

---

## CERDOS PRODUCIDOS POR FERTILIZACIÓN IN VITRO Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Ducolomb, Y\*,<sup>1</sup> Bonilla, M.,<sup>2</sup> Romo, S.,<sup>3</sup> Balcazar, A.,<sup>3</sup> Trujillo, M.E.,<sup>4</sup> Rodarte, L.F.,<sup>4</sup> Casas, E.,<sup>1</sup> Ramirez, R.,<sup>2</sup> Borbolla, G.,<sup>4</sup> Zayas, H.,<sup>1</sup> Fragoso, G.,<sup>2</sup> Sciutto, E.,<sup>2</sup> y Betancourt, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, <sup>3</sup>Departamento de Reproducción y <sup>4</sup>Departamento de Producción Animal: Cerdos, FMVZ, UNAM.

### INTRODUCCIÓN

La fertilización in vitro, (FIV) en animales domésticos se inició en 1982 cuando Brackett logró el nacimiento de una ternera producida por FIV y transferencia embrionaria (TE). En cerdos, hay escasos reportes donde se han obtenido lechones nacidos vivos por estos métodos (Mattioli et al, 1989; Yoshida et al, 1993; Funahashi, et al, 1996 ). Las principales causas de este hecho se deben principalmente a la falta de definición en los componentes de los medios de maduración de los ovocitos.

Yoshida et al, en 1993, tuvieron éxito al adicionar al medio de maduración, líquido folicular y cisteína. Posteriormente, se han tratado de producir medios de maduración más definidos, al eliminar el líquido folicular y el suero fetal de bovino como fuentes de proteínas, substituyéndolos por polivinilalcohol (PVA) y suplementándolos con factor de crecimiento epidérmico (FCE), cisteína, glucosa y piruvato, además de las hormonas LH y FSH (Abeydeera et al 1998 a y b). Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar la técnica de FIV utilizando medio definido para obtener embriones en estado de blastocisto para ser transferidos a una hembra receptora y de esta manera obtener lechones vivos.

### MATERIAL Y MÉTODOS.

Los ovarios se colectaron de cerdas prepúberes en el rastro y se transportaron al laboratorio a 39°C en menos de 2 horas. Se puncionaron los folículos ováricos de 3 a 6 mm para la obtención del líquido folicular, el cual se dejó sedimentar, haciendo dos lavados con TL-Hepes-PVA. Bajo el microscopio, se seleccionaron los complejos ovocito-células del cúmulus (COC), eligiéndose aquellos que presentaran ovocitos con el citoplasma uniforme y rodeados por una masa completa de las células del cúmulus y se maduraron en medio TC199 suplementado con PVA, D-glucosa, piruvato de sodio, cisteína y FCE (Wang y Niwa, 1995).

Se depositaron de 40 a 50 ovocitos por pozo en una caja de 4 pozos (Nunc) con 500 µm de medio de maduración cubierto con aceite mineral, agregando las hormonas LH y FSH antes de la incubación.

Los COC se incubaron a 39°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a saturación durante 42 a 44 horas. Transcurrido el tiempo de maduración, se agregaron a cada pozo 300 µm de hialuronidasa al 0.1% para eliminar las células del cúmulus. Los ovocitos desnudos se transfirieron a gotas de medio de fertilización (TBM), suplementado con cafeína y albúmina sérica bovina (BSA) (Abeydeera et al 1998 a y b). El semen se obtuvo por medio de la técnica de la mano enguantada, se transportó al laboratorio a 39°C y se lavó por centrifugación tres veces en medio DPBS suplementado con BSA. (Abeydeera et al, 1998a).

---

Los ovocitos se inseminaron obteniéndose una concentración final de  $5 \times 10^5$  espermatozoides/ml. La coincubación se llevó a cabo durante 7 horas. Transcurrido ese tiempo, los ovocitos se lavaron y se transfirieron al medio de desarrollo de embriones NCSU-23 suplementado con BSA y se incubaron en las mismas condiciones durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo se observaron los embriones para determinar su estado de desarrollo (2 a 4 células). A las 120 horas de incubación se observó la aparición de blastocistos.

Se sincronizó una hembra con el fin de que sirviera como receptora: en el día 12 del ciclo estral se administró Altrenogest por 5 días, 24 horas después PMSG y 72 horas más tarde HGC. Cinco días y medio después del estro, se realizó la TE en los cuernos uterinos, empleando una técnica quirúrgica, utilizando como anestésicos Sural y Metomidil.

## RESULTADOS.

Cuarenta y ocho horas después de la FIV se observaron embriones en etapa de división de 2 y 4 células, a las 120 horas se observaron 10 blastocistos expandidos, 27 embriones en estado de mórula y blastocisto temprano y 11 en etapas más tempranas de desarrollo, todos los cuales fueron transferidos. Después de la TE la hembra no entró en estro. El diagnóstico de gestación se realizó por medio de ultrasonido (tiempo real-arreglo lineal) a 55, 69, 90 y 107 días.

Transcurridos 114 días después de la FIV y no habiéndose presentado síntomas de trabajo de parto, se procedió a realizar una intervención quirúrgica (cesárea), encontrándose un producto en cada cuerno uterino, los cuales se extrajeron por medio de una incisión en cada uno de ellos. Se obtuvieron dos hembras vivas con pesos de 1500 y 1000 g respectivamente, con apariencia y tamaño normal.

## DISCUSIÓN.

En este trabajo se observó el efecto del medio de maduración químicamente definido, ya que no contiene suplementos biológicos como el líquido folicular y el suero fetal de bovino, dado que al ser un conjunto de moléculas no caracterizadas, algunas pueden tener un efecto estimulante sobre la maduración del ovocito, pero otras pueden presentar algún efecto inhibitorio y provocar gran variabilidad en la producción de embriones. En la metodología utilizada en este trabajo, en el medio de maduración se suprimió el líquido folicular, el cual fue substituido por PVA (Abeydeera et al, 1998a) y suplementado con FCE (Abeydeera et al, 1998 b). Con esta combinación de elementos se logró tener un mayor número de embriones en estado de mórula y algunos hasta el estado de blastocisto.

La calidad de los embriones obtenidos fue adecuada puesto que a las 120 horas postfertilización ya habían aparecido blastocistos de buen tamaño, lo que indica que las condiciones del medio de desarrollo fueron adecuadas, ya que por lo general la aparición de los mismos se produce hasta las 144 horas.

Los trabajos donde se reporta la FIV y TE para producir lechones, se ha llevado a cabo implantando embriones de 2 a 4 células en el oviducto (Mattioli et al, 1989 y Yoshida et al, 1993), o en estado de 8 células a mórula en el cuerno uterino (Abeydeera et al, 1998b). En el presente estudio se procedió a transferir embriones en estado de mórula y blastocisto, pues según Abeydeera (comunicación personal) al transferirlos en estados avanzados de desarrollo tienen mayor probabilidad de implantarse y desarrollarse hasta terminar la gestación. Con esta metodología se logró tener éxito con el nacimiento de dos lechones hembras a pesar de que el ensayo se llevó a cabo solo en una receptora.

---

El hecho de que hayan nacido solo 2 lechones, indica que posiblemente pudieran haberse implantado un mayor número de embriones que no llegaron a término, pero que permitieron el desarrollo completo de estos 2 productos.

## REFERENCIAS.

- Abeydeera, R.L., Wang, W., Prather, R.S., y Day, B.N. (1998a) Maturation in vitro of pigs oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol. Rep.* 58: 1316-1320.
- Abeydeera, R.L., Wang, W.H., Cantley, T.C., Reike, A., Prather, R.S., y Day, B.N. (1998b) Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Rep. Develop.* 51: 395-401.
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., y Dressel, M.A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
- Funahashi, H., Kim, N., Stumpf, T.T., Cantley, T.C. y Day, B.N. (1996). Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 54: 1412-1419.
- Mattioli, M., Bacci, M.L., Galeati, G., y Seren, E. (1989) Developmental competence of oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31: 1201-1207.
- Wang, W., y Niwa, K. (1995) Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote* 3: 345-350.
- Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kogima, T., y Nagai, T. (1993). Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig matured in vitro. *Theriogenology* 39: 1303-1311.