

Artículo corto:

VELOCIDAD DE DESARROLLO A BLASTOCISTO DE EMBRIONES BOVINOS OBTENIDOS *in vitro*

Developmental speed to blastocyst of bovine embryos production *in vitro*

D. Dípaz, E. Ancco, C. Oriundo, C. Quispe, E. Mellisho

*Laboratorio de Biotecnología Reproductiva "Carlos Rodríguez Villegas", Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
E-mail (Deysi Dípaz): dj.dipaz.unsmb@gmail.com*

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la velocidad de desarrollo a blastocisto de embriones bovinos obtenidos *in vitro*, a los días 6, 7 y 8 post fecundación. Un total de 242 COC's de calidad A y B, fueron recuperados de ovarios obtenidos de matadero y colocados en gotas de maduración por 22 a 24 horas. Los ovocitos fueron fecundados con semen congelado comercial. La selección espermática se realizó utilizando una gradiente de Percoll 45/90%. La fecundación fue realizada con 10 µl de solución de espermatozoides (concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml) en 60 µl de medio de fecundación conteniendo 8 a 10 ovocitos e incubados por 18 a 22 horas. Posteriormente, los cigotos fueron lavados y transferidos a medios de cultivo en microgotas de 70µl cubiertas con aceite mineral, y fueron cultivados a 38.5°C con 5% CO₂ y >90% humedad. Los días 6, 7 y 8 de cultivo (día 0; día de fecundación) la producción de blastocistos fue evaluada identificando el blastocele en los embriones. La tasa de blastocistos fue de 18,7% (día, 6), 28,1% (día, 7) y 5,8% (día, 8).

Palabras clave: *Bovino, embrión, in vitro, blastocisto.*

ABSTRACT

The objective was to evaluate the rate of blastocyst development of bovine embryos *in vitro*, at 6, 7 and 8 post fertilization. A total of 242 COC's quality A and B, were recovered from ovaries obtained at a slaughterhouse and placed on drops of maturation for 22 to 24 hours. The oocytes were fertilized with commercial frozen semen. Sperm selection was performed using Percoll gradient 45/90%. Fertilization was carried out with 10 µl of sperm solution (final concentration of 1×10^6 spermatozoa/ml) in 60 ul of fertilization medium containing 8 to 10 ovocitos and incubated for 18 to 22 hours. Subsequently, the zygotes were washed and transferred to microdrops culture media covered with 70µl mineral oil, and cultured at 38.5 °C with 5% CO₂ and > 90% humidity. Days 6, 7 and 8 of culture (día0; fertilization day) production of blastocysts was assessed by identifying the blastocoel in embryos. The blastocyst rate was 18.7% (day 6), 28.1% (day 7) and 5.8% (day 8).

Keywords: *Bovine, embryo, in vitro, blastocyst*



INTRODUCCIÓN

Los ovarios de vaca representan una fuente abundante y desaprovechada de germoplasma; sólo al nacimiento hay más de 133,000 folículos primordiales (Erickson, 1966; Picton 2001). No obstante, hay que considerar que dicho número declina con el tiempo para reducirse a unos 3,000 folículos en vacas de 15 a 20 años de edad (Erickson, 1966). Además, hay que tener presente que, en condiciones naturales, menos del 0,1% de los folículos llegan a ovular (Gosden, 1998). La mejora en las técnicas de producción de embriones *in vitro* en el ganado vacuno ha dado lugar a un espectacular incremento en la transferencia de embriones de vacuno producidos *in vitro*. Estas tecnologías aceleran el progreso genético, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades e incrementan el número de animales que pueden criarse a partir de vacas de alto valor genético (Brison & Schultz, 1997). Datos estadísticos de la IETS informan que durante el año 2012 a nivel mundial se produjeron 443,533 embriones *in vitro* bovinos, de los cuales 3849,999 fueron transferidos (348,238 transferidos en fresco y 36 congelados) (IETS, 2013). La tasa de crecimiento embrionario es más lenta *in vitro* que *in vivo* y existe un menor número de células por blastocisto (O'Neil, 1997). El desarrollo potencial de los embriones se encuentra afectado por varios factores, entre los cuales podemos incluir el medio de cultivo, la calidad ovocitaria, la densidad ovocitaria o embrionaria, la presencia de suero y los factores de crecimiento parácrinos y autócrinos embriotróficos, en el desarrollo normal (Brison & Schultz 1997, Makarevich & Markkula 2002).

El genoma del cigoto no está activado en los estadios embrionarios iniciales, las primeras divisiones celulares pueden realizarse de modo apropiado. El ovocito bovino posee toda la dotación de ARNm y proteínas necesarias para alcanzar el cuarto o quinto ciclo celular. Sin embargo, el embrión no continuará su desarrollo más allá del estadio de 8 – 16 células si su propio genoma no se activa correctamente y en el momento adecuado (Betts and King 2001). El objetivo de este trabajo fue evaluar la velocidad de desarrollo a blastocisto de embriones bovinos producidos *in vitro*, los días 6, 7 y 8 post fecundación.

MATERIALES Y MÉTODOS:

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva “Carlos Rodríguez Villegas” de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima – Perú. El laboratorio *in vitro* trabaja con procedimientos estandarizados de tecnología de Vitrogen®, Brasil, para producir blastocistos *in vitro*, a nivel comercial.

Colección y maduración *in vitro* de ovocitos.

Los ovarios fueron colectados del camal y transportados en condiciones isotérmicas con solución salina fisiológica a 35-37 °C. Para la obtención de los complejos cúmulos – ovocitos (COCs), se aspiraron los folículos entre 2 y 8 mm de diámetro con PBS+ 1% SFB con aguja N° 18, dentro de las 2 a 4 horas después de sacrificados los animales. Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a la morfología de las células del cúmulus oophorus en categorías A, B, C y D, según el número de capas del cúmulus que cubren al ovocito. Se seleccionaron los ovocitos de calidad A y B como viables para el procedimiento de maduración *in vitro* (Sato *et al.*, 1990). Los ovocitos seleccionados fueron colocados en placas petri

(35x15mm), se lavaron tres veces en medio H-199 (Vitrogen®, Brasil) y tres veces en el medio de maduración MIV (Vitrogen®, Brasil). Se transfirieron a gotas de maduración MIV de 70 µl cubiertas con aceite mineral (previamente equilibrada por 2 horas en la incubadora). Se colocaron 8 a 10 ovocitos por gota y fueron incubados a 38.5 °C, 5% de CO₂ y >90% humedad por 22 - 24 horas.

Fecundación *in vitro*

Antes de realizar la fecundación, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación FIV (Vitrogen®, Brasil) 2 a 3 veces y fueron colocados en gotas de 70 µl de medio de FIV previamente equilibrados en la incubadora (38.5°C y 5% CO₂). La capacitación y selección espermática se realizó por gradiente de densidad de Percoll 45/90% con semen convencional. La fecundación fue realizada con 10 µl de solución de espermatozoides (concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides/ml) en 60 µl de medio de fecundación conteniendo 8 a 10 ovocitos y fueron incubados por 18 a 22 h a 38.5 °C, 5% de CO₂ y >90% humedad.

Cultivo de embriones

Luego de la fecundación, los cúmulos de los ovocitos fueron removidos completamente de los ovocitos y se lavaron en medio de cultivo CIV (Vitrogen®, Brasil). Luego fueron colocados en placas de Petri estéril de 35 x 15mm en grupos de 10 ovocitos por cada gota de 70 µl con medio de cultivo CIV, previamente equilibrada a 38.5°C y 5% CO₂ y cubiertas de aceite mineral y llevados a la incubadora a 38.5°C, con 5% CO₂ y >90% de humedad por 48 horas, tiempo en el cual se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo y el día 5 se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo. Los días 6, 7 y 8 de cultivo (día 0; día de fecundación) la producción de blastocistos fue evaluada identificando el blastocelo en los embriones. La tasa de blastocistos fue determinada en base al número de ovocitos madurados *in vitro*.

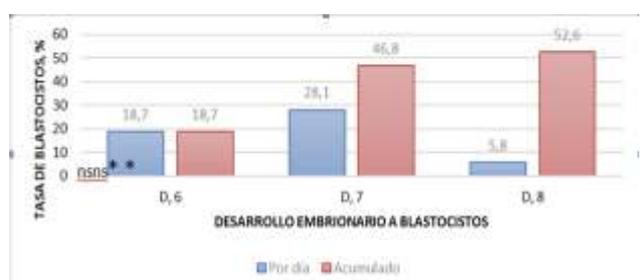
Análisis de datos.

Las diferencias en las tasas de velocidad de desarrollo embrionario entre los días 6, 7 y 8 fueron analizadas con prueba Chi cuadrado.

RESULTADOS

Un total de 242 ovocitos fueron analizados para este experimento. La tasa de desarrollo a blastocisto se presenta en la figura 1, evaluados los días 6, 7 y 8 individualmente, así como también el porcentaje acumulado de los días 6+7 y 6+7+8 post fecundación *in vitro*.

Figura 1: Tasa de desarrollo embrionario a etapa de blastocisto los días 6, 7 y 8 post fecundación *in vitro* en bovinos.



DISCUSIÓN

Al comparar la tasa de velocidad de desarrollo embrionario a blastocisto post fecundación *in vitro* en bovinos entre los días 6 vs 7, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre la tasa de embriones que alcanzaron al estadio de blastocisto a los días 7 vs. 8 y 6 vs. 7 (ver figura 1).

El medio ambiente nutricional soportado por el medio de cultivo *in vitro* (MIV, FIV, CIV, Vitrogen®, Brasil) durante el desarrollo embrionario temprano a blastocisto es muy importante en la velocidad de desarrollo y en la posterior calidad del blastocisto.

Nedambale *et al.* (2004) reportaron que el medio SOF acelera el desarrollo embrionario en cultivo a blastocisto a 22% (día 6), 9% (día 7) y 7% (día 8) de embriones que llegaron a blastocisto, mientras que en el medio KSOM la tasa de blastocistos fue de 7% (día 6), 21% (día 7) y 15% (día, 8). Además, los blastocistos al día 7 producidos con medio SOF tenían mayor número de blastómeros 115, versus 99 en el medio KSOM, indicando mayor calidad embrionaria a mayor número de blastómeros.

La producción de blastocistos al día 7 está influenciado por la expresión génica del genoma embrionario la cual se define por la calidad de los espermatozoides utilizados en la fecundación, Presicce *et al.* (2011) reportaron una producción de 39.8% blastocistos utilizando semen convencional (día 7) versus un 25.0% blastocistos utilizando semen sexado (día 7), tasa de blastocistos (46.8% al Día 7) muy similares a los reportados en nuestro trabajo.

La diferencia de velocidades de desarrollo al estadio de blastocisto, son marcados por diferentes factores, los más cruciales como en todo ser vivo es el genoma y el ambiente de cultivo. El ovocito bovino posee toda la dotación de ARNm y proteínas necesarias para alcanzar el cuarto o quinto ciclo celular. Asimismo, los ovocito I deben contar con cúmulus completo y compacto, para así completar la maduración *in vitro* (Süss *et al.*, 1983) y alcanzar el completo desarrollo esperado.

CONCLUSIÓN

En conclusión, la velocidad de desarrollo a blastocisto de embriones bovinos obtenidos *in vitro* fue adecuada y alta los días 6 y 7 (46.8%) post fecundación en medio de cultivo comercial. El retraso de desarrollo al día 8 (5.8%) posiblemente se deba a sus limitaciones en la expresión génica embrionaria.

REFERENCIAS

- Betts D and King W. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001;55:171-191.
- Brison D and Schultz R. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for role for survival factors including transforming growth factor α . *Biology of reproduction* 1997; 56:1088-1096.
- Erickson BH. Development and radio response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1966; 11: 97-105.

- Gosden RG. Biology and technology of primordial follicle development. In: Gametes development and function, Rome. *Anais. Rome: Serozo Symposia*; 1998. p. 71-83.
- IETS. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *International Embryo Transfer Society*, December 2013, 23p.
- Makarevich A. and Markkula M. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor-I during *in vitro* maturation and culture. *Biol. Reprod.* 2002; 66:386-392.
- Nedambale TL, Dinnye A, Groen W, et al. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2004; 62: 437-449
- O'Neill C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse pre-implantation embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1997;56: 229-237.
- Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001;55(6): 1193-1210.
- Presicce GA, XuJ, Gong G, Moreno JF, et al . Oocyte Source and Hormonal Stimulation for In Vitro Fertilization Using Sexed Spermatozoa in Cattle. *Veterinary Medicine International* 2011; 1-8
- Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J Anim Sci*; 1990. 68: 1182-1187.
- Süss U and Madison V. Morphology and meiosis of bovine oocytes taken from ovaries collected after slaughter. *Experientia* 1983; 39: 674.

