

ASPIRACIÓN FOLICULAR Y PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS

JULIO C. OLAYA OYUELA

Medico Veterinario ULS
SASKATCHEWAN UNIVERSITY – CANADA
EMBRIOGENEX

BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS

Transferencias de embriones convencional
(T.E.)

Transferencia de embriones producidos por
fertilización in -Vitro (FIV)

	TE	FIV
Tratamiento hormonal Donadoras	Requiere 4 días de tratamiento, mas sincronización de donadora	No requiere ningún tipo de tratamiento
Sincronización Receptoras	Requiere	Requiere
Resultados promedio Obtenidos crías/procedimiento	3 crías por lavado	2,8 crías por aspiración
Repetición del trabajo en un mismo animal	Una vez cada dos meses	Dos veces al mes
Proporción de hembra/macho	No existe diferencia	Producción de mas machos que hembras (55% Vs 45%)
Costo producción de una cría en condiciones optimas (media).	\$900.000 en condiciones optimas (media).	\$ 900.000 constante
Aplicación de la técnica en animales preñados	Imposible	Aspiraciones hasta el 3° mes de gestación

	TE	FIV
Aplicación de la técnica en animales muertos	Imposible	Posible, siguiendo recomendaciones estrictas de manejo de los ovarios post-mortem
Aplicación de la técnica en Hembras prepuberres	Imposible	Posible
Aplicación de la técnica en Hembras Seniles	Resultados deficientes	Buenos resultados
Aplicación de la técnica en Hembras con defectos anatómicos o patológicos en útero	Imposible	Buenos resultados
Uso de semen Sexado	Resultados deficientes	Buenos resultados
Posibilidad de congelación de embriones	Si	Si
Aplicación de la técnica en Búfalas (Bubalus Bubalis)	Resultados deficientes	Buenos resultados
Cantidad de pajillas usada por donante	De 2 a 4	Máximo 1
Posibilidad de usar diferentes toros por Donante al mismo tiempo	Imposible	Posible

“Fertilización in vitro” - FIV

- Didacticamente podemos dividir la FIV en las siguientes biotecnologías:
- Punción folicular o OPU (Ovumpickup)
- Producción in vitro de embriones - PIV

Punción folicular - OPU

- Es una biotécnica que permite la aspiración in vivo de los folículos ováricos ayudado por ultra-sonografía y con auxilio de una bomba de vacío.

Para OPU



Laboratorio de OPU



Aspectos comerciales del procedimiento de OPU en bovinos

- IA: una preñez por año.
- Super ovulación + TE: media de 12 preñeces año / 3 coletas.
- OPU + FIV: mayor velocidad de multiplicación.

Frecuencia de OPU	Media de preñez / OPU	Total de preñez año
Semanalmente	2	104
Quincenalmente	2	48

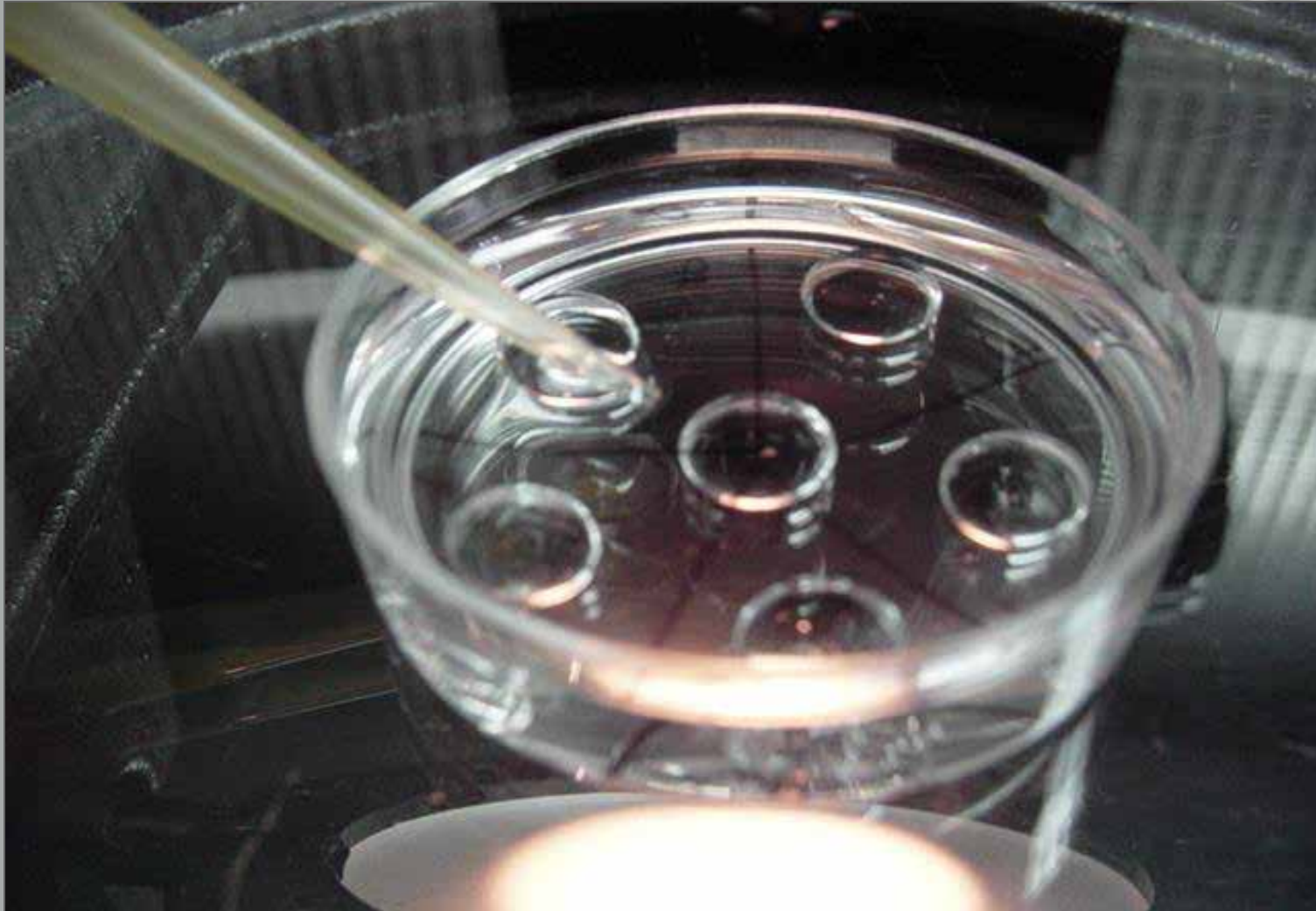
Aplicaciones de la técnica de OPU

- Donadoras vacías con o sin problemas reproductivos adquiridos.
- Donadoras refractarias a la superovulación
- Donadoras preñadas
- Donadoras posparto
- Novillas
- Terneras
- Terapéutica
- Donadoras sacrificadas por motivo de enfermedad o accidentes

Producción in vitro de embriones

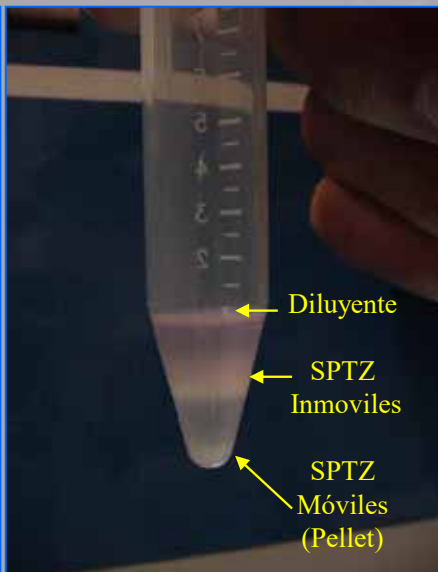
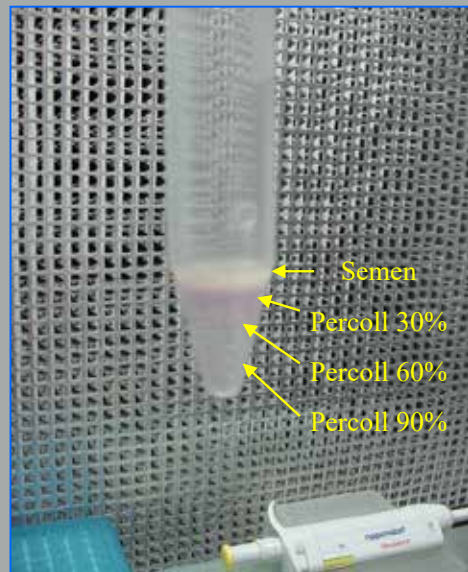
- Esta biotécnica esta dividida en las siguientes fases:
 - Maduración in vitro – MIV
 - Fertilización in vitro – FIV
 - Cultivo in vitro – CIV

Maduración in vitro -MIV



Gradiente de Percoll

- Preparación del semen y procesamiento del percoll.



Cultivo in vitro

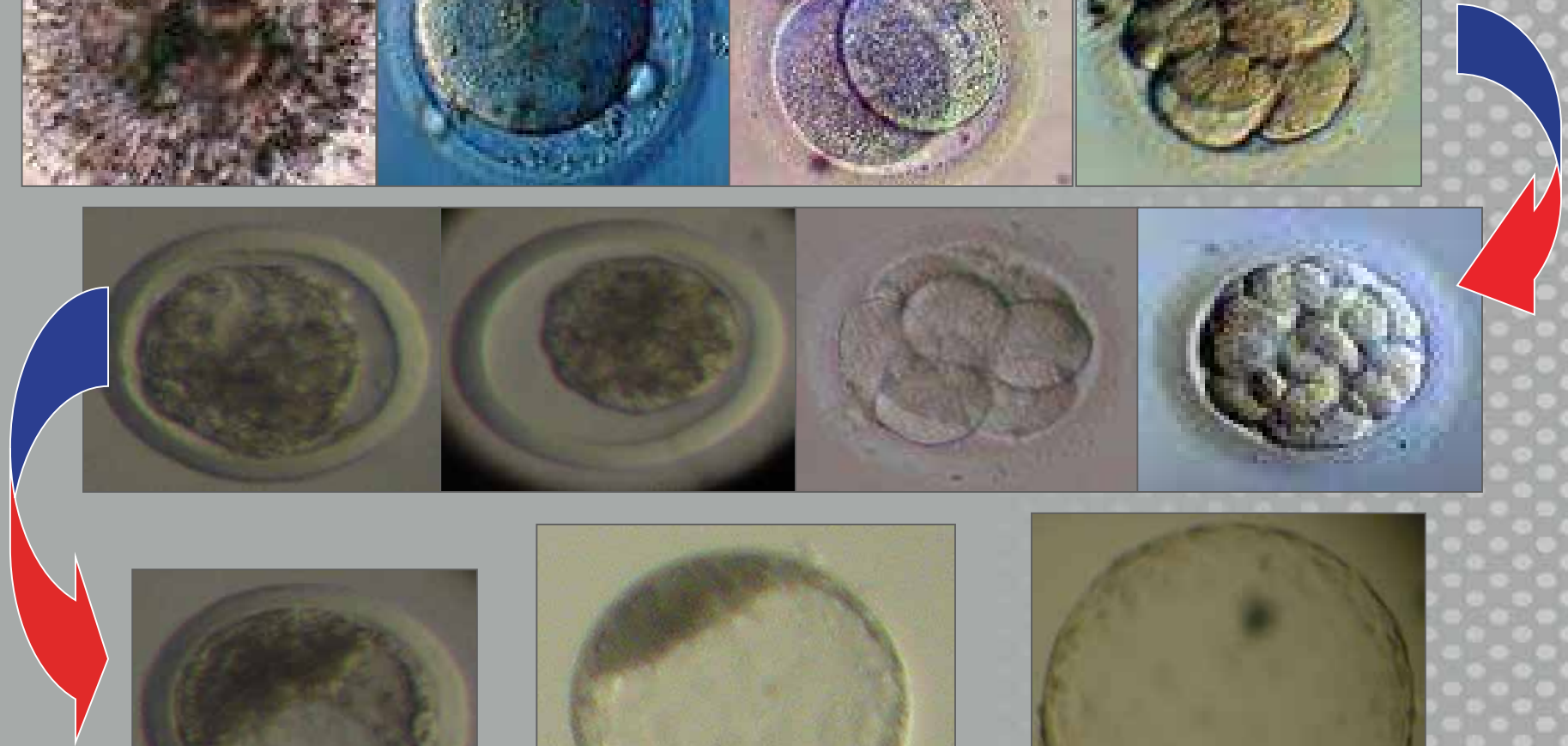
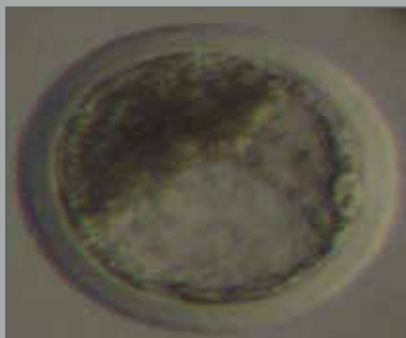
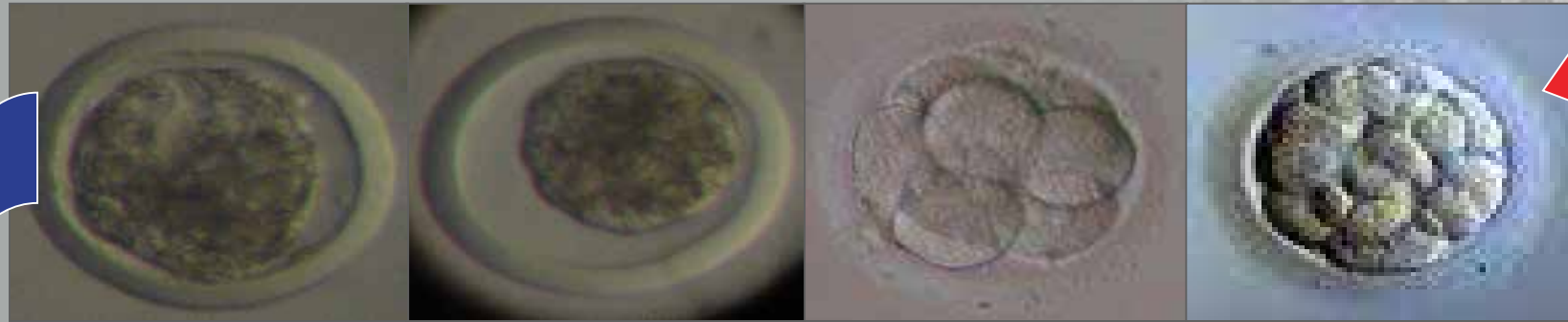
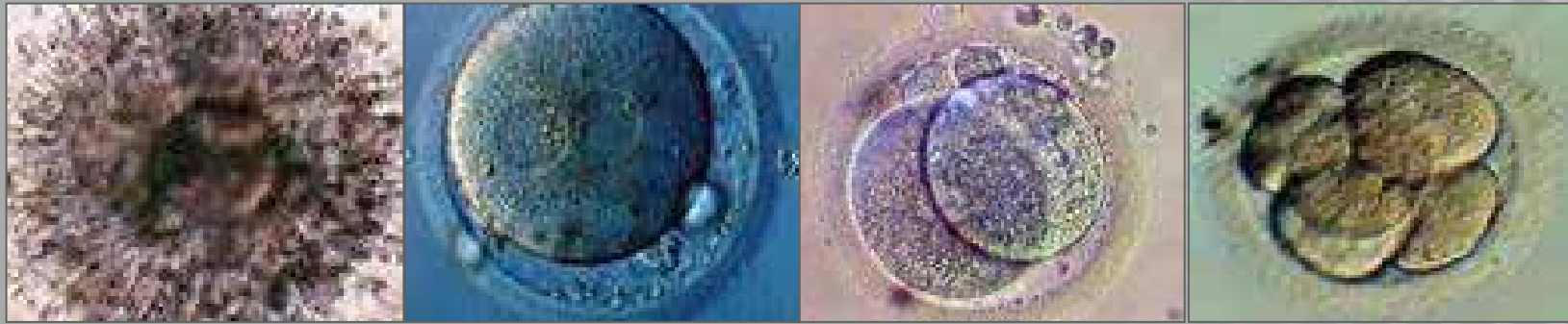
Condiciones de cultivo

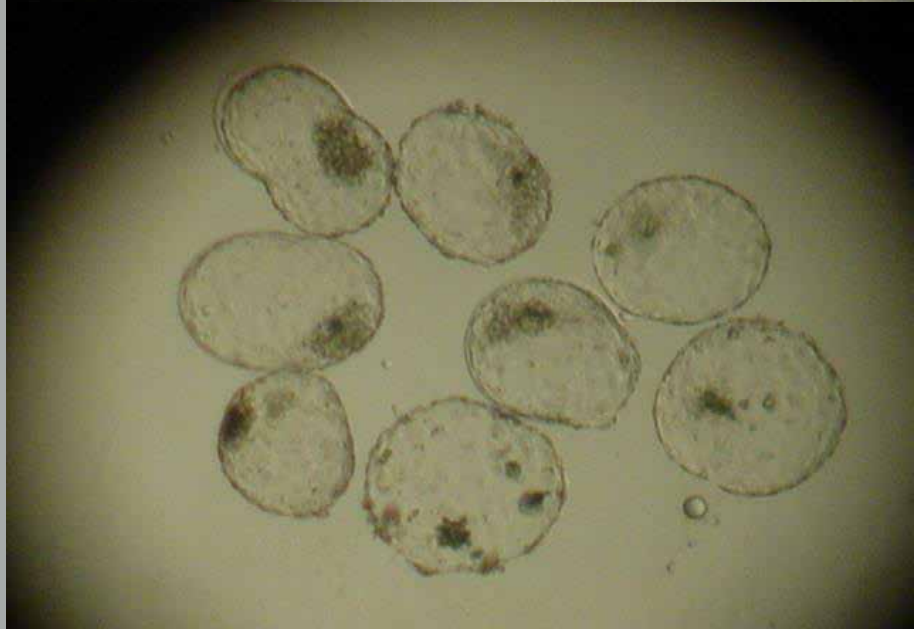
Médo de cultivo

- SOF ("Synthetic Oviduct Fluid");



38,7°C – 7 a 9 días





Parámetros de productividad en la OPU/FIV –2009 –Lab. Pedro Leopoldo.

FECHA	VACAS	OÓCITOS VIABLES	TOTAL OÓCITOS	OÓC. VIAB / VACA	Nº CLIV.	%CLIV.	EMB. PROD.	%EMB. PROD.	DESP.	EMB. TE.
ENE	157	2165	3372	13,79	1662	76,8%	1269	58,6%	298	971
FEB	112	1796	2825	16,04	1492	83,1%	1001	55,7%	187	814
MAR	145	2606	3866	17,97	2053	78,8%	1363	52,3%	253	1110
ABR	187	2807	4266	15,01	2251	80,2%	1375	49,0%	201	1174
MAY	184	2744	4425	14,91	1918	69,9%	1430	52,1%	270	1160
JUN	160	2697	4431	16,86	2147	79,6%	1236	45,8%	198	1038
JUL	129	3064	4682	23,75	2333	76,1%	1298	42,4%	259	1039
AGO	172	2951	4603	17,16	2387	80,9%	1391	47,1%	147	1115
SEP	234	3422	5036	14,62	2676	78,2%	1664	48,6%	226	1438
OCT	182	2820	4061	15,49	2271	80,5%	1425	50,5%	239	991
NOV	215	4354	6073	20,25	3390	77,9%	2234	51,3%	321	1913
DIC	201	3829	5357	19,05	2713	70,9%	1669	43,6%	209	1460
2005	2078	35255	52997	16,97	27293	77,4%	17355	49,2%	2808	14223

Parámetros de productividad en la OPU/FIV –2009 –Lab. Pedro Leopoldo.

DATA	EMB. TE.	%EMB. TE	EMB. / VACA	PREÑEZ	%PREÑEZ	PREÑEZ VACA
ENE	971	44,8%	6,18	408	42,0%	2,60
FEB	814	45,3%	7,27	372	45,7%	3,32
MAR	1112	42,7%	7,67	559	50,27%	3,86
ABR	1174	41,8%	6,28	619	52,7%	3,31
MAY	1160	42,3%	6,30	589	50,78%	3,20
JUN	1038	38,5%	6,49	498	47,98%	3,11
JUL	1039	33,9%	8,05	496	47,74%	3,84
AGO	1115	37,8%	6,48	567	50,85%	3,30
SEP	1438	42,0%	6,15	718	49,93%	3,07
OCT	991	35,1%	5,45	532	53,68%	2,92
NOV	1913	43,9%	8,90	888	46,42%	4,13
DIC	1460	38,1%	7,26	564	38,63%	2,81
2005	19054	54,0%	9,17	8619	45,23%	2,64

Problemas inherentes a la técnica de OPU/FIV

- 1) Relación macho y hembra:
mayor relación de macho que de hembra.
Puede tener una diferencia mayor de 5%
para machos.

Problemas inherentes a la técnica de OPU/FIV

2) Síndrome del ternero grande:

- * Utilización de medios no definidos en la PIV (SFB).
- * El atraso del parto puede favorecer el aumento del ternero al nacimiento. Utilización de inducción de parto.

Problemas inherentes a la técnica de OPU/FIV

- 3) Mayores índices de aborto, absorción y mortinato comparando con la TE.
- 4) Lesiones o varicosis y de pedículo: existe un riesgo pequeño con relación a las lesiones cuando hay una aplicación errónea de la técnica (punción de CL, estroma ovárico y pedículo, este último muy irrigado).
- 5) Hidropesía.

Frecuencia de aspiraciones

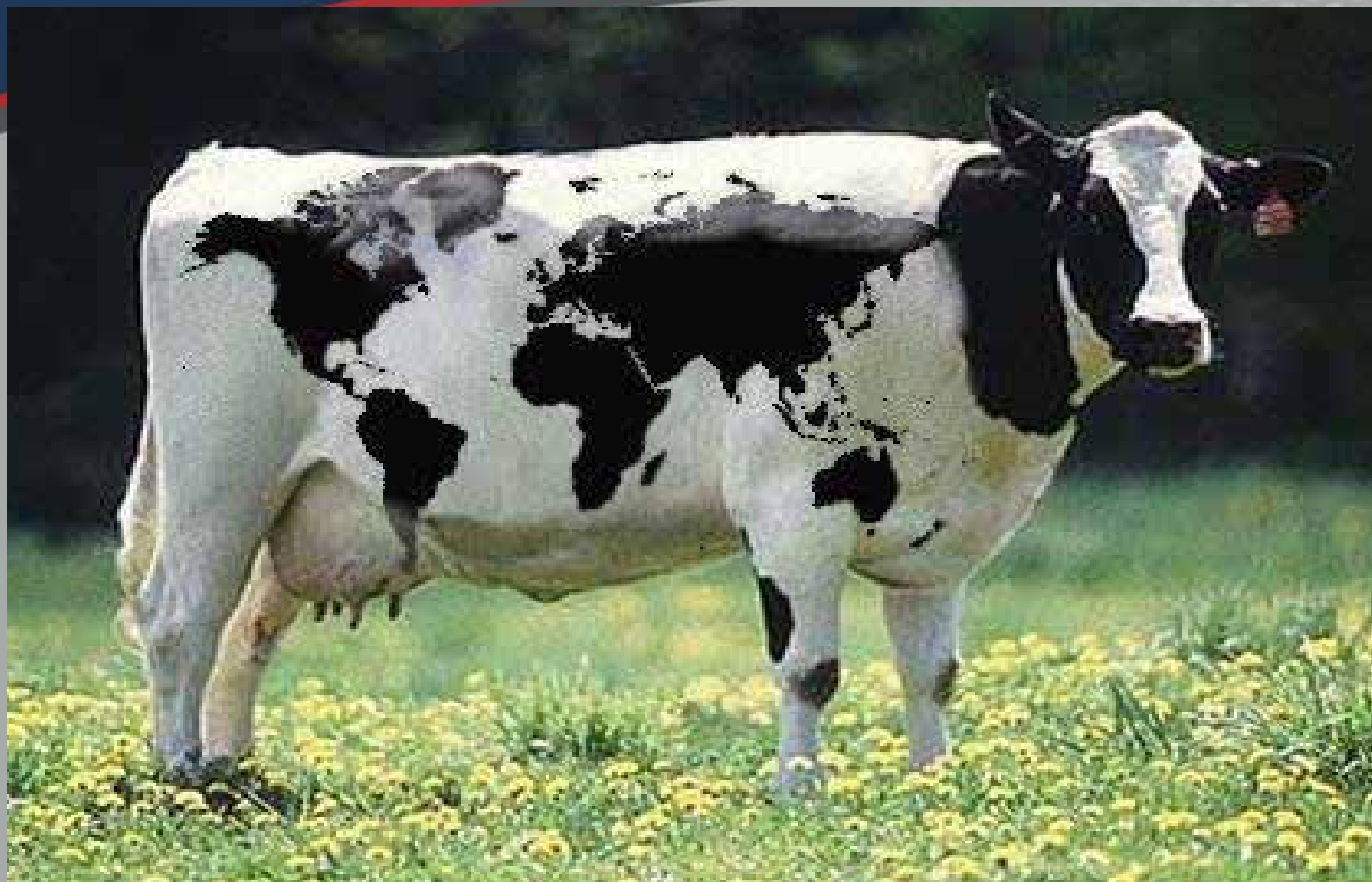
- OPU 2 veces por semana. No es prohibitivo, pero tiene un proceso inflamatorio constante.
- OPU 1 vez por semana, la producción de embriones es bien próximo, cuando es comparado con OPU 2 veces semanales.
- Se prefiere hacer aspiración cada 15 días. Mayor tiempo para recuperación de los procesos inflamatorios de los ovarios, con secuentemente menor riesgo de lesiones.

Sincronización de receptoras para programa de TE de embriones producidos in vitro

- 10 receptoras para cada donadora puncionada (preferir receptoras grandes).
- Día de sincronización en orden de mejor día: D8, D7, D9, D6.
 - Aplicación de PGF 3 días antes de OPU.
 - Uso de progestagenos 10 días antes de OPU

Factores que pueden interferir en la PIV y en la preñez

- Donadora: uno de los más importantes.
- Toro: interacción toro / vaca.
- Receptoras: nutrición, estado corporal, sincronización y etc.
- Tiempo de transporte de los ovócitos para el laboratorio de PIV y embriones para el local de TE.



CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES FIV

DMV JULIO OLAYA
UNIVERSIDAD DE LA
SALLE
SASKATSEWAN
UNIVERSITY. CANADA

Z. JUAN FDO PACHON
DIR. LABORATORIO FIV
EMBRIOGEN S.A.
CENATTE BRASIL

TIPOS DE CRIOPRESERVACIÓN

- CONGELACIÓN
- VITRIFICACIÓN

CONGELACIÓN EMBRIONES FIV

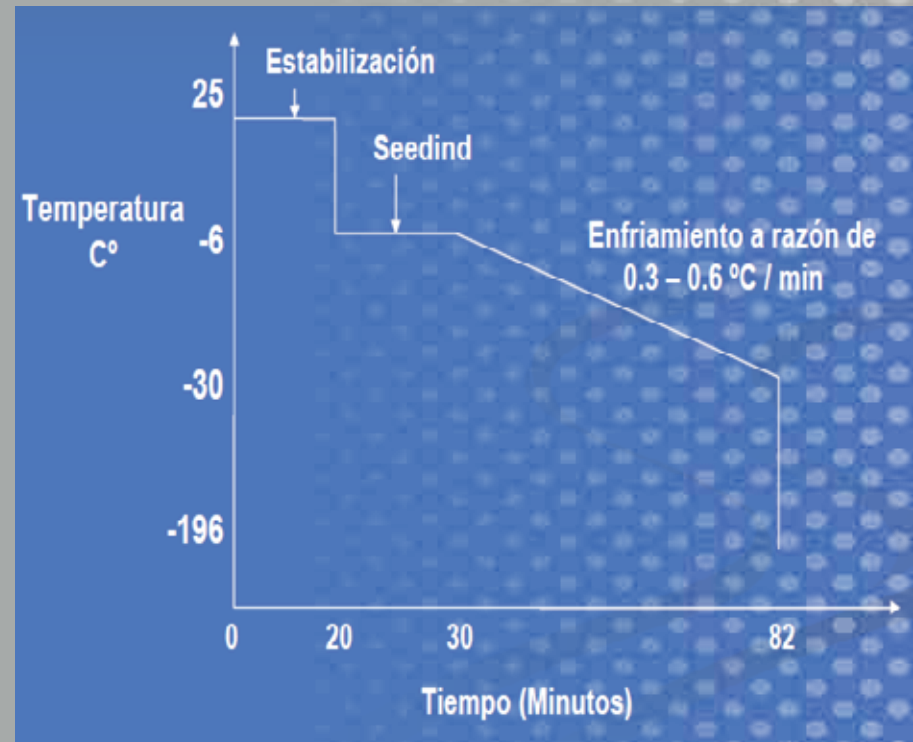
Que nos posibilita:

- Utilizar eficientemente donante y receptoras.
- Incorporar progreso genético abajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie.
- Transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia.
- Controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas.
- Conservar razas en vías de extinción.
- Crear bancos de germoplasma de valor pecuario

CONGELACIÓN EMBRIONES FIV

Proceso:

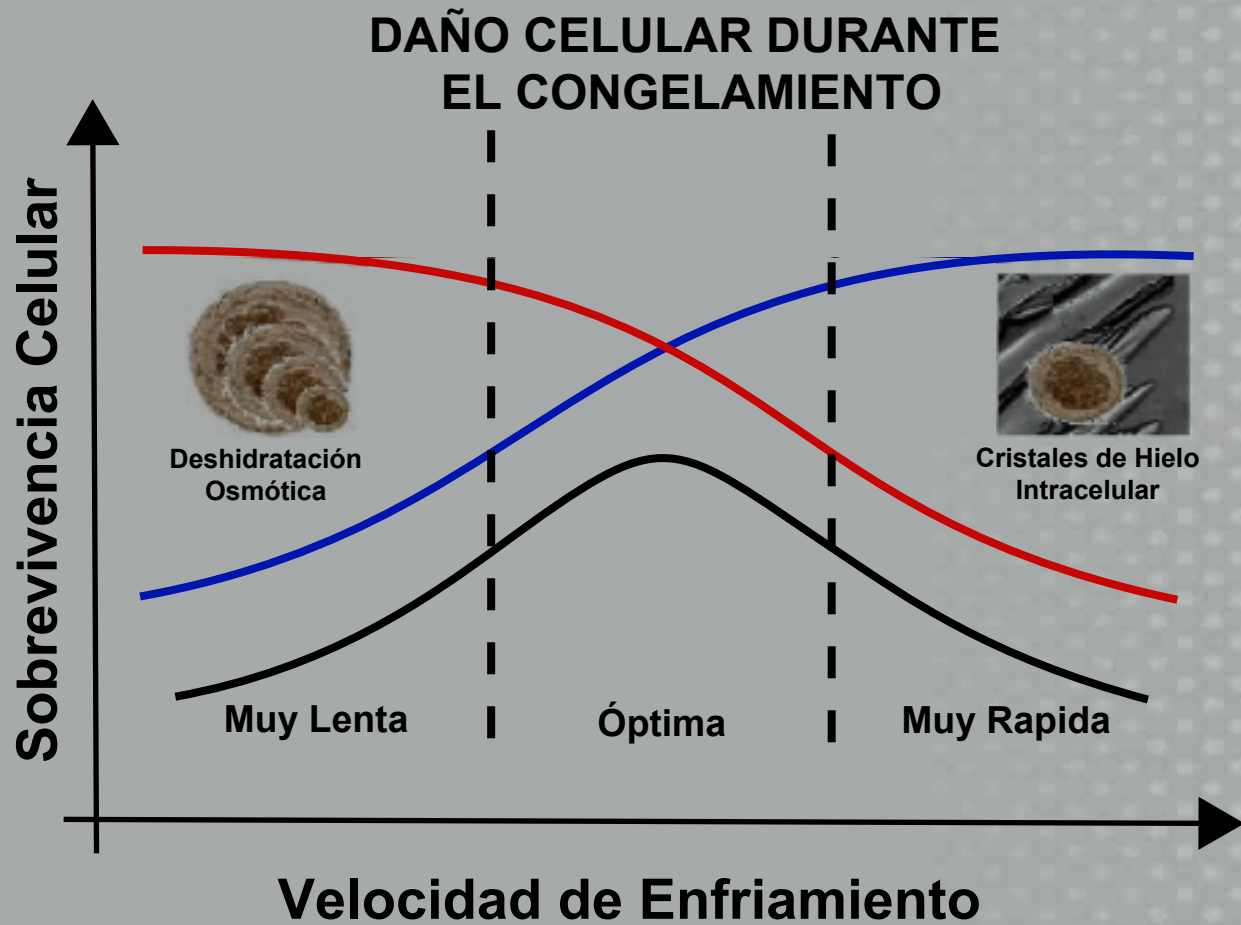
- Exposición de los embriones a agentes crioprotectores.
- Enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar cese de las reacciones químicas inducidas térmicamente.



EQUIPOS EN LA CONGELACIÓN



RIESGOS EN EL PROCESO



VITRIFICACIÓN EMBRIONES FIV

- Proceso físico de solidificación.
- Medios crioprotectores de alta concentración.
- Al enfriar no cristaliza sino toma viscosidad.
- Va de estado líquido a sólido no estructurado similar al vidrio.
- El proceso hasta inmersión en NL no mayor a 10 min.
- Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso.

VIT EMBRIONES FIVRIFICACIÓN

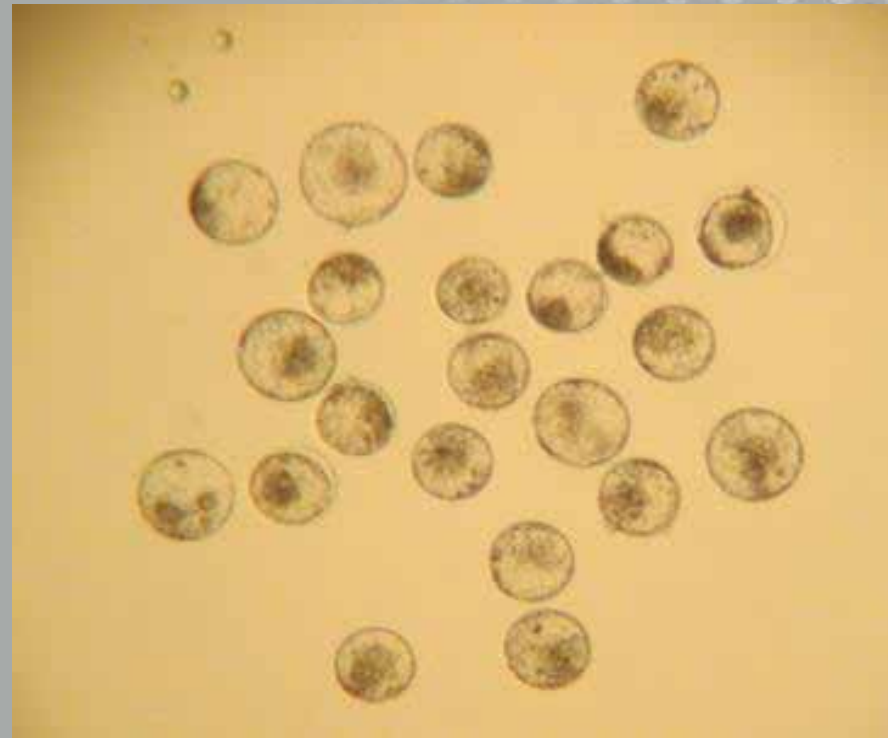
Proceso:

- Reconstitución medios: Base,SV1YSV2.
- Deshidratación e hidratación en medios concentrados en sales y azúcares.
- Pasada la exposición a estos medios, (tiempo aprox. 3-4 min), son colocados en aztas (hasta 5embriones).
- Inmediatamente se realiza inmersión en NL.



ÉXITO DE LAS TÉCNICAS

- El resultado de la criopreservación de embriones depende fundamentalmente de la forma en que se llevan a cabo estos procedimientos.
- Selección exhaustiva de los embriones blastocistos grado I.





MUCHAS GRACIAS
