

**DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS IN VITRO DESPUÉS DE LA
FECUNDACIÓN DE OVOCITOS USANDO SEMEN DE DIFERENTES TOROS**

In vitro development of bovine embryos after fertilization of oocytes using semen
from different bulls

E. Ancco, D. Dipaz, C. Quispe, K. Oriundo, E. Mellisho

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.29>

*Laboratorio de Biotecnología
Reproductiva, Departamento
Producción Animal, Facultad
de Zootecnia, Universidad
Nacional Agraria La Molina.*

E-mail:
edith_ag18@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de 4 toros diferentes en la fecundación *in vitro* de ovocitos en bovinos y desarrollo a blastocisto. Los ovarios fueron recuperados en el matadero y transportados al laboratorio. Los complejo cúmulos-ovocito (COCs) fueron recuperados por aspiración folicular con una aguja de 18G, usando PBS suplementado con gentamicina 70ug / ml y 1% de suero fetal bovino. Se recuperaron 1608 COCs y fueron asignados para cada toro. Posteriormente, los COCs fueron madurados durante 22-24 h. antes del cultivo *in vitro*. Los ovocitos fueron fecundados utilizando espermatozoides que se descongelaron a 37°C de cuatro toros de raza Holstein. La selección de espermatozoides móviles se llevó a cabo mediante gradiente de densidad Percoll con 90/45%. La fecundación se realizó utilizando 4 a 5 μ l de los espermatozoides (concentración final 20 x 10⁶ espermatozoides / ml) en 70ul de medio de fecundación que contiene 10 ovocitos. Los gametos fueron incubados durante 18 a 22 horas a 38.5°C bajo 5% de CO₂ a >85% de humedad. Inmediatamente, los cigotos se lavaron y se transfirieron a medio de cultivo en microgota de 70ul cubierto con aceite mineral. En el día 7 del cultivo, la producción de blastocistos se evaluó identificando el blastocelo en los embriones. Las tasas de división y blastocistos por ovocitos madurados se registraron en el día 3 y 7 días después de la inseminación, respectivamente. No se encontró diferencia significativa (P>0.05) en la tasa de división y blastocistos entre los cuatro toros. La tasa de división para los toros varió entre 77.7 a 87.8% y la tasa de blastocistos entre 25.7 a 35.3%. En conclusión no se hallaron diferencias entre los cuatro toros evaluados con respecto a la tasa de blastocistos, siendo el promedio 31.39%.

Palabras clave: *embrión, bovino, blastocisto, IVF.*

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect for 4 different bulls on *in vitro* fertilization of bovine oocytes and blastocyst development. Bovine ovaries were collected at an abattoir and transported at laboratory. Cumulus–oocyte–complexes (COCs) were recovered by follicle aspiration with an 18G needle and syringe, using PBS supplemented with gentamicin 70ug/ml and 0.1% FCS, this solution was used for holding oocytes during the recovery procedure. The COCs (n=1608) recovered were assigned to each bull. Subsequently, the COCs in each treatment group were matured for 22–24 h before *in vitro* culture. Oocytes were fertilized using sperm thawed at 37°C four Holstein bulls. A selection of motile spermatozoa was carried out by gradient centrifugation with 90/45% discontinuous Percoll density. Fertilization was performed using 4 or 5 ul of spermatozoa (final concentration 20 x 10⁶ sperm / ml) in 70ul of IVF medium containing 10 oocytes. The gametes were incubated for 18 to 22 h at 38.5°C under 5% CO₂ in > 85% humidified. Immediately, zygotes were washed and transferred to culture medium in microdrop of 70ul covered with mineral oil. On day 7 of culture, the blastocyst production was evaluated identifying the blastocele in the embryos. Cleavage and blastocyst rates per oocyte inseminated were recorded on Day 3 and Days 7 after insemination, respectively. There was no significant difference (P>0.05) in blastocyst rate among the four different Bulls. The cleavage rate for several bulls between 77.7 to 87.8% and the blastocyst rate between 25.7 to 35.3%. In conclusion, no differences among the four bulls evaluated for blastocyst rate was found, with an average 31.39%.

INTRODUCCION

Antes de usar un toro en los programas de reproducción es recomendable conocer su fertilidad potencial. En muchos casos no es suficiente que haya tenido algunas crías, es deseable conocer la fertilidad con un grado de exactitud, en especial cuando se usa en programas de inseminación artificial y monta natural de un gran número de hembras (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Actualmente existen muchos reportes que indican que el toro afecta la fertilidad en el ganado lechero y sus valores fenotípicos (inseminaciones) y genéticos (PTA) lo demuestran. En abril de 2014, el Laboratorio del Programa de Mejoramiento de USDA (Animal Improvement Programs Laboratory-AIPL) reportaron la

evaluación de inseminaciones de 1,531 toros Holstein de centrales de inseminación, los cuales su tasa de concepción de toros (SCR) en promedio fue de +0.42 (rango -10.4 a +14.2). En cuanto a valores de habilidad genética transmisible en fertilidad correspondiente a tasa de preñez de hijas (PTA-DPR) para abril de 2014, el promedio fue +1.03 (rango -1.9 a +4.1).

La predicción de la capacidad fecundante del espermatozoide es técnica y económicamente muy importante, en especial cuando trabaja con reproductores que están en centrales de inseminación. Los investigadores en el mundo han desarrollado varias pruebas relacionadas con la calidad de semen y su morfología, presencia de cromosoma intacto, integridad de membrana plasmática, reacción acrosómica (Januskauskas *et al.*, 2000), etc.

La fecundación *in vitro* se ha desarrollado y utilizado para la producción de crías de alto valor genético de diferentes especies (Palmer *et al.*, 1991). Esta técnica implica la maduración *in vitro* de ovocitos (IVM), fecundación *in vitro* de ovocitos (IVF) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fecundados (IVC) hasta el estadio de blastocisto. A través de los años en muchos estudios realizados en bovinos, han demostrado que el donante del semen influye en gran medida el resultado fecundación y cultivo de embriones (Shamsuddin y Larsson, 1993). A los ensayos de fertilidad *in vitro* se denominan prueba de penetración espermática (Gadea *et al.*, 1998), en la cual los espermatozoides demuestran su habilidad para penetrar la zona pelúcida y realizar una fecundación y completar su desarrollo.

Un procedimiento de fecundación *in vitro* puede ser una de las alternativas más relevantes para determinar tempranamente la potencialidad fértil de los futuros donadores de semen. En tal sentido para el presente estudio tenemos como objetivo; determinar el efecto de 4 toros diferentes en la tasa de producción y desarrollo de embriones *in vitro* en bovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó durante los meses de Junio - Agosto en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú.

Los ovarios de matadero fueron trasladados en un recipiente isotérmico al laboratorio. El tiempo transcurrido entre el beneficio de los animales y la llegada al laboratorio fue siempre inferior a 3 horas. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución. Los COCs fueron aspirados de los folículos de tamaño entre 3 a 8 mm con aguja 18G de 1 ½ pulgadas usando PBS suplementado con gentamicina 70ug / ml y 1% de suero fetal bovino. El contenido folicular fue colectado en un tubo cónico de 50 ml (Falcon®). Culminado el proceso de aspiración folicular, se mantuvo por 5 minutos adicionales para favorecer la sedimentación de los ovocitos. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron visualizados bajo un microscopio estereoscópico entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm (Falcon® 1008) conteniendo medio H-199® (Vitrogen, Brasil), para ser clasificados bajo un aumento de 40X. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (De Loos *et al.*, 1989: (1) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cúmulus con citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente por células del cúmulus y citoplasma irregular, (3) ovocitos desnudados y (4) ovocitos rodeado por fibrina, con aspecto de tela de araña. Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*. Después de la clasificación, los COCs fueron lavados tres veces en medio transporte H-199® y tres veces en medio de maduración MIV® (Vitrogen, Brasil) previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas. La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 70 μ l de medio de maduración MIV® cubierta con aceite mineral estabilizada (Sigma M3516) en placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon® 1008) e incubadas a 5% CO₂, 38,5 °C y máxima humedad por 22 a 24 horas.

Después de la maduración, los ovocitos fueron retirados del medio de maduración y lavados tres veces en medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) y seguidamente fueron colocados en grupos de 8 a 10 en microgotas de 70 μ l de medio de fecundación FIV® en placas de cultivo (Falcon® 1008) de 35x10 mm, cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas, posteriormente se adicionó 4 a 5 μ l de suspensión de espermatozoide seleccionados y capacitados en medio FIV®.

La preparación de los espermatozoides se realizó descongelando pajillas de 0,5 ml de semen congelado de cuatro toros Holstein diferentes a 37 °C por 30 segundos. Para seleccionar los espermatozoides se utilizó el método de Percoll 90/45, en un microtubo de 1,5ml de colocó 500 μ l de percoll 45 (Vitrogen, Brasil)

en gradiente superior y 500 μ l de percoll 90 (Vitrogen, Brasil) en el gradiente inferior y en la parte superior 200 μ l de semen, se llevó a la primera centrifugación a 3000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, para la capacitación, al pellets se le adicionó 500 μ l de medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) repetidamente se llevó a centrifugar a 3000 RPM por 5 minutos. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la porción rica en espermatozoides, se procedió a analizar la calidad y cantidad, para estandarizar a una concentración final de 20 x 10⁶ espermatozoides motiles por ml, siendo la dosis espermática por ovocito de 8 a 10,000, sembrada en 4 a 5 μ l a los microgotas de fecundación que poseen 8 a 10 ovocitos maduros, incubados previamente a 38.5 °C y 5% de CO₂.

Aproximadamente 18 horas post inseminación, se desnudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron tres veces en medio de cultivo CIV® (Vitrogen, Brasil) antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo CIV de 70 μ l (8 a 10 ovocitos), cubiertas de aceite mineral. Las placas de cultivo 35x10mm (Falcon®, 3001) fueron incubadas a 38,5°C, 5% CO₂, >85% de humedad. A las 48 horas del cultivo se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo CIV® y la evaluación de división embrionaria, así mismo se retiró el restante de las células del cúmulus. El día 4 del cultivo se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo CIV®. Las tasas de división y blastocistos (figura 1) por ovocitos madurados se registraron en el día 3 y 7 días después de la inseminación, respectivamente. No se encontró diferencia significativa (P>0.05) en la tasa de división y blastocistos entre los cuatro toros diferentes.

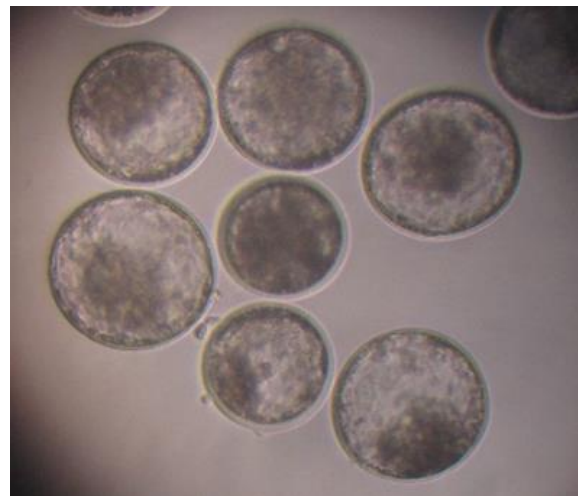


Figura 1: Blastocistos producidos in vitro, al día 7 post IVF

Se utilizó un diseño completamente al azar y para la comparación de medias se utilizó una prueba de Duncan a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Los ovocitos fueron asignados aleatoriamente para cada tratamiento. Los parámetros evaluados fueron motilidad, tasa de división y blastocistos *in vitro*.

RESULTADOS

En la tabla 1, presentamos datos de producción de blastocistos *in vitro*, según las características de los 4 toros diferentes. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de blastocistos entre los toros evaluados ($P \leq 0.05$).

Tabla 1: Número y porcentaje de blastocistos en relación con los ovocitos fecundados por toro.

TORO	Motilidad Total, %	#COCs (n)	Tasa de división (d,3).	Tasa de blastocistos (d, 7)
1	72.72±18.98 a	570	79.4	34.62 ± 8.34 a (197/570)
2	71.3±11.18 a	559	85.7	29.91 ± 8.55 a (167/559)
3	76.97±13.33 a	254	87.9	35.32 ± 11.1 a (90/254)
4	64.85±17.29 a	225	77.7	25.71 ± 1.36 a (58/225)

^{a,b}Letras diferentes dentro de una misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

El mejor indicador de eficiencia en producción de embriones *in vitro* es la cantidad y calidad de blastocistos producidos al día 7 post fecundación. Esto es muy importante, debido a que existen evidencias que sugieren que el periodo de maduración, fecundación y cultivo de embriones puede afectar su potencial de desarrollo temprano embrionario y junto a la calidad del ovocito es la llave determinante para obtener los blastocistos de calidad y cantidad (Lonergan *et al.*, 2006).

En nuestro estudio la tasa de blastocistos *in vitro* no fue diferente entre los toros, a pesar de que la fertilidad de los toros es variable tanto en campo como en la producción de embriones *in vitro* (Watanabe, 2001), siendo el toro muy importante en el resultado final del proceso de IVF. Existen otros estudios que reportan tasas de blastocistos similares, Presicce *et al.* (2011) de 39.8%, Dayan (2001) de 36.2%.

La producción de embriones *in vitro* en bovinos tiene 3 pasos esenciales. En el primer paso de maduración *in vitro* aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros y recuperado de los folículos (profase I) llegan a tener maduración nuclear (metafase II), de allí cerca del 80% son fecundados luego de la inseminación y desarrollan a dos células. No obstante, que solo el 30 a 40% de los ovocitos iniciales tienen

la capacidad para llegar al estado de blastocistos, convirtiéndose en la etapa más crítica en el periodo de desarrollo de 2 células a blastocisto (Rizos *et al.*, 2002). Similares resultados reportó, Fernández *et al.* (1999) reportó una tasa de fecundación de 74% con uso de semen de toros *Bos indicus* y *Bos taurus*.

Existe evidencia que los patrones de transcripción de ARNm (materno y fetal) estén alterados en especial cuando se manipula ovocitos y embriones *in vitro*, por lo el bloqueo al desarrollo embrionario es el que más afecta en el éxito de la producción de blastocistos *in vitro* en bovinos (Lonergan *et al.*, 2006).

CONCLUSIÓN

No se hallaron diferencias entre los cuatro toros evaluados con respecto a la tasa de blastocistos, siendo el promedio 31.39%. El desarrollo embrionario fue similar hasta el estadio de blastocisto.

REFERENCIAS

- Dayan A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. Tese magistral. Universidad Estadual Paulista- Brasil. 2001.

- De Loos F, Van Maurik P, Kruijff TA. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 1989; 24(2):197-204.
- Fernandez A, Bastidas P, Troconiz J. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* 1999 40(2); 89-100.
- Gadea J, Mata's C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 1998; 54: 95–108.
- Januskauskas A, Johannisson A, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2000, Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859-875.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science* 2000; 60–61: 327–336.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 2006; 65:137–152
- Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G. *In vitro* in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil* 1991; 44: 375–384.
- Presicce GA, Xu J, Gong G, Moreno JF, Chaubal S, Xue F, Bella A, Senatore EM, Yang X, Tian XC, Du F. Oocyte source and hormonal stimulation for *in vitro* fertilization using sexed spermatozoa in cattle. *Vet Med Int.* Sep 5; 2011.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:234–48.
- Shamsuddin M, Larsson B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Domest. Anim.* Vol nr 1993; 28: 77–84.
- Watanabe MR. Aspiração *in vivo* de oócitos em fêmeas nelore de diferentes idades reprodutivas mediante punção transvaginal guiada por ultrassom. Teses magistral. Universidad Estadual Paulista- Brasil. 2001.