

Artículo corto:

PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES BOVINOS (*Bos taurus*) EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

In vitro production of bovine embryos (*Bos taurus*) in two culture media

L.E. Pahuara¹, M. Naveros²

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga – Ayacucho.

²Instituto Nacional de Innovación Agraria Canaán – Ayacucho.

E-mail (Lariza Pahuara): larizaevelyn@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del sistema de cultivo KSOMaa y SOFaa sobre el porcentaje de blastocistos producidos a 7 días de cultivo y clasificar los embriones según las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). La producción *in vitro* de embriones bovinos fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho. Se trabajó con una muestra de 1699 ovocitos extraídos por aspiración folicular de 727 y 972 ovarios que se utilizaron para conformar los dos grupos de estudio. Los ovocitos seleccionados, con 3 a más capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo, fueron madurados *in vitro* por 24 horas para luego ser fecundados *in vitro* por 18 horas previo tratamiento espermático con Swim up y finalmente cultivados por 7 días en medio optimizado simple de potasio (KSOMaa) y fluido oviductual sintético (SOFaa) a 38.5°C, con 5% de CO₂ y 95% humedad relativa. El porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para KSOMaa y SOFaa fue de 37.39 % y 39.19% respectivamente, no existiendo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos, sin embargo el porcentaje de blastocistos a 7 días de cultivo para el grupo con medio SOFaa fue significativamente alto ($p < 0.05$) con respecto al grupo con medio de cultivo KSOMaa de un 17.66% versus un 11.64%. Se utilizó la prueba de T student para comparar los dos grupos. Finalmente los embriones fueron clasificados en cuatro categorías de calidad de acuerdo a las normas de la IETS. Para KSOMaa se encontró 0% de embriones de excelente calidad, 6.32% de regular calidad y 6.84% de mala calidad y con respecto al medio SOFaa se encontró solo 3.03% de excelente calidad, 8.69% de regular calidad y de 6.62% de mala calidad, estas 3 primeras categorías según la IETS lo recomienda como embriones transferibles. En conclusión el sistema de cultivo SOFaa proporciona un mejor desarrollo de blastocistos y de calidad con respecto a KSOMaa.

Palabras claves: *Bovinos, blastocisto, KSOMaa, SOFaa*

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of culture system KSOMaa and SOFaa on the percentage of blastocysts produced at 7 days of culture and classify embryos according to the norms of the International Embryo Transfer Society. The *in vitro* production of bovine embryos was carried out at the Laboratory of Reproductive Biotechnology of the Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho. It worked with a sample of 1699 oocytes extracted by follicular aspiration, 727 and 972 were used to form the two study groups. The oocytes selected, with 3 more layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were matured *in vitro* for 24 hours and then fecundated *in vitro* for 18 hours previous spermatoc treatment with Swim up and finally cultivated for 7 days in potassium simplex optimization medium (KSOMaa) and synthetic oviductal fluid (SOFaa) to 38.5 ° C, 5% CO₂ and 95% relative humidity. The percentage of embryo division at 48 hours post insemination KSOMaa and SOFaa was 37.39% and 39.19% respectively, there was no significant difference ($p > 0.05$) between the groups, however the percentage of blastocysts at 7 days of culture for medium SOFaa group was significantly higher ($p < 0.05$) compared to the group with KSOMaa medium a 17.66% versus 11.64%. Student T test was used to compare the two groups. Finally the embryos were classified into four categories according to quality standards IETS. For KSOMaa was found 0% of embryos of excellent quality, 6.32% of fair quality and 6.84% of poor quality and with respect to SOFaa was found only 3.03% of excellent quality, 8.69% of fair quality and 6.62% of poor quality, these first 3 categories according to the IETS classification constituent transferable embryos. In conclusion SOFaa the culture system provides better blastocyst development and quality with respect to KSOMaa.

Keywords: *Bovine, blastocyst, KSOMaa, SOFaa*

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado son: maduración, fecundación de ovocitos y cultivo de embriones, estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, donde cada uno condiciona el éxito o fracaso del siguiente. Aunque la tasa de maduración y fecundación in vitro de ovocitos bovinos es alta aproximadamente de 90 a 80%, la mayoría de ovocitos fecundados solo se dividen hasta la etapa de 2 a 4 células y no todos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto. Siendo la tasa de desarrollo de blastocisto in vitro entre 30 y 40 % (Mucci *et al.*, 2006). Esta última etapa en la producción in vitro de embriones bovinos, correspondiente al paso más prolongado y es el principal periodo que determina la eficiencia global del sistema, así como calidad de los embriones obtenidos. Se cree que la habilidad de los ovocitos para convertirse en embriones depende de la acumulación de información específica en forma de ARNm o proteínas (Sirard *et al.*, 2006). Y la evaluación precisa del embrión, es uno de los pasos más importantes para la transferencia de embriones bovinos. Aunque existen muchos métodos alternativos para determinar la viabilidad embrionaria, la evaluación basada en criterios morfológicos continúan siendo la más simple, rápida y confiable (Palma, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Aspiración y selección de ovocitos. Los ovocitos bovinos fueron extraídos por aspiración de los folículos de 2 a 7 mm de diámetro, del camal de Quicapata S.A. de la ciudad de Ayacucho. El contenido aspirado se depositó en un tubo falcón y se dejó decantar por aproximadamente 12 a 15 minutos para luego proceder a la selección bajo estereoscopio. Solo el complejo cumulus ovocito con 3 a más capas de células del cumulus y citoplasma homogéneo se seleccionó para este estudio.

Maduración y fecundación in vitro. Los ovocitos seleccionados fueron lavados 3 veces mediante el pasaje en gotas con medio TCM-199 Hepes suplementado con 10 % SFB y 50 µg/ml gentamicina para luego ser finalmente cultivados en medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 0.01U/ml de FSH/LH, 1µg/ml de 7β estradiol, 0.2 mM piruvato, 0.6Mm glutamina y 50µg/ml gentamicina. Se incubó por 24 horas a 38.5°C, con 5% de CO₂ y 95% humedad relativa. Finalizada la maduración se observó al estereoscopio y se seleccionó solo los ovocitos con células del cumulus bien expandidas (signo de una buena maduración ovocitaria). Luego de lavarlos 3 veces mediante el pasaje a través de gota, la fecundación se realizó en medio TALP-FIV suplementado con 6mg/ml BSA, 0.03mg/ml heparina, 0.2mM piruvato y 50µg/ml gentamicina. Se descongeló el semen de un mismo toro de probada fertilidad, el tratamiento con swim up, se usó para separar los espermatozoides motiles del semen y diluyentes. Se utilizó 20 µl de suspensión espermática con una concentración final de 1 a 2 x10⁶ esp/ml para la fecundación. Finalmente los ovocitos y espermatozoides fueron co-cultivados por 18 horas 38.5°C con 5% de CO₂ y 95% humedad relativa. A las 48 horas post inseminación se evaluó el número de embriones en división para cada grupo.

Cultivo de embriones in vitro. Después de 18 horas de la fecundación, el restante de células del cúmulus que rodea a los cigotos fue removido junto a los espermatozoides, durante 7 minutos en el vortex y lavados 3 veces mediante el pasaje a través de gota. Los cigotos fueron cultivados en dos medios, la composición de cada medio de cultivo se presenta en el figura 1.

Figura 1. Composición del medio KSOMaa y SOFaa para la producción in vitro de embriones bovinos

Componentes	KSOMaa	SOFaa
Sales inorgánicas (mM)		
NaCl (Matheson Coleman & Bell Div)	95	100
KCl (Matheson Coleman & Bell Div)	2.5	7
KH ₂ PO ₄ (Matheson Coleman & Bell Div)	0.35	1.2
CaCl ₂ +2H ₂ O (Matheson Coleman & Bell D)	1.71	1.71
MgCl ₂ +6H ₂ O (Matheson Coleman & Bell D)	-	0.49
NaHCO ₃ (Matheson Coleman & Bell Div)	25.07	25.07
SO ₄ Mg.7H ₂ O (Matheson Coleman & Bell D)	0.20	-
Rojo fenol	1mg/100ml	1mg/100ml
Otros componentes		
Lactato desodio (60%, mM) (Sigma-Aldrich)	21.9	3.3
Piruvato de sodio (mM) (Sigma-Aldrich)	0.6	0.4
Glutamina (mg/ml) (Sigma-Aldrich)	1.46	0.271
Aminoácidos esenciales (Sigma-Aldrich)	50x	50x
Aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich)	100x	100x
Ácido cítrico (mg/ml) (Matheson Coleman & Bell)	-	0.1
Myoinositol (mg/ml) (Sigma-Aldrich)	-	0.5
SFB (Caisson Labs)	-	2%
BSA (mg/ml) (Sigma-Aldrich)	3	8
Glucosa (mM) (Sigma-Aldrich)	0.2	-
EDTA (mg/ml)	3	-
Gentamicina (µg/ml)	100ul	50

Para KSOMaa se cultivó 10cigotos/50µl de medio cubierto en aceite mineral (densidad de 1:5)
 Para SOFaa se cultivó 25 cigotos/500 µl de medio en placas multipocillo (densidad de 1:20) (Tavares *et al.*, 2005).

El cultivo se mantuvo por 7 días a 38.5°C, con el 5% de CO₂ y 95% humedad relativa. Finalizado el cultivo se evaluó el desarrollo embrionario de mórulas y blastocistos y la clasificación embrionaria de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, ver la figura 2.

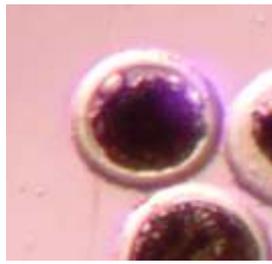
RESULTADOS

En la tabla 1, de un total de 1310 ovocitos fertilizados, 585 y 725 conformaron los grupos KSOMaa y SOFaa respectivamente; el desarrollo de los embriones bovinos a las 48 horas post inseminación fue similar para ambos sistemas de cultivos KSOMaa y SOFaa, no existiendo diferencia significativa (p>0.05) entre los dos medios con respecto al porcentaje de división embrionaria. El desarrollo embrionario hasta blastocisto fue mejor para SOFaa con respecto a KSOMaa existiendo diferencia significativa entre ambos sistemas de cultivo.

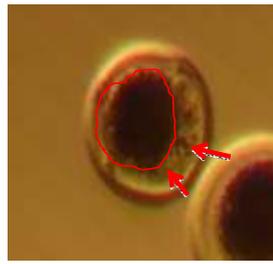
En la tabla 2, se muestra la clasificación de embriones según su calidad después de 7 días de cultivo en medio KSOMaa y SOFaa, las 4 categorías de calidad se establecieron de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Las 3 primeras categorías de clasificación según la IETS lo constituyen los embriones transferibles (Stringfellow and Givens, 2013).



Figura 2. Evaluación de la calidad embrionaria según la IETS



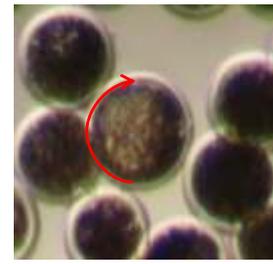
Calidad 1:
Mórula con presencia de blastómeros extruidos (85%)



Calidad 2:
Mórula con presencia de blastómeros extruidos (50%)



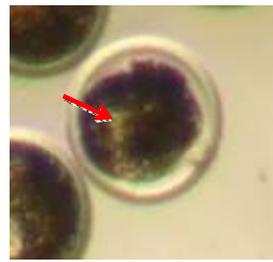
Calidad 3:
Mórula con presencia de blastómeros extruidos y de diferentes tamaños (25%)



Calidad 1:
Blastocisto con masa celular intacta y consistente con la etapa de desarrollo esperado



Calidad 2:
Blastocisto con la masa celular intacta y formación inicial del blastocele



Calidad 3:
Blastocisto temprano con formación inicial del blastocele y blastómeros extruidos



Calidad 4:
Blastocisto con zona pelúcida elongada



Calidad 4:
Embriones de 2 células (Con desarrollo retrasado)

2).

Estas diferencias podrían tener un efecto en el desarrollo embrionario en este estudio. Esta misma tendencia es reportado por Sagirkaya *et al.* (2006), quienes concluye que la condición de cultivo en medio SOF permite un mayor desarrollo embrionario bovino en la etapa de blastocisto con respecto a KSOM y CR1 (32,77 versus 22,67 y 23,08 %) y en la expresión de los genes embrionarios. Además Nedambale *et al.* (2004), concluye que la renovación del medio de cultivo tiene un efecto directo sobre el porcentaje de embriones, quien obtuvo con KSOM/0.1% BSA+ SOF/5% FCS una mejor tasa de mórulas de 47% y blastocistos temprano en 26%, en comparación con solo el medio KSOM/0,1%BSA observando un desarrollo lento. Por otra parte Quintanilla (2012), reporta todo lo contrario concluyendo que la tasa de blastocistos, no difieren entre los medios de cultivo así sea con solo medio KSOM o renovado con SOF dentro de los 7 días de cultivo (20,88% y 17,95% solo KSOMaa y de 14,64% y 15,75% para medio de KSOMaa/SOFaa). Además en este estudio los embriones bovinos fueron clasificados al final del cultivo según el sistema de codificación normado por la IETS, que consiste en una evaluación subjetiva, basada en la integridad morfológica de los embriones (Stringfellow and Givens, 2013).

La población de embriones de categoría 4 para ambos medios de cultivo es superior con respecto a las tres primeras categorías, este grupo está conformado por embriones degenerados, con desarrollo retardado y embriones de una célula: no viables. El desarrollo deficiente de los embriones se debe a la suma de varios factores como las condiciones de cultivo subóptimas y el resultado de una reducción de la competencia para el desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados in vitro, ya que parece ser que existe factores moleculares, celulares y/o genéticos, intrínsecos al ovocito

y/o embrión, que poseerían un papel mucho más significativo en la determinación del potencial de desarrollo (Krisher, 2004; Sirard *et al.*, 2006).

Tabla 1. Desarrollo de embriones bovinos en dos medios de cultivo

DwÚth	Número de ovocitos	Número de ovocitos madurados (%)	Número de ovocitos fecundados	Número de embriones en división a las 48 h post inseminación (%)	Embriones a los 7 días de cultivo		
					Número de mórulas comp (%)	Número de blastocistos (%)	Número total de embriones (%)
KSOMaa	727	585 (77,11) ^a	585	217 (37,30) ^a	8 (1,42)	69 (11,64) ^a	77 (13,06)
SOFaa	972	725 (75,04) ^a	725	286 (39,19) ^a	16 (1,97)	117 (17,66) ^a	133 (19,63)

^aInterales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p< 0,05), Prueba T Student.

Tabla 2. Clasificación de embriones bovinos acuerdo a las normas de la IETS

DwÚth	Número de ovocitos fecundados	Clasificación de los embriones bovinos según su calidad			
		Número de embriones C1 (%)	Número de embriones C2 (%)	Número de embriones C3 (%)	Número de embriones C4 (%)
KSOMaa	585	0 (0,0%)	27 (6,32)	40 (6,84%)	508 (86,84%)
SOFaa	725	22 (3,03%)	63 (8,69)	48 (6,62%)	592 (81,66%)

CONCLUSIÓN

En conclusión el desarrollo de los embriones hasta blastocistos en medio SOFaa proporciona un mayor porcentaje con respecto al medio KSOMaa, sin embargo la calidad se encuentra influenciada por la competencia para el desarrollo y las condiciones subóptimas de cultivo, ambas se combina para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Estación Experimental Agraria Canaán - Ayacucho, por brindarme las facilidades del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva

REFERENCIAS

- Holm P, Booth P, Schmidt M, Greve T, Callesen H. 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* 1999; 52:683-700.
- Krisher R. The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science* 2004; 28:E14-23.
- Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Rev. Electrónica UACB* (Artículo de revisión) 2006; 38:97-102.
- Nedambale T, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky J, Tian X, Yang, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2004; 62:437-449.
- Palma, G. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Edit. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2001.
- Quintanilla Mejía, Lisbeth G. Efecto de la suplementación del medio de maduración con cisteína y dos medios de cultivo (KSOM aa y SOF) en la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos (tesis de pregrado) Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. Developmental and molecular correlates of bovine pre implantation embryos. *Reproduction the journal of the society for reproduction and fertility* 2006; 131:895-904.
- Sirard M A, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65:126-136.
- Stringfellow D, Givens M, editors. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 4 th Edition. Champaign, Illinois USA. Page 87-90 and 141-144, 2013.
- Wrenzycki C, Hermann D, Keskinetepe I, Martins A, Sirisathien S, Brackertt B, Niemann H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human reproduction and Embryology* 2001; 16:893-901.
- Tavares A, Lopes R, Rodrigues J. Genes expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. *Theriogenology* 2005; 64:1559-1572.

