

FISIOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN

FR 01. FERTILIZACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS RECOLECTADOS DE VACAS CEBÚ POSTMORTEM

Adriana Fernández, Pedro Bastidas y Juan Trocóniz

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Apartado Postal 4563, Maracay, Estado Aragua, Venezuela

Abstract

In vitro fertilization of oocytes collected postmortem from zebu cows

Studies were conducted to establish and validate an *in vitro* fertilization system (IVF) at the Institute of Animal Reproduction and A.I., Faculty of Veterinary Sciences, Central University of Venezuela. Oocytes (n=748) were aspirated from different size follicles collected from ovaries of Zebu cows, from the 748 oocytes, 344 had cumulus cells while the remaining (404) were denuded oocytes. The maturation media utilized was TCM-199. A study included the oocyte TCM199 media culture supplemented with 0.8 µg/mL of GnRH (n=360) and a control group (n=388) without GnRH. Frozen semen from bulls of renown fertility was used and capacitated with heparin (10µl/mL). There were statistical differences ($P < .05$) in the fertilization rates of oocytes matured in the GnRH enriched media (75 %) as compared to the control group (64 %). Additionally, there was not a significant effect ($P > .05$) due to the presence or absence of cumulus cells. Overall these results indicate that the IVF system employed was effective allowing an overall mean of 70 % for fertilization rate across replicates. Result of these studies also indicate that the IVF technique developed and validated utilizing an homologous system allowed for incorporating a laboratory methodology for predicting semen potential fertility of bulls from different breeds.

Palabras claves: Fertilización *in vitro*, cebú, postmortem, GnRH.

Key words: *In vitro* fertilization, zebu cattle, postmortem, GnRH.

Introducción

La tecnología de la Fertilización *in vitro* (F.I.V.) ofrece una nueva dimensión en reproducción animal, que supera la inseminación artificial y trasplante de embriones, proporcionando al investigador una herramienta valiosa que en combinación con el trasplante de embriones, amplía las tecnologías aplicadas disponibles en reproducción animal.

En Venezuela, no se han reportado trabajos de fertilización homóloga *in vitro* en bovinos, y es importante destacar que la utilización de tecnologías *in vitro* han comenzado a ser herramientas de rutina en muchos laboratorios con propósitos de investigación. Esta técnica biotecnológica tiene aplicaciones inmediatas en la clonación, producción de animales transgénicos y para la producción en gran escala de embriones para el mejoramiento genético de las poblaciones bovinas.

El objetivo del presente trabajo fue establecer y validar una técnica de F.I.V. homóloga en bovinos en el Laboratorio del Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela a partir de ovocitos recolectados de ovarios de vacas cebú postmortem.

Materiales y métodos

Un total de 748 ovocitos fueron aspirados de folículos de diferentes diámetros de ovarios de vacas y novillas cebú postmortem. De los 748 ovocitos, 344 estaban rodeados de las células del cumulus y 404 ovocitos no presentaban células del cumulus (desnudos). Se maduraron en el medio TCM-199 suplementado con estradiol, suero fetal bovino y gonadotropina coriónica humana equilibrado en una atmósfera con 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂. Un total de 360 ovocitos se maduraron en el medio suplementado con 0.8 µg/mL de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y 388 ovocitos se maduraron en su ausencia. Semen congelado procedente de cuatro toros de fertilidad comprobada fue capacitado con heparina (10 µL/mL).

Resultados y discusión

Los resultados de este estudio indican que se estableció una técnica eficiente de F.I.V. homóloga, lográndose

una tasa de fertilización del 70 % (522/748), la cuál no estuvo influenciada ($P > .05$) por la presencia o ausencia de las células del cumulus rodeando al ovocito. Este resultado coincide con investigaciones realizadas por Behalová y Greve (1993) y Chian *et al.* (1994), quienes sugieren que las células del cumulus no son necesarias para la maduración nuclear y penetración *in vitro* de los ovocitos bovinos, pero la presencia de las células del cumulus afectan significativamente la formación del pronúcleo masculino y su subsecuente desarrollo.

Cuadro 1. Tasa de fertilización alcanzada durante el ensayo.

		Nº de ovocitos (n)	Tasa de fertilización (%)
Tipo de ovocito	con células del cumulus desnudo	344	67
		404	74
Medio de maduración	con GnRH	360	75
	sin GnRH	388	64

Por el contrario, el análisis estadístico nos indica que hubo diferencia significativa ($P < .05$) en la tasa de fertilización (75 % vs. 64 %) a favor del grupo de ovocitos que se maduró en presencia de GnRH. Investigaciones demuestran que la GnRH y agonistas de la GnRH incrementan la tasa de fertilización y división embrionaria *in vitro* (Funston y Seidel, 1995). Dichos autores utilizan la GnRH en el medio de fertilización. En nuestro experimento la GnRH fue utilizada en el medio de maduración, resultando en un incremento en la tasa de fertilización comparado al experimento control posiblemente debido a la unión de la GnRH a su receptor, presente en las células de la granulosa.

Conclusiones

En este trabajo, se logró establecer una técnica de F.I.V. homóloga bovina, para la producción de embriones bovinos *in vitro* con futuros fines de investigación y aplicación práctica (potencial fertilizante de semen congelado). Los resultados de este trabajo de investigación demuestran la factibilidad de la implementación, desarrollo y validación de la técnica de F.I.V. en el laboratorio de Biotecnología del I.R.A.I.A. de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

La adición al medio de GnRH al medio de maduración mejora la tasa de fertilización, siendo necesario más estudios para confirmar la presencia de receptores en las células de la granulosa y la acción de la GnRH en la maduración de los ovocitos bovinos.

En conclusión, las técnicas *in vitro*, donde existe una fuente económica de ovocitos y posible producción de embriones, son de considerable valor con fines de investigación y para el desarrollo de nuevas biotecnologías.

Literatura citada

- Behalová, E. y T. Greve. 1993. Penetration rate of cumulus enclosed versus denuded bovine eggs fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 39: 186.
- Chian, R. C., K. Niwa y M. A. Sirard. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1499-1508.
- Funston, R. N. y G. E. Seidel. 1995. Gonadotropin-Releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53: 541-545.