

Producción de embriones in vitro utilizando diferentes factores de maduración ovocitaria

Año
2018

Directores del proyecto

Caccia, Mariana y Fernández Taranco,
Mariana Lucía

Equipo de investigación

Moreira, Gabriela del Valle; Simonovich, Paola; Martín,
Josefina Inés y Virgolini María José

Alumnos participantes

Cieri, Cintia Mariela; Ighina, Manuela; Luna
Fontana, Ruth y Scarponi, Melina

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Caccia, M., [et al.] (2018). *Producción de embriones in vitro utilizando diferentes factores de maduración ovocitaria*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional



INFORME ACADÉMICO FINAL
Proyectos de Investigación 2016-2017

PROYECTO:

Producción de Embriones In Vitro utilizando Diferentes Factores de Maduración Ovocitaria

DIRECTOR:

Mariana Caccia

CO-DIRECTOR:

Mariana Fernandez Taranco

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Moreira Gabriela del Valle

Simonovich Paola

Martín Josefina Inés

Virgolini María José

ALUMNOS INTEGRANTES:

Cieri Cintia Mariela

Ighina Manuela

Luna Fontana, Ruth

Scarponi Melina



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO

—
El Objetivo General del proyecto 2016-2017 fue evaluar los efectos de diferentes activadores de la maduración ovocitaria con el fin de incrementar la competencia ovocitaria y la consecuente producción de embriones in vitro (FIV).

Durante el año 2016 se comenzó a trabajar en el laboratorio con ovarios y ovocitos que se obtuvieron del frigorífico Logros ubicado en la localidad de Río Segundo y del Frigorífico de Villa del Rosario. De acuerdo a los protocolos establecidos, los ovarios fueron transportados al laboratorio en termos con solución fisiológica en medio acondicionado para tal fin y temperatura controlada. Posteriormente se procedió a la punción de los folículos y los Complejos Cúmulus-Ovocitos (COCs) obtenidos fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica y puestos a madurar en una incubadora con atmósfera de CO₂ al 5.5%, a 38,7°C y humedad de saturación, por un periodo de 24 horas. Se evaluó maduración nuclear por visualización del cuerpo polar de los ovocitos madurados, para ello se utilizó hialuronidasa. De los COCs obtenidos se obtuvo el 46 % de maduración. Cabe destacar que debido a problemas en el funcionamiento de la estufa de cultivo, tuvo que enviarse a servicio técnico y los trabajos se retrasaron; el laboratorio estuvo parado 3 meses. De todos modos en el mes de febrero 2017 se incorporaron al laboratorio dos estufas de cultivo nuevas. Es ese momento, debido al retraso, se decidió avanzar en el establecimiento de la producción de los embriones dejando de lado momentáneamente los experimentos con los diferentes medios de maduración. Durante 2017, se trabajó con un solo medio de Maduración In Vitro (MIV) para estandarizar la técnica de producción de embriones, después, se fertilizaron y para la etapa del Cultivo In Vitro (CIV) se utilizaron tres medios distintos. Los experimentos de evaluación de diferentes inductores de maduración de ovocitos se realizarán en el nuevo Proyecto 2018/19.

Hasta mitad del año 2017 se trabajó en la capacitación de los estudiantes e investigadores en las diferentes etapas de producción de embriones y la preparación de medios, utilización de equipos y materiales. A partir del mes de agosto de 2017 hasta diciembre del mismo año, se realizaron 12 rutinas de Producción In Vitro de Embriones (PIVE), las cuales culminaron con la producción de Blastocisto.



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

Para la realización de los experimentos, los ovocitos se obtuvieron del frigorífico Logros ubicado en la localidad de Río Segundo a 50 km de Villa del Rosario, estos fueron transportados al laboratorio en un termo en medio acondicionado para tal fin (35-37°C). Una vez en el laboratorio se procedió a la punción de los folículos y los COCs obtenidos fueron seleccionados y clasificados en grado I, II y III según lo descrito por Hasler et al (1995), con ayuda de una lupa estereoscópica (Nikon, Japón) de acuerdo a la calidad y el número de capas de células del cumulus, además de la homogeneidad del citoplasma. Se procedió a lavarlos en tres gotas de 50 µl de medio WASH de Vitrogen previamente atemperado a 37.7°C. Posteriormente, los COC's obtenidos, se pusieron a madurar in vitro en microgotas de 70 µl de medio MIV de Vitrogen previamente equilibrado en una atmósfera de 5.5% de CO₂ a 38.8°C. Se colocaron entre 25-30 ovocitos por gota en placas de Petri de 35mm cubiertas con aceite mineral (SIGMA, U.S.A.), las cuales se colocaron en una incubadora Forma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, modelo 3111 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), a 38.8°C y 5.5% de CO₂ durante 18-22 horas. Para la Fertilización In Vitro se utilizó semen convencional congelado de toros con fertilidad comprobada. Se descongelaron las pajuelas exponiéndolas 8 segundos al aire y 30 segundos en baño maría a 37°C y seguidamente se analizó su motilidad progresiva y su vigor espermático. Para su selección y capacitación se empleó el sistema de gradientes de minipercoll de densidad creciente (45% - 90% v/v) previamente atemperado a 37.7°C. Los ovocitos maduros se pusieron a fertilizar en placas de Petri de 35mm en gotas de 70 µl de medio FIV de Vitrogen a razón de 25-30 ovocitos por gota. El semen y los COC's madurados se mantuvieron en incubación por 22-24 horas a 38.8°C con 5.5% de CO₂.

Luego de las 24 horas de la fertilización, cada uno de los tercios de los cigotos obtenidos, se colocaron en placas de Petri de 35mm en gotas de 70 µl de medio CIV de Vitrogen, para los correspondientes al grupo VGEN, en medio CIV BBH7 para los correspondientes al grupo BBH7 y en medio SOF Citrato para los correspondientes al grupo Control, todas las gotas bajo aceite mineral a razón de 25-30 cigotos por gota. Las placas con los cigotos en los tres diferentes medios de CIV, se colocaron en la incubadora Forma Series II Water Jacket CO₂ Incubator, modelo 3131 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), a 38.8°C con 5.5% de CO₂ y 5.0% de O₂. En el día 3 del proceso de Cultivo In Vitro, se evaluó la tasa de clivaje (embriones de 2 o más células/total de ovocitos puestos a madurar). En los días 3 y 5 del CIV, para los embriones del grupo VGEN, se retiraron 40 µl de medio de CIV y se adicionaron 40 µl de medio CIV nuevo previamente estabilizado a 38.8°C al 5.5% de CO₂ y 5.0% de O₂ a cada



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

gota. Para los embriones correspondientes al grupo Control, en el día 3 y 5, se retiraron 40 µl de medio SOF y se adicionaron 40 µl de medio SOF nuevo previamente estabilizado a 38.8°C al 5.5% de CO₂ y 5.0% de O₂ a cada gota. Los embriones se mantuvieron en cultivo durante 7 días.

En estas rutinas, se trabajó con 1132 ovarios de bovinos de carne/leche de los cuales se seleccionaron 2224 ovocitos que se colocaron en medio de maduración y después se fertilizaron. De este total, se obtuvo un 32 % de clivaje. Luego del cultivo, se obtuvieron 101 embriones en estadio de Blastocisto de los cuales se criopreservaron 44 por la técnica de congelamiento lento y 18 por la técnica de vitrificación.

INFORME DE PRODUCCIÓN CIENTÍFICA: Los trabajos realizados hasta la fecha no arrojan resultados como para realizar una publicación. Se espera en el transcurso del año llegar a tener un número crítico de ovarios, ovocitos madurados y de embriones para poder publicar los resultados.

2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA

2.1. *Describir vínculos generados desde el Programa/Proyecto con referencia a demandas del Sector Productivo.*

Durante 2017 se logró establecer un sistema de producción in vitro de embriones en el laboratorio de fertilización in vitro en la sede Villa del Rosario de la UNVM. Este sistema funciona regularmente. Se espera que estos protocolos puedan ser utilizados para la PIVE a partir de ovocitos obtenidos por Aspiración Folicular (OPU) de animales de alta calidad genética y de importancia económica, ya sea de leche o de carne de las diferentes producciones ganaderas de la zona. Para poder obtener estos ovocitos solamente necesitamos una parte del equipamiento que es la bomba de aspiración y el mango para colocar el transductor del ecógrafo para visualizar los folículos ováricos.

Además se concretó el CONVENIO MARCO DE COOPERACIÓN Y COMPLEMENTACIÓN CON FRIGORIFICO LOGROS S.A. del cual durante todo este período se obtuvieron los ovarios bovinos. Además se firmó en el marco del Convenio Marco de la UNVM con el Instituto de



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

Reproducción Animal Córdoba un ACUERDO PARTICULAR ESPECÍFICO por el cual se promueve la participación de ambas instituciones en los proyectos de investigación vigentes relacionados con el laboratorio de Producción de embriones bovinos in vitro.

--

2.2. Describir vínculos que respondan a demandas internas de distintas áreas de la UNVM.

Desde el punto de vista institucional el objetivo es continuar con la formación de recursos humanos en técnicas de producción de embriones in vitro, dentro del marco de la Carrera de Medicina Veterinaria del Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas de la UNVM.

En relación con la vinculación con la capacitación de estudiantes, durante todo el periodo tuvimos becarios de la carrera Medicina Veterinaria. Las tareas que realizaron están relacionadas con la colección de ovarios en el frigorífico, la obtención de ovocitos por aspiración y su clasificación y maduración en el laboratorio. Además colaboraron en actividades de preparación de medios y esterilización de material en laboratorio. Las alumnas *Cintia Mariela Cieri* y *Ruth Luna Fontana*, obtuvieron beca de Investigación para colaborar en el proyecto (RR 825/16). Además, participaron las alumnas *Manuela Ighina* y *Juliana Arneudo*, todas ellas alumnas de cuarto año. Durante 2017 *Ruth Luna Fontana* y *Manuela Ighina* colaboraron en el proyecto debido a que obtuvieron una beca CIN de Investigación. *Cintia Mariela Cieri* RR 701/2017 obtuvo beca de Investigación de la UNVM.

Finalmente cabe mencionar que le ha establecido relación con los laboratorios sede Villa María de la UNVM en el cual preparan medio base para el trabajo en frigorífico.

--

3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM

AUTORIZO LA PUBLICACIÓN DE ESTE INFORME ACADÉMICO FINAL EN EL REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM: SI