

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
BUCUREȘTI
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE

**Cercetări privind optimizarea metodelor de
evaluare a calității embrionilor ovini după
recoltare și conservare**

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC :

Prof. Univ. Dr. **MARIA ANGELA STOICA**

DOCTORAND :

GABRIEL PREFAC

BUCUREȘTI

2008

**Cercetări privind optimizarea metodelor de evaluare a calității
embrionilor ovini după recoltare și conservare**

Partea a I-a

Capitolul 1. Studiu bibliografic ...	8
1.1. Fiziologia reproducției la ovine	8
1.1.1. Ovogeneza și foliculogeneza	8
1.1.2. Ovulația	13
1.1.3. Ciclul sexual la ovine	16
1.2. Biotehnologia transferului de embrioni la ovine	16
1.2.1. Alegerea donatoarelor de embrioni	19
1.2.2. Inducerea poliovulației la donatoare.....	24
1.2.3. Alegerea receptoarelor	31
1.2.4. Sincronizarea receptoarelor	32
1.2.5. Recoltarea embrionilor	34
1.2.5.1. Tehnici nechirurgicale de recoltare.....	34
1.2.5.2. Tehnici chirurgicale de recoltare ...	36
1.2.5.3. Accidente și complicații posibile	39
1.2.6. Evaluarea embrionilor	41
1.2.6.1. Definiția evaluării viabilității	42
1.2.6.2. Evaluarea embrionilor pe criteriul morfologiei embrionare	50
1.2.6.3. Evaluarea embrionilor pe criteriul dezvoltării în cultură	52
1.2.6.4. Evaluarea embrionilor pe criteriul metabolismului substraturilor fluorescente	54

1.2.6.5. Evaluare embrionilor pe criteriul fluorescenței celulelor moarte	55
1.2.6.6. Evaluarea metabolismului embrionar. Respirația embrionară	57
1.2.7. Conservarea embrionilor	59
1.2.8. Metode de transfer al embrionilor la oaie	61

Partea a II –a

Capitolul 2. Scopul lucrării, material și metodă	62
2.1. Scopul lucrării	62
2.2. Locul desfășurării experimentelor	65
2.3. Alegerea donatoarelor	66
2.4. Inducerea poliovulației	67
2.5. Recoltarea embrionilor	69
2.6. Identificarea, izolarea și evaluarea calității embrionilor.....	73
2.7. Alegerea receptoarelor	79
2.8. Sincronizarea receptoarelor	79
2.9. Transferul embrionilor	80
Capitolul 3. Rezultate și discuții	82
3.1. Rezultatele operațiunilor de recoltare și evaluare a embrionilor	82
3.2. Rata de gestație după transferul direct	113
3.3. Conservarea embrionilor	119
3.4. Evaluarea calității pe criterii morfologice după conservare.	121

3.5. Rata de gestație după decongelare	140
3.6. Riscurile microbiologice	144
3.7. Metode noi de evaluare a calității embrionilor.....	148
3.7.1. Metoda MTS	149
3.7.2. Metoda studiului metabolomic	152
3.8. Folosirea embriotransferului pentru a elimina agenți patogeni specifci	154
Capitolul 4. Concluzii și recomandări	162
Bibliografie.....	173

Introducere

Încă din anii 1980, când s-au raportat primele fătări de animale vii în urma embriotransferului, tehnicile de embriotransfer și procedurile de manipulare în vitro au evoluat susținute de o largă acceptare în programele de reproducție artificială la animalele domestice. Utilizarea metodelor de reproducție asistată continuă să crească în fiecare an, atât în domeniul veterinar cât și în medicina umană. Eforturile de accelerare a progresului genetic, a performanțelor de reproducție la animalele de fermă și în paralel eforturile de a învinge disfuncțiile reproductive la om s-au concentrat pe optimizarea ratei succesului în transferul de embrioni. Ratele mari de succes obținute în medicina umană sunt date de cele mai multe ori de transferul simultan a 2 sau chiar 3 embrioni. Apar astfel riscuri asociate, legate de posibilitatea apariției sarcinilor gemelare: nașteri premature, greutate mica la naștere sau afecțiuni cerebrale ale nou născutului. În aceste condiții, scopul cercetărilor se îndreaptă către descreșterea prevalenței sarcinilor multiple menținând în același timp sau chiar îmbunătățind ratele de sarcină obținute. Astfel au fost dezvoltate metode diverse pentru aprecierea viabilității embrionilor.

Exista astfel o presiune mare pe a dezvolta metode de evaluare a calității embrionilor care să ofere rezultate cât mai bune. Specia ovină a fost, pe parcursul ultimilor 30 de ani, atât beneficiarul biotehnologiei de transfer de embrioni cât și baza de experimentare pentru studiile realizate în domeniu, atât în România cât și în străinătate. Plecând de la această realitate și în contextul general al importanței transferului de embrioni, lucrarea de față își propune să

aducă o contribuție în domeniul de actualitate al evaluării calității embrionilor.

Lucrarea prezintă rezultatele operațiilor de embriotransfer în care s-a folosit metodă morfologică de evaluare a calității, atât înainte cât și după congelare, rezultate obținute în România, la Institutul Palas, Constanța și stațiunea Rusetu, Buzău, comparativ cu rezultatele publicate în literatură de specialitate internațională. În plus, comparativ cu rezultatele obținute după evaluarea morfologică sunt prezentate și alte tehnici de evaluare a calității utilizate în paralel. Abordând un domeniu extrem de dinamic, din dorința de a surprinde exact momentul actual în domeniul calității embrionilor sunt prezentate și ultimele tehnologii implementate în medicina umană în anul 2008, tehnologii ce nu presupun costuri prohibitive, care au fost testate pe mamifere și pe care ne așteptăm să le vedem folosite comercial și în zootehnie în următorii ani.

Este abordată și definiția termenului de evaluare a calității, corelat cu celelalte noțiuni asemănătoare folosite în literatura de specialitate, noțiuni care în esență presupun aceeași operațiune. De-a lungul anilor au fost utilizați mai mulți termeni pentru a descrie metodele de evaluare *in vitro* a embrionilor: "viabilitatea embrionară", "calitate embrionară" sau "potențial de dezvoltare".

Pentru că evoluăm într-un mediu economic competitiv, iar calitatea produselor și serviciilor oferite reprezintă principalul factor de diferențiere pe piață, un alt obiectiv al lucrării a fost realizarea unui set de recomandări pentru asigurarea managementului calității operațiilor de transfer de embrioni, insistând asupra etapei de evaluare a calității