR SISTEMA DE MÍNIMO VOLUMEN, MÉTODO POTENCIAL PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE LA GAMETA FEMENINA EN BOVINOS

Cynthia Gutnisky, Sergio Morado, Tomás Gadze, Antonella Donato y Pablo Cetica.
Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), INPA-CONICET, Cátedra de Química Biológica.

Introducción

La producción de ganado vacuno es una de las explotaciones más importantes de nuestro país, siendo la de mayor relevancia en la producción pecuaria. Las biotecnologías asociadas a la reproducción permiten obtener mayores progresos genéticos y disminuir la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, entre otras aplicaciones.

La vitrificación es una biotecnología que permite la criopreservación de ovocitos y embriones. Consiste en el enfriamiento ultra rápido utilizando soluciones con alta concentración de sustancias crioprotectoras que evita la formación de cristales de hielo. Sin embargo, estas altas concentraciones de crioprotectores producen daño celular principalmente por su toxicidad y su efecto osmótico.

Esta biotecnología está siendo utilizada ampliamente con éxito para la criopreservación de ovocitos y embriones humanos en las clínicas de fertilidad, habiendo desplazado en la práctica al congelamiento lento. En el bovino todavía no es utilizada de forma rutinaria, a pesar de que se ha demostrado que mejora la sobrevida embrionaria luego de la criopreservación respecto al congelamiento lento tradicional.

En lo que respecta a la vitrificación de ovocitos en especies de producción, incluyendo al bovino, los resultados obtenidos no son satisfactorios. Debido al proceso de vitrificación se han descrito

alteraciones en el citoesqueleto, incrementos en la concentración de calcio intracelular y endurecimiento de la zona pelúcida; así como también daños a nivel mitocondrial que incluyen alteraciones en su distribución y función. Por otro lado, algunas de estas anormalidades podrían ser reversibles dependiendo del tiempo de recuperación luego del atemperado.

Con el objetivo de disminuir estos daños, los medios, dispositivos y métodos de vitrificación han ido evolucionando. Entre los más recientes, los métodos de vitrificación con volúmenes muy reducidos de muestra son lo que prometen resultados más alentadores. En estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo hemos evaluado la vitrificación de ovocitos bovinos por el método de mínimo volumen Cryotech® analizando su recuperación morfológica, vitalidad y capacidad de ser fecundados *in vitro*.

Trabajo realizado

Los complejos ovocito-cumulus (COCs) bovinos se obtuvieron a partir de ovarios provenientes de vacas de faena. Se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs con cumulus denso y compacto. La maduración *in vitro* se realizó en medio 199 suplementado con suero fetal bovino y gonadotropinas (FSH y LH). Al finalizar la maduración, los ovocitos fueron desnudados y divididos en dos

grupos: a) control y b) vitrificados / atemperados (según especificaciones del kit y capacitación de Cryotech® para uso humano).

Los ovocitos vitrificados fueron evaluados en su morfología y vitalidad inmediatamente luego de su atemperado al recuperar su volumen normal (0 horas), cuando se presume su recuperación metabólica (3 horas) y al tiempo que se correspondería con el necesario para la formación de pronúcleos postfecundación (21 horas). Los controles fueron ovocitos no vitrificados, evaluados a los mismos tiempos. La morfología se valoró bajo microscopio óptico con contraste interferencial-diferencial según Hofmann y la vitalidad mediante la técnica del fluorocromo acetato de fluoresceína.

Para la fecundación *in vitro* (FIV) los COCs madurados fueron divididos en tres grupos: a) COCs sin denudar (control FIV), b) ovocitos parcialmente denudados (control) y c) ovocitos parcialmente denudados vitrificados/atemperados. Los diferentes grupos fueron coincubados con semen congelado de fertilidad probada y se determinó el porcentaje de fecundación *in vitro* por el clivaje embrionario a dos o más células a las 48 horas.

Resultados

Hemos observado que los ovocitos madurados *in vitro* con cumulus oophorus, denudados y luego vitrificados, recuperaron su volumen inicial a los pocos minutos del atemperado. Más del 94% de los ovocitos mantuvieron su morfología normal, conservando la integridad y definición de la membrana plasmática y la zona pelúcida, reconstituyendo el espacio perivitelino y presentando un citoplasma homogéneo. La morfología normal también se mantuvo a las 3 y a las 21 horas de cultivo.

Concomitantemente con los resultados obtenidos en la evaluación morfológica, más del 94% de los ovocitos bovinos permanecieron vitales luego del proceso de vitrificación/atemperado a los diferentes tiempos evaluados.

El porcentaje de fecundación *in vitro* observado en los ovocitos parcialmente denudados, vitrificados y luego atemperados disminuyó con respecto a los ovocitos parcialmente denudados frescos (control) ($p < 0,05$). El porcentaje de fecundación *in vitro* en los COCs sin denudar (control FIV) fue superior a los otros dos grupos ($p < 0,05$) y con un valor acorde a una buena tasa de clivaje según la bibliografía (Tabla 1).

PRODUCTOS AGROGANADEROS S.R.L.

PAMA REPRODUCCIÓN ANIMAL

especialistas en
REPRODUCCIÓN ANIMAL
con más de **15 años** de experiencia

GUZMAN SRL

30 años ayudando al cuidado de la salud animal!

ECM CHISON BoviScan

Línea de Ecógrafos
Portátiles para Repro - OPU - Carne - Doppler Color

PRODUCTOS AGROGANADEROS S.R.L.
Tel/Fax: (011) 4983 2979 / Tel: (011) 4982 5411
pagroganaderos@speedy.com.ar / www.pro-agroganaderos.com.ar

GUZMAN SRL
Tel: (011) 5263 2083 / www.facebook.com/guzman.srl
ventas@guzmansrl.com.ar / www.guzmansrl.com.ar

Tabla 1. Porcentaje de fecundación *in vitro*.

	COCs sin denudar	ovocitos parcialmente denudados frescos	ovocitos parcialmente denudados vitrificados - atemperados
Porcentaje de fecundación <i>in vitro</i>	80% ^a	58% ^b	28% ^c

^{a, b, c} Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos (p<0,05).

Perspectivas

Acorde a los datos obtenidos podemos concluir que luego del proceso de vitrificación de ovocitos bovinos por método de mínimo volumen Cryotech® y posterior atemperado, la gran mayoría de los mismos recupera su morfología normal y su vitalidad, manteniéndose ambas por un lapso prolongado del tiempo. Esto es un gran avance sobre otros métodos de vitrificación en los que la morfología y/o la vitalidad de los ovocitos se ve comprometida en mayor grado. Además se observó que los ovocitos bovinos vitrificados / atemperados por el método Cryotech® tienen la capacidad de ser fecundados *in vitro* por los espermatozoides, aun-

que la tasa de fecundación es inferior a la de los ovocitos frescos. Esta disminución podría en parte deberse a cambios metabólicos que se producen durante el proceso de vitrificación, ya que la morfología y viabilidad del ovocito bovino no se afectaría mayormente por este método.

Mucho queda aún por recorrer en la mejora del proceso de vitrificación de la gameta femenina en las especies de interés zootécnico, pero el camino, aunque parezca largo, no necesariamente sea imposible de hacerlo.



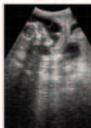
Easi-Scan Curve Applications



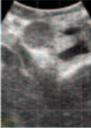
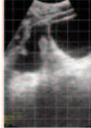


Mayor profundidad

- Mayor profundidad de exploración.
- Mejor visualización de preñeces avanzadas.
- Determinación de preñez Mayor ángulo de visión.
- Modos de trabajo 8 12 16 24 cm de profundidad.

Preñez día 37 CRL de 96 días

Cuern. uterinos CL Cotteildones en 24 Cm

Portátil robusto y confiable

- Montado a su cintura permite mantener las dos manos libres.
- Evita tensión en el cuello los hombros y la espalda.
- Sonda fija, estanco y durable.
- Diseñado para trabajo a campo.



Excelente calidad de imagen

- 60mm de sonda, de Radio 60°, 128Elementos.
- Amplio campo de visión - profundidad 24 cm
- con 40 cuadros/seg y 16 canales nos permite ver sin retrasos en la imagen.

Smart Display



Bugs (Gafas)



Remote Display



Introducer



Valija



www.allvet-tv.com.ar

AllVet

Tecnología Veterinaria

ventas@allvet-tv.com.ar Tel: 11 3970 2888

Movistar: 116171 2892

PregAll

EL NUEVO UMBRAL REPRODUCTIVO
PARA **IATF**.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



PregAll es la primera progesterona inyectable de liberación controlada con resultados comprobados. Esto significa un cambio radical y revolucionario en la sincronización de celo para **IATF**.

Ahora vos tenés el tiempo en tus manos, tan simple, tan exacto y con todo el poder reproductivo para tus rodeos. Sincronizá con precisión **PregAll**.