

PRIMEROS TERNEROS PRODUCIDOS *IN VITRO* TRAS PUNCIÓN ECOGUIADA DE FOLÍCULOS OVÁRICOS

FIRST CALVES OBTAINED BY OVUM PICK-UP AIDED BY ULTRASOUND AND *IN VITRO*
FERTILIZATION

Hidalgo, C.O.¹, I. Fernández¹, P. Duque¹, N. Facal¹, E. Díaz¹, J.M. Prendes², J. Menéndez³,
E. Gómez¹, L. Prieto¹ y C. Díez^{1*}

¹SERIDA-CENSYRA. Camino de los Claveles 604. Somió. 33203 Gijón. España.

²Cooperativa de Agricultores del Concejo de Gijón. Roces. Gijón. España.

³ASCOL. Polígono de ASIPO. Cayés. España.

*Correspondencia. E-mail: mcdiez@serida.org

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Aspiración de ovocitos. FIV. Vitrificación.

ADDITIONAL KEYWORDS

IVF. Vitrification.

RESUMEN

Se describe la puesta a punto de la aspiración transvaginal de ovocitos combinada con técnicas de producción de embriones *in vitro* (OPU-FIV). Se ensayaron dos sistemas de maduración (con EGF o con células VERO) y dos tipos de cultivo (SOF y cocultivo con células VERO + B2). Se obtuvieron 6,8 ovocitos/sesión/vaca de los que 5,8 fueron aptos para maduración. La presencia de células VERO permitió el desarrollo embrionario hasta blastocisto. Los blastocistos obtenidos en día 7 tras cultivo en SOF (16,7 p.100) o en cocultivo con células VERO (26,9 p.100) fueron similares. Los porcentajes de gestación a 21 días tras la transferencia de embriones frescos fueron del 66,6 y 37,5 p.100 respectivamente ($p>0,05$), pero sólo los embriones producidos en cocultivo con células VERO dieron lugar a nacimientos (33,3 p.100). No hubo diferencias en las tasas de gestación a 21 días entre embriones congelados (71,4 p.100) y vitrificados (46,4 p.100). Sólo produjeron naci-

mientos los embriones vitrificados (20 p.100). Se han obtenido los primeros terneros nacidos en España por transferencia de embriones frescos y vitrificados producidos por OPU-FIV.

SUMMARY

We report several experiments looking for an optimisation of the *in vitro* embryo production combined to repeated ovum pick-up (OPU-IVF). For this purpose, we tested two *in vitro* maturation protocols (with EGF and with VERO cells) and two culture systems (SOF and VERO cells + B2). We obtained 6.8 oocytes/session/cow from which 5.8 were selected for maturation. *In vitro* maturation with VERO cells permitted oocytes to develop up to the blastocyst stage. Day 7 blastocyst rates after culture in SOF (16.7 percent) were similar to those obtained after culturing with VERO cells (26.9 percent). Day 21 pregnancy

rates after transfer of fresh embryos produced in SOF or in co-culture with VERO cells were 66.6 and 37.5 percent respectively ($p > 0.05$); however, only embryos produced in co-culture allowed to the birth of calves (33.3 percent). We did not find differences between day 21 pregnancy rates after transfer of frozen (71.4 percent) and vitrified embryos (46.4 percent). Only vitrified embryos allowed to obtain calves (20 percent). As a result, we have obtained the first calves after transfer of fresh and vitrified embryos produced by OPU-IVF in Spain.

INTRODUCCIÓN

Imperativos económicos obligan a los criadores a optimizar el potencial reproductivo de las vacas reduciendo el tiempo entre partos e incrementando el número anual de terneros, lo que justifica el desarrollo de biotecnologías como la multiovulación y transferencia embrionaria (MOET) o la fecundación *in vitro* (FIV).

La utilización de técnicas MOET implica el tratamiento con hormonas gonadotrópicas, aumentando hasta 10 veces el número de ovocitos liberados por ciclo (Hanzen y Goffin, 1998). Este método no está exento de inconvenientes, como son: repetibilidad limitada (media de 5 veces por vaca y año); incremento del tiempo de espera necesario para obtener una gestación y riesgo de reacciones yatrogénicas, quistes ováricos o infecciones uterinas.

El método MOET no aprovecha al máximo el potencial genético femenino: sólo un centenar de embriones a lo largo de la vida del animal a partir de la reserva ovocitaria, estimada en 100000 ovocitos (Hanzen y Goffin, 1998). Todo ello, unido a la continuidad del creci-

miento folicular en forma de ondas, explica el desarrollo de técnicas de recuperación de ovocitos y producción de embriones *in vitro*.

La recuperación de ovocitos de hembras vivas se realiza por punción transvaginal ecoguiada (Ovum Pick Up: OPU) pues la laparoscopia es poco utilizada por ser muy invasiva.

La OPU combinada con la producción de embriones *in vitro* (OPU-FIV) origina mayor número de embriones por donante y unidad de tiempo, al permitir recoger ovocitos 2 veces por semana durante dos meses consecutivos (Donnay *et al.*, 1996). Además, la OPU se puede aplicar durante los 3 primeros meses de gravidez a novillas o vacas y a novillas prepúberes, lo que permite reducir el intervalo generacional (Kruip *et al.*, 1993). Finalmente, OPU-FIV permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios (Looney *et al.*, 1994). Aspectos que son importantes para acelerar la mejora genética (Rath 1993; Kruip *et al.* 1994; Looney *et al.* 1994; Bungartz *et al.* 1995).

El principal problema de la técnica es la baja supervivencia embrionaria tras la congelación/descongelación, lo cual restringe su aplicación a la transferencia en fresco. Son susceptibles de mejora el número de ovocitos de buena calidad obtenidos por sesión, y el número y calidad de blastocistos que generan, así como la adaptación de los métodos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* a las condiciones específicas de la OPU: reducido número de ovocitos y afectación de su calidad, asincronía en su grado de maduración y elección de diferentes

toros según la genética de la donante.

Este trabajo pretende establecer las condiciones idóneas de maduración y cultivo para la producción de terneros tras la transferencia de embriones obtenidos por OPU-FIV y la adaptación de un sistema de criopreservación adecuado a embriones producidos *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS*

ANIMALES

Grupos de 4 novillas de raza Asturiana de los Valles no superovuladas se sometieron a 2 sesiones semanales de OPU a intervalos alternativos de 72 y 96 horas durante 16 semanas.

A cada animal, de pie en un potro de contención, se le tranquilizó con xilacina i.m. al 2 p.100 (Rompún®, 0,25 ml/100 kg PV). Los esfuerzos expulsivos se redujeron mediante una anestesia epidural baja con 4 ml de lidocaína al 2 p.100 (Xilocaína Ovejero®).

SISTEMA DE PUNCIÓN

Los folículos ováricos se visualizaron con sonda ecográfica convexa Medison Co.(Korea) PB-06VE65/20BD de 6,5 MHz de frecuencia, conectada en paralelo a un ecógrafo Sonovet SA 600. Por la guía de la sonda se introdujo una aguja de punción desechable (V-OPAN-1760, de bisel intermedio, Cook Veterinary Products, Australia) unida a un tubo de teflón (diámetros interno y externo: 1,6 y 3,2 mm respectivamente) por una conexión Luer. En el extremo opuesto del tubo se dispuso un tubo cónico de

50 ml (Corning Inc., USA) al que, mediante una bomba de vacío V-MAR-5100 (Cook Veterinary Products), se aplicó una aspiración constante de 85 mm de Hg (equivalente a un flujo de aspiración de 14 ml de agua/min). El tubo de recogida se mantuvo a 37 °C mediante un calentador (V-FTH-2012, Cook Veterinary Products).

Antes de iniciar la sesión de punción se aclaró el sistema aspirando una pequeña cantidad de medio de recogida (MR: TCM199 –Invitrogen, Paisley, Scotland + 25mM Hepes + 0,4g/l BSA Fraction V + 10 UI/ml heparina). Mediante desplazamiento del ovario y/o la sonda se ajustó la posición de los folículos a puncionar (diámetro > 2 mm), visibles como zonas anecogénicas, sobre el trayecto de la aguja.

RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Inmediatamente después de la punción de cada vaca, el contenido de los tubos de recogida se aclaró con Ovum Culture Medium (OCM: PBS + 1g/l glucosa) + 5 p.100 de suero fetal bovino (FCS) a través de un filtro (EmCon, Comextrade, Tarragona, España) y se pasó a una placa de Petri para buscar los CCOs que, localizados, se lavaron 4 veces en medio de mantenimiento (MM: TCM 199 + 25 mM Hepes + 0,4 g/l BSA) y se evaluó su calidad (60x) según los criterios de Donnay *et al.* (1996). A continuación se lavaron 2 veces en medio de maduración y se pasaron al tratamiento de maduración.

MADURACIÓN, FECUNDACIÓN Y CULTIVO *IN VITRO*

Experimento 1. En una primera aproximación los CCOs se maduraron *in vitro* en TCM 199 + 2,2 g/l NaHCO₃

*Salvo especificación todos los reactivos fueron suministrados por Sigma (St Louis Mo, USA).

+ 10 p.100 FCS + 10 ng/ml de Epidermal Growth Factor (EGF) durante 22-24 h a 39 °C, 5 p.100 de CO₂ en aire y 90 p.100 de humedad. Los CCOs maduros se incubaron con espermatozoides móviles separados por swim-up (2×10^6 esp/ml) en Fert-TALP+10 ml/mg heparina durante 18 h (Parrish *et al.*, 1984). Los presuntos cigotos se cultivaron *in vitro* (CIV) en Synthetic Oviduct Fluid (SOF, Holm *et al.*, 1999) al que se añadió un 5 p.100 FCS a las 66 h post-FIV. El CIV se realizó a 39 °C, 5 p.100 de CO₂, 5 p.100 O₂ y 90 p.100 de humedad.

Experimento 2. Los CCOs se maduraron en TCM199 + 10 p.100 FCS + 1 µg/ml FSH + 5 µg/ml LH + 1 µg/ml 17 β-estradiol + 100 µM cisteamina, en cocultivo con células VERO durante 22-24 h a 39 °C, 5 p.100 de CO₂ en aire y 90 p.100 de humedad. El procedimiento para la fecundación fue el mismo que en el experimento anterior. Para el cultivo *in vitro*, se utilizaron dos sistemas:

Grupo SOF: SOF (Holm *et al.*, 1999) al que se añadió un 5 p.100 de FCS 66 h post-FIV. El CIV se realizó a 39 °C, 5 p.100 de CO₂, 5 p.100 O₂ y 90 p.100 de humedad.

Grupo VERO: cocultivo en células VERO + B2 + 2,5 p.100 FCS (Menck *et al.*, 1997). El CIV se realizó a 39 °C, 5 p.100 de CO₂ y 90 p.100 de humedad.

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS VERO

Se descongelaron alícuotas de entre 4 y 5×10^6 células. El contenido del criotubo se centrifugó con 9 ml de M199Hepes + 0,4 g/l BSA a 2000 rpm durante 5 min. Se eliminó todo el

sobrenadante. El *pellet* de células se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo (MC: M199 + 2,2 g/l NaHCO₃ + 10 p.100 FCS). Se calculó la concentración celular con cámara de Thoma.

En placas de 4 pocillos se prepararon microgotas de 50 µl a las que se añadieron 10^3 células/microgota. Transcurridas 72 h de la siembra, se renovó todo el medio. El MC utilizado para la siembra se sustituyó por B2 + 2,5 p.100 FCS 24 h antes de la puesta en cultivo de los embriones. A partir de este momento, se renovó a diario la mitad de la microgota.

CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN

Blastocistos y blastocistos expandidos de día 7, de calidad excelente o buena, procedentes del Experimento 2 se congelaron según el protocolo de Voelkel (1992) o se vitrificaron (Kaidi *et al.*, 1999).

Congelación. Tras realizar dos lavados en OCM + 20 p.100 FCS, se transfirieron los embriones a una solución de OCM + 20 p.100 FCS + 10 p.100 etilenglicol, donde se equilibraron durante 10 min. a temperatura ambiente. Los embriones se cargaron en pajuelas de 0,25 ml (IMV, Francia) que se situaron en el biocongelador (Bio-Cool II, FTS Systems Inc.) a -7 °C. Tras 5 min. se indujo el *seeding* con unas pinzas superenfriadas y 5 min. más tarde se inició la congelación, a un ritmo de 0,3 °C/min., hasta -35 °C, momento en que se introdujeron las pajuelas en nitrógeno líquido (N₂L).

Para la descongelación, la pajuela se mantuvo 5 seg. al aire y 10-15 seg. en baño de agua a 30-35 °C. El embrión se transfirió directamente a la

receptora.

Vitrificación. Las soluciones de vitrificación empleadas fueron:

VS1: OCM + 20 p.100 FCS + 10 p.100 glicerol

VS2: OCM + 20 p.100 FCS + 10 p.100 glicerol + 20 p.100 etilenglicol

VS3: OCM + 20 p.100 FCS + 25 p.100 glicerol + 25 p.100 etilenglicol

Se lavaron los embriones 2 veces en OCM + 20 p.100 FCS y se pasaron a solución VS1 durante 5 min. Posteriormente se transfirieron a solución VS2 donde permanecieron otros 5 min. Por último, los embriones se pasaron a solución VS3 y se cargaron inmediatamente en la pajuela (tiempo total de permanencia en VS3: 30 seg.); el resto de la pajuela se rellenó con una columna de galactosa 1M. La pajuela se dispuso horizontalmente en una gradilla en vapores de nitrógeno durante 2 min. y después se sumergió en N₂L.

La desvitrificación se realizó manteniendo la pajuela 5 seg. al aire y 10 seg. en un baño de agua a 20 °C. En una placa de Petri se vació su contenido, y se homogeneizaron las columnas de VS3 y galactosa agitando suavemente. Los embriones se incubaron durante 5 min. en esta solución y después se lavaron en OCM + 20 p.100 FCS (5 min.). Tras un último lavado en OCM + 20 p.100 FCS se cargaron en la pajuela para su transferencia.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Diecisiete blastocistos de calidad excelente o buena, procedentes del experimento 2 (9 del grupo VERO + B2, y 8 del grupo SOF) se transfirieron

en fresco a otras tantas receptoras sincronizadas (1 embrión/receptora; día celo: día 0) en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. La sincronización se realizó mediante la administración de una o dos dosis (espaciadas 11 días) de PGF2a.

Por otro lado, 44 blastocistos (obtenidos tras maduración en células VERO y cultivo en células VERO + B2) se congelaron o vitrificaron y, tras la descongelación, se transfirieron a 22 receptoras sincronizadas (2 embriones/receptora; 7 receptoras para embriones congelados y 15 receptoras para embriones vitrificados).

El día 21 se analizaron los niveles de progesterona sérica (P4) (gestación positiva: niveles de P4 > 2ng/ml) mediante ELISA (Ovucheck Plasma, Vetoquinol Diagnostics, Alcobendas, España). El diagnóstico de gestación por ultrasonografía transrectal se realizó en día 60.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el programa S.A.S. los datos se sometieron a ANOVA de una vía y los diferentes estadios de desarrollo analizados se consideraron variables independientes.

RESULTADOS

NÚMERO Y CALIDAD DE LOS CCOs

El análisis correspondiente a 16 sesiones OPU consecutivas/vaca permitió recoger una media de 6,8 ovocitos/vaca/sesión, de los cuales 5,8 se seleccionaron para su puesta en maduración (calidades 1, 2 y 3). Como se puede observar en la **figura 1**, se apreció una amplia variabilidad en el número

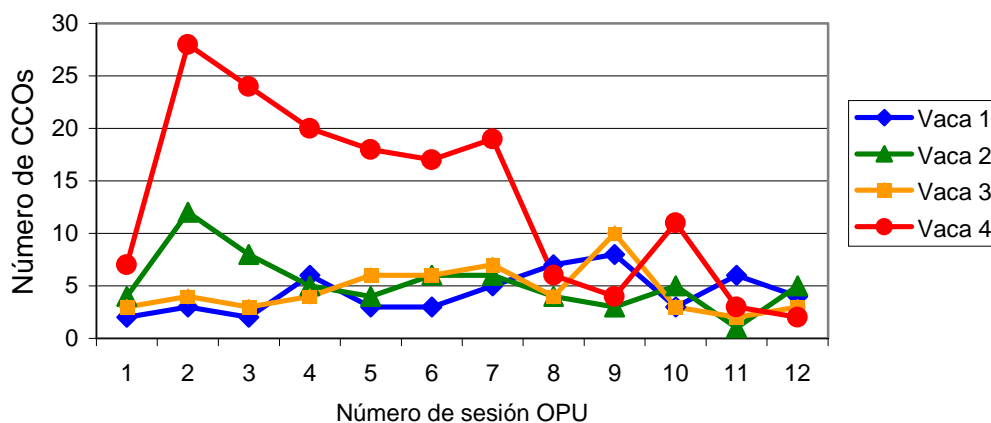


Figura 1. Número de complejos cumulus-ovocito (CCOs) obtenidos por donante a lo largo de la experiencia. (Cumulus-oocyte complex/donor/session obtained during the experience).

ro de CCOs obtenidos por donante y sesión (entre 0 y 28 CCOs).

DESARROLLO EMBRIONARIO

En el Experimento 1 la maduración de los CCOs en presencia de EGF y su posterior cultivo en SOF + FCS no permitieron obtener blastocistos. El porcentaje de división a las 72 h. fue del 50 p.100, y sólo un 10 p.100 de los cigotos cultivados alcanzó la fase de mórula.

Las tasas de desarrollo obtenidas en el experimento 2 se presentan en la **tabla I**. El sistema de cultivo no produjo diferencias significativas en cuanto al desarrollo embrionario, aunque se observó una tendencia al incremento de blastocistos en el grupo cultivado en presencia de células VERO.

La supervivencia *in vivo* de los blastocistos obtenidos en el experimento 2, se presenta en la **tabla II**. La tasa de gestación de los embriones producidos en SOF + FCS a los 21 días fue del 66,6 p.100, mientras que en el

caso de los embriones cocultivados en células VERO fue de 37,5 p.100. A 60 días, la gestación, tras diagnóstico ultrasonográfico, fue de 33,3 p.100 en el grupo VERO, mientras que no se diagnosticaron gestaciones en el grupo de SOF + FCS. En noviembre de 2000 tuvo lugar el nacimiento del primer ternero en España procedente de la transferencia de un embrión producido *in vitro* a partir de ovocitos obtenidos por OPU (**figura 2**).

Los resultados de gestación tras la transferencia de embriones congelados o vitrificados, se presentan en la **tabla III**. Los índices de gestación a los 21 días para los embriones congelados o vitrificados fueron respectivamente 71,4 p.100 y 46,4 p.100. El día 60, sólo se confirmaron gestaciones en el grupo de receptoras que recibieron embriones vitrificados.

En enero de 2001 nació la primera ternera producida en el país tras OPU-FIV y vitrificación/desvitrificación.

PRIMEROS TERNEROS TRAS OPU-FIV

Tabla I. Desarrollo embrionario de CCOs tras MIV en presencia de células VERO y cultivo en SOF o VERO. (Embryo development of CCOs matured with VERO cells and cultured in SOF or with VERO cells).

Cultivo	n	R	p.100 división	p.100 5-8 c.	p.100 mórulas D6	p.100 blastocistos D7
SOF	31	5	76,5±7,0	38,6±4,9	32,5±7,9	16,7±8,9
VERO	56	9	71,9±7,1	49,4±5,3	31,9±8,0	26,9±8,6

n: número de ovocitos; R: réplicas; p.100 5-8 c: embriones de 5-8 células en Día 3. Los datos expresan Medias±SEM. No se encontraron diferencias significativas (p>0.05).

DISCUSIÓN

La obtención de ovocitos a partir de hembras vivas por OPU es una herramienta de control reproductivo que se ha desarrollado rápidamente, y está ampliamente instaurada en Francia, Holanda, Canadá o EEUU. Se desarrolló en ganado vacuno para obtener ovocitos de forma repetida a partir de vacas de alto valor genético (Kruip *et al.*, 1993), y acortar el intervalo

generacional en programas de cría (Brogliati *et al.*, 1996).

Mientras que el uso de la tecnología convencional de producción de embriones bovinos por técnicas MOET permite que una hembra donante sea capaz de producir un promedio de 5 embriones viables cada 2 meses, la realización de sesiones repetidas de aspiración asegura un promedio de 20 embriones viables en el mismo periodo de tiempo (Donnay *et al.*, 1996). La OPU permite también la obtención de embriones a partir de hembras con nula o mala respuesta a los tratamien-

Tabla II. Supervivencia in vivo de blastocistos madurados en presencia de células VERO y cultivados en células VERO o en SOF. (Pregnancy rates after the transfer of blastocysts matured with VERO cells and cultured in SOF or with VERO cells).

CIVReceptoras	Número de Gestaciones (p.100)		
	P4 test	Diagnóstico ultrasonográfico	
	D21	D60	Nacidos
SOF	8	6 (66,6)	0
VERO	9	3 (37,5)	3 (33,3)

No hubo diferencias significativas (p>0.05).



Figura 2. Pelayo, primer ternero nacido en España tras la aplicación de la técnica OPU-FIV. (Pelayo was the first calf obtained in Spain after OPU-FIV).

Tabla III. Supervivencia in vivo de blastocistos madurados en presencia de células VERO y cultivados en células VERO + B2, congelados o vitrificados. (Pregnancy rates after the transfer of frozen or vitrified blastocysts matured and cultured with VERO cells).

C	R	Número de gestaciones (p.100)		
		P4 test	Diagnóstico ultrasonográfico	Nacidos
		D 21	D60	
Congelación	7	5 (71,4)	0	0
Vitrificación	15	7 (46,4)	3 (20)	3 (20)

R= número de receptoras; C= Criopreservación. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$).

tos de superovulación. Así, Looney *et al.* (1994) comprobaron que el rendimiento de la OPU-FIV en términos de blastocistos transferibles fue similar entre animales que no respondieron a tratamientos de superovulación y hembras que ciclaban con normalidad. Finalmente, es posible la obtención de ovocitos tras punción de hembras gestantes sin que se produzcan interferencias en el intervalo interpartos, incluso con estimulación hormonal (Meintjes *et al.*, 1993 y 1995).

Factores intrínsecos a la técnica que influyen sobre el rendimiento final son: material ecográfico, sistema de aspiración, características de la aguja (ecogenicidad, diámetros externo e interno y bisel), presión de aspiración, experiencia del operador y frecuencia de aspiración (Hanzen y Goffin, 1998). Existe además una fuerte influencia materna sobre el número y calidad de los ovocitos obtenidos por sesión (Kruip

et al., 1994; Gibbons *et al.*, 1995). Su capacidad para dar blastocistos tras fecundación y cultivo *in vitro* está fuertemente influida por elementos maternos almacenados en el ovocito (Quinton *et al.*, 1999).

Deben combinarse adecuadamente todos los parámetros para aspirar el mayor número posible de folículos evitando la pérdida de ovocitos y la utilización de procedimientos que lesionen los CCOs (Hanzen y Goffin, 1998).

Este trabajo permite comprobar que el número de ovocitos recogidos/sesión/vaca (6,8) es muy superior al aportado por Donnay *et al.* (1996) (3,9) y Quinton *et al.* (1999) (4,3). No obstante, la cifra está dentro de los límites normales para Looney *et al.* (1994) y Kruip *et al.* (1994). Por su parte Quinton *et al.* (1999) comprobaron una gran variación individual entre donantes (entre 0 y 18 ovocitos por sesión/donante), cifras confirmadas por nuestros datos (**figura 1**). Tampoco la raza de la donante (Looney *et al.*, 1994; Kruip *et al.*, 1994) parece tener efecto sobre el número de ovocitos obtenidos.

El incremento del número de ovocitos/sesión/animal podría pasar por la estimulación hormonal de la donante, o la realización de las sesiones de OPU durante determinadas fases del ciclo estral (Machatkova *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, del total de ovocitos recuperados, se eliminaron los de calidad 4 y el resto fue puesto en maduración, esto es, un 84,8 p.100 se consideró apto para el protocolo *in vitro*, cifra ligeramente superior a la obtenida (72 p.100) por Donnay *et al.* (1996) y que se explica por la utilización por nuestra parte de los CCOs de calidad 3 (CCOs rodeados de menos

de 3 capas de células del *cumulus*). La utilización de un protocolo de maduración y cultivo con células VERO, sugirió, como después se observó, que CCOs de esta calidad podrían desarrollarse hasta la fase de blastocisto, aunque nuestro porcentaje de CCOs aptos para puesta en cultivo se mantiene dentro de los límites considerados como normales (Kruip *et al.*, 1994).

Los ovocitos que maduraron en presencia de EGF y fueron posteriormente cultivados en SOF mostraron una capacidad de desarrollo limitada y no se obtuvieron blastocistos. Sin embargo, cuando la maduración se realizó en presencia de células VERO, los porcentajes de división se elevaron hasta valores superiores al 70 p.100, independientemente del medio de cultivo empleado. La producción de mórulas en día 6 fue similar en ambos grupos y los porcentajes de blastocistos en día 7 fueron de 16,8 p.100 para los embriones cultivados en SOF y del 26,9 p.100 para los cocultivados en células VERO. Aunque las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas, la tendencia al incremento de la producción de blastocistos al cultivar los embriones en células VERO concide con los resultados de Fancsovits *et al.* (1998). Posiblemente, la presencia de células, en maduración y en cultivo, podría contrarrestar los efectos negativos del sistema de obtención: número reducido de ovocitos o cigotos por grupo y peor calidad provocada por el proceso de aspiración y condiciones ambientales en que se realiza la técnica.

Aunque numerosos equipos utilizan protocolos de MIV que incorporan EGF al medio (Carolan *et al.*, 1994; Donnay, *et al.*, 1996) nuestros resultados mues-

tran que las condiciones de trabajo pueden modificar los resultados de un protocolo. La no obtención de blastocistos tras maduración en presencia de EGF podría ser debida a una diferente calidad de los CCOs de partida, o al reducido número de CCOs por manipulación. La utilización del medio de maduración usado de forma rutinaria en nuestro laboratorio en presencia de células VERO, tuvo un efecto beneficioso sobre la capacidad de desarrollo de los CCOs, independientemente del sistema de cultivo.

No obstante, los porcentajes finales de blastocistos fueron siempre inferiores a los conseguidos en experiencias realizadas con ovocitos obtenidos de ovarios de matadero (datos propios). Es posible que la alta concentración de heparina empleada en el medio de recogida tenga un efecto negativo sobre la capacidad de desarrollo del ovocito. La heparina es necesaria para evitar la formación de coágulos que engloben los CCOs, pero las concentraciones recomendadas oscilan entre 2 y 5 UI/ml, aconsejándose que el tiempo de contacto con los ovocitos no supere 1 hora (Hanzen y Goffin, 1998). En nuestro caso, 5 UI/ml resultaron insuficientes en las manipulaciones iniciales, por lo que se dobló la cantidad y se intentó reducir al máximo el tiempo de permanencia de los CCOs en el tubo de recogida, lo que permitió una buena tasa de recuperación de ovocitos.

El sistema ideal para evaluar la calidad de un embrión es su capacidad para dar lugar a una gestación una vez transferido a una hembra receptora. Los porcentajes de gestación tras transferencia en fresco de embriones producidos *in vitro* (EPIV) son ligera-

mente inferiores a los obtenidos a partir de embriones *in vivo*, y oscilan en torno al 40 p.100: los sistemas de cultivo *in vitro* inducen una serie de anomalías que se traducen en una merma de las tasas de gestación, diferentes sensibilidades a la criopreservación o sobrepeso de los terneros al nacimiento (Farin *et al.*, 2001).

Los resultados que presentamos indican que, aunque los porcentajes de gestación a 21 días son superiores en el grupo de los blastocistos producidos en SOF, sólo se confirmaron por ultrasonografía gestaciones a 60 días en el grupo de embriones cocultivados en células VERO. El 33,3 p.100 de gestaciones a 60 días y de nacimientos es ligeramente inferior a lo aportado por otros investigadores (Hasler *et al.*, 1985). A la vista de estos resultados, cabe pensar que los embriones producidos en presencia de células tienen una mayor capacidad para sobrevivir en el útero materno. Además, los datos referidos a las gestaciones en día 21 (basados en los niveles séricos de P4) deben analizarse con cautela, puesto que la progesteronemia puede sufrir elevaciones no ligadas al establecimiento de gestación (cuerpo lúteo persistente, por ejemplo).

Los EPIV tienen un mayor contenido en lípidos, lo que da lugar a problemas de congelabilidad, haciendo imposible alcanzar porcentajes de supervivencia post-descongelación semejantes a los que se obtienen con embriones producidos *in vivo* (Leibo y

Loskutoff, 1993). La eliminación de los lípidos citoplasmáticos antes de la puesta en cultivo de los cigotos mejora significativamente la congelabilidad de los EPIV cuando alcanzan la fase de blastocisto (Díez *et al.*, 2001).

Considerando los resultados de transferencia en fresco, en que sólo los embriones obtenidos tras MIV y CIV en presencia de células VERO dieron lugar a gestaciones, sólo se criopreservaron blastocistos obtenidos con el mismo protocolo. Los embriones fueron criopreservados por dos sistemas: congelación clásica en etilenglicol para transferencia directa (Voelkel *et al.*, 1992) y vitrificación (Kaidi *et al.*, 2000). Además, dada la reducida supervivencia de este tipo de embriones, se realizaron transferencias dobles, que han demostrado incrementar las tasas de gestación post transferencia (Heyman y Chesné, 1984).

Los resultados obtenidos indican que los embriones congelados dieron lugar a una tasa de gestación a 21 días similares a la obtenidas tras la transferencia de embriones frescos. Sin embargo, los embriones congelados no fueron capaces de mantener la gestación a término. Por su parte, aunque los embriones vitrificados proporcionaron porcentajes de gestación a 21 días del 46 p.100, la mitad de estas gestaciones llegó a término, naciendo los 3 primeros terneros (2 hembras y 1 macho) producidos en España por la transferencia de un embrión obtenido tras OPU y vitrificado.

BIBLIOGRAFÍA

Bols, P.E.J., A. Van Soom and A. de Kruif. 1995.

Transvaginal Ovum Pick-Up (OPU): a new

PRIMEROS TERNEROS TRAS OPU-FIV

- disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43: 677-687.
- Brogliati, G.M. and G.P. Adams. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 45: 1163-1176.
- Bungartz L., A. Lucas-Hahn, D. Rath and H. Niemann. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43: 667-675.
- Callesen, H., T. Greve and F. Christensen. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 27: 217.
- Carolan, C., P. Monaghan, M. Gallagher and I. Gordon. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1061-1068.
- Diez, C., H. Heyman, D. Le Bourhis, C. Guyader-Joly, J. Degrolard and J.P. Renard. 2001. Delipidating *in vitro* produced bovine blastocysts effect of on further development and consequences on freezability. *Theriogenology*, 55: 923-936.
- Donnay, I., R. de Roover, A. Van Langendonck, P. Auquier, P. Bombaerts, T. Kinnar, N. Schuurbiers, M. Dive, A. Massip and F. Dessy. 1996. Production d'embryons bovins *in vitro* à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée. Premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 140: 283-291.
- Fancsovits, P., D. Lebourhis and Y. Heyman. 1998. Comparison of INRA-B2 and TCM-199 for *in vitro* production of bovine embryos. 14th Scientific Meeting AETE S, pp. 154.
- Farin, P.W., A.E. Crosier and C.E. Farin. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55: 151-170.
- Gibbons, J.R., R.L. Krisher, S.K. Carlin, R.E. Pearson and F.C. Gwazdauskas. 1995. *In vitro* production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*, 43: 1129-1139.
- Hanzen, C.H. and L. Goffin. 1998. Application de l'échographie à la ponction des follicules ovariens. *Ann. Med. Vet.*, 142: 81-91.
- Hasler, J.F., W.B. Henderson, P.J. Hurtgen, Z.Q. Jin, A.D. Mc Cauley, S.A. Mower, B. Neely, L.S. Shuey, J.A. Stokes and S.A. Trimmer. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152.
- Heyman, Y. and P. Chesné. 1984. Freezing bovine embryos: survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in straws. *Theriogenology*, 21: 240.
- Holm, P., P.J. Booth, M.H. Schmidt, T. Greve and H. Callesen. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52: 683-700.
- Kaidi, S., I. Donnay, A. Massip and F. Dessy. 2000. Effect of freezing or vitrification on the quality of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 53: 257.
- Kruip, T., M.C. Pieterse, T. Beneden, P. Vos, Y.A. Wurth and M.A.M. Taverne. 1990. Increased succes rates of IVM and IVF in the bovine after sonographic guided transvaginal collection of the oocytes. *Theriogenology*, 33: 269.
- Kruip, T., M.C. Pieterse, T. Beneden, P. Vos, Y.A. Wurth and M.A.M. Taverne. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Vet. Rec.*, 128: 208-210.
- Kruip, T., R. Boni, M.W.M. Roelofsen, Y.A. Wurth and M.C. Pieterse. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 39: 251.
- Kruip, T., R. Boni, Y.A. Wurth, M.W.M. Roelofsen and M.C. Pieterse. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42: 675-684.

- Lauffenburger, J., H. Quinton, C. Richard, J. Marchal, P. Mormede, J.P. Renard and S. Chastant-Maillard. 1999. Evaluation of stress associated to ovum pick-up in cow. *15th Scientific Meeting AETE*, pp. 178.
- Leibo, S.P. and N.M. Loskutoff. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 81-94.
- Looney, C.R., B.R. Lindsey, C.L. Gonseth and D.L. Johnson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41: 62-72.
- Machatkova, M., E. Jokesova, F. Horky and A. Krepelova. 1999. Collection of bovine oocytes by ovum pick-up during the growing phase of the first follicular wave improves blastocyst production. *15th Scientific Meeting AETE*, pp. 192.
- Meintjes, M., M.S. Bellow, J.R. Broussard, J.B. Paul and R.A. Godke. 1993. Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology*, 39: 266.
- Meintjes, M., M.S. Bellow, J.R. Broussard, J.B. Paul and R.A. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J Anim Sci.*, 73: 967-974.
- Menck, C., C. Guyader-Joly, N. Peynot, D. LeBourhis, R.B. Lobo, J.P. Renard and Y. Heyman. 1997. Beneficial effect of VERO cells for developing IVF eggs in two different coculture systems. *Reprod. Nutr. Dev.*, 37: 141-150.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
- Pieterse, M.C., K.A. Kappen, T. Kruij and M.A.M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Pieterse, M.C., P. Vos, T. Kruij, Y.A. Wurth, T. Beneden, A.H. Willemse and M.A.M. Taverne. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35: 401-413.
- Quinton, H., C. Douar, J. Marchal, C. Ricahrd, Y. Heyman, J.P. Renard and S. Chastant-Maillard. 1999. Maternal influence on oocyte collection and embryo development after OPU-IVF in cattle. *15th Scientific Meeting AETE*, pp. 220.
- Rath, D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transf Newsl*, 11: 10-15.
- Van Soom, A., I. Van Vlaenderen, A.R. Mahmoudzadeh, M.T. Ysebaert and A. de Kruif. 1994. Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in a birth of a calf. *Anim. Reprod. Sci.*, 36: 187-196.
- Voelkel, S.A. and Y.X. HU. 1992. Direct transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37: 23-37.
- Ward, F.A., B.P. Enright, P. Lonergan and M.P. Boland. 1999. Ovum Pick-Up (OPU): Effect of aspiration vacuum on cumulus oocyte complex morphology and oocyte developmental capacity. *15th Scientific Meeting AETE*, pp. 240.
- Wurth, Y.A., J.M.C. Reinders, W.F. Rall and A.M. Kruij. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single embryo transfer. *Theriogenology*, 42: 1275-1284.

Recibido: 1-9-01. Aceptado: 14-2-02.

Archivos de zootecnia vol. 51, núm. 196, p. 422.