

EVALUACIÓN DE DOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES BOVINOS

COMPARISON OF TWO CULTURE MEDIA OVER THE IVP OF BOVINE EMBRYOS

Vicente Mejía Isaza¹, Santiago Arango Duque¹, Andrés Pareja Lopez²,
Omar Camargo Rodriguez³, Rodrigo Urrego Alvarez⁴

Recibido El 22 de julio de 2009 y aceptado El 20 de noviembre de 2009

Resumen

Tanto en la industria lechera como en la de carne, las diferentes biotecnologías reproductivas pueden mejorar la eficiencia productiva, entre ellas la PIV de embriones bovinos además de presentar importantes oportunidades de aplicación comercial, es una importante herramienta para el estudio de fenómenos biológicos. Los medios de cultivo utilizados para los procesos realizados en la PIV bovina están formulados en base a la presencia de iones, azúcares y aminoácidos (aa) en el ambiente uterino y oviductal, en el momento de la liberación del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. El objetivo de este estudio fue evaluar dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones bovinos sobre la tasa de blastocistos producidos. Para el protocolo I el medio de desarrollo utilizado fue el CR-1 preparado en nuestro laboratorio y en el protocolo II se utilizó un medio KSOMaa comercial, siendo esta la única diferencia entre los protocolos empleados. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza y una prueba de Fisher. Un total de 488 y 631 ovocitos fueron usados para conformar los grupos de estudio del medio KSOMaa (evolve[®]) y el CR1aa, respectivamente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), tanto para la tasa de clivaje como para el porcentaje blastocistos obtenidos en cada uno de los protocolos. En conclusión estos resultados indican la importancia de la calidad del agua utilizada en la preparación de los medios de desarrollo embrionario.

Palabras clave

Producción *in vitro*, bovino, embrión, desarrollo temprano.

Abstract

On cattle production both dairy and meat industries, can improve productivity by using commercial reproductive biotechnology like IVP of bovine embryos, which is also used in a variety of scientific studies. The culture media used on the IVP processes are created to simulate natural condition's of the oviduct and uterus at the moment of ovulation, fertilization and early embryo development. The objective of this study was to compare two protocols for IVP of bovine embryos evaluating blastocyst production rates. Experiment I used CR-1 produced in our lab for the embryo culture (631 oocytes), experiment 2 used KSOM (commercial) for the embryo culture (488 oocytes). The statistical study was made by an ANOVA and a Fisher test. The results revealed statistically important differences between experiments on all of the parameters that were evaluated. These results indicated that the quality of the water used on preparation of media for embryo culture affects the embryo development.

Key words

In vitro production, bovine, embryo, early development.

¹ Est MVZ Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES

² Zoot MSc. Grupo de Investigación xxx. Programa de Biología CES-EIA

³ MVZ MSc Grupo Biogénesis, Universidad de Antioquia

⁴ Zoot MSc Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES. rurrego@ces.edu.co

Introducción

Dentro del sector agropecuario colombiano la ganadería tiene una importancia relativa indiscutible, con una participación del 27% del PIB agropecuario y del 64% del PIB pecuario⁽⁴⁾. Alrededor del mundo, la producción *in vitro* de embriones bovinos (PIV) experimenta un acelerado crecimiento. Según los datos reportados por la International Embryo Transfer Society (IETS) en el mundo se transfieren anualmente más de 600.000 embriones producidos *in vitro*⁽¹⁸⁾. Además de la aplicación comercial, la PIV bovinos es una importante herramienta para el estudio de fenómenos biológicos ocurridos durante la maduración del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano⁽¹⁵⁾.

El desarrollo embrionario temprano puede ser llevado a cabo en diferentes medios de cultivo cuya composición consiste en una solución simple de sales balanceadas y carbohidratos, por ejemplo, tenemos el caso de los medios Charles Rosenkrans 1 (CR1), fluido de oviducto sintético (SOF) y el medio simple de potasio optimizado (KSOM). También hay medios con una composición de constituyentes más compleja, como el TCM-199.

Para el desarrollo embrionario estos medios son suplementados con suero bovino fetal (SBF) o albúmina serica bovina (BSA)^(8, 12, 16). Durante el desarrollo postfertilización hasta la formación del blastocisto ocurren una serie de eventos biológicos de suma relevancia, como la formación del cigoto, la primera división celular, la activación del genoma embrionario, la compactación de la mórula y la formación del blastocisto⁽¹⁰⁾.

Con el propósito de aumentar las tasas de embriones producidos *in vitro* se ha buscado la optimización de los medios de cultivo, lo que ha conducido a la simplificación de los mismos, al eliminar los componentes innecesarios o incluso perjudiciales. Los resultados obtenidos han sido evaluados de acuerdo a complejos estudios metabólicos y moleculares⁽⁵⁾.

Los medios de cultivo están formulados en base a la presencia de iones, azúcares y aminoácidos (aa) en el ambiente uterino y oviductal, en el momento de la liberación del ovocito, la fertilización y el

desarrollo embrionario temprano^(6, 5). Dos de los medios más empleados en la actualidad son el KSOM aa y el CR-1 (tabla1). Por ende, el objetivo de este estudio fue evaluar dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones bovinos sobre la tasa de blastocistos producidos, para el protocolo I el medio de desarrollo utilizado fue el CR-1 preparado en nuestro laboratorio y en el protocolo II se utilizó un medio KSOMaa comercial.

Materiales y métodos

Recolección de ovarios

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de hembras sacrificadas en la planta de sacrificio Envicarnicos, ubicada en el municipio de Envigado, Antioquia, se depositaron en solución salina estéril a 35 °C y se transportaron durante 15-20 minutos al Laboratorio de Cultivos Tisulares de la Universidad CES-EIA. Una vez en el laboratorio, bajo condiciones asépticas se lavaron los ovarios tres veces con solución salina a 35 °C con el fin retirar el material contaminante, sangre y detritus.

Luego, con jeringa de 10 ml provista de aguja N° 18 se procedió a la aspiración de los folículos que poseían un diámetro entre 4 y 8 mm y su contenido fue recolectado en un tubo cónico de 15 ml colocado en baño maría a 38 °C. Después de dejar sedimentar el aspirado por un espacio de 15 min se procedió bajo estereomicroscopio a la selección de los complejos cúmulos-ovocitos (CCO). Se clasificaron como buenos, los ovocitos que poseían un cúmulo con capas múltiples de células de la granulosa, compacto pero translúcido, un ooplasma con granulación fina, densa y uniforme.

Como regulares, los ovocitos con un cúmulo ligeramente expandidos, con menor número de capas de células de la granulosa, que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida y granulaciones ligeramente más gruesas; y como malos, a los ovocitos desnudos, pequeños, cúmulos muy oscuros, ooplasma de color muy negro. En la PIVE bovina, sólo los ovocitos clasificados como buenos producen buenas tasas de modulas y blastocistos y fueron los que se seleccionaron para este estudio. Sin embargo, en algunos experimentos los ovocitos clasificados como regular son también incluidos dentro de los procesos *in vitro*^(7, 14).

Maduración in vitro

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron Sigma (San Luis, USA) excepto el medio evolve (Zenith Biotech). Una vez obtenidos los CCOs se lavaron tres veces en medio TL-Hepes suplementado con 0.3% (W/V) de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y 0.2 mM de ácido pirúvico. Para el proceso de maduración se colocaron 10 CCOs en gotas de 50 µl de medio TCM-199 suplementado con 10% de SBF, 0.5 µg/ml de FSH, 0.5 g/ml de LH, 1 µg/ml de 17-β estradiol, 0.25 mM de ácido pirúvico. Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral y preincubadas bajo condiciones de cultivo por un tiempo mínimo de 2 horas en una incubadora a 38.5 °C de temperatura, una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 99%. La maduración se realizó por un periodo de 24 horas ⁽⁹⁾.

Fertilización in vitro

Los CCOs previamente madurados fueron lavados tres veces con medio TL-Hepes suplementado con 0.3% (W/V) de BSA y 0.2 mM de ácido pirúvico; posteriormente fueron colocados en gotas de 44 µl de medio de fertilización basado en una solución Tyrodes lactato-piruvato suplementado con 0.6% de BSA (libre de ácidos grasos), 0.2 mM de ácido pirúvico, 100 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Después de la transferencia de los CCOs se adicionaron a cada gota 2 µl de heparina (concentración final 2 µg/ml) y 2 µl de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina y 250 mM de epinefrina). Una pajilla de semen fue descongelada en baño maría a 35 °C por 1 min y los espermatozoides móviles fueron obtenidos por centrifugación a 700 x g por 10 min a temperatura ambiente.

El pelet fue removido y resuspendido en TL-Hepes y centrifugado a 250 x g por 5 min a temperatura ambiente. Después de remover el sobrenadante los espermatozoides fueron resuspendidos en medio de fertilización. La concentración espermática fue determinada usando cámara de Neubauer (Boeco, Germany) y se le adicionaron 2 µl de suspensión espermática a cada gota de fertilización a una concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides/ml. Después de 18 horas de fertilización los presuntos cigotos fueron llevados a medio de desarrollo.

Cultivo in-vitro de embriones

Pasadas las 18 horas de fertilización, los presuntos cigotos obtenidos por los dos métodos de fertilización previamente descritos, fueron lavados tres veces en medio TL-Hepes suplementado con 0.3% (W/V) de BSA (libre de ácidos grasos) y 0.2 mM de ácido pirúvico. Durante los lavados los cigotos fueron desnudados de sus células del cúmulo mediante repetidos flushing usando una pipeta de punta fina para luego ser llevados al medio de cultivo. El cultivo de los embriones fue llevado a cabo en dos tipos de medios. Para el tratamiento I se utilizó el medio de desarrollo CR1-aa producido en nuestro laboratorio y para el tratamiento II se utilizó un medio KSOM comercial evolve[®] (Zenith Biotech ZEHG-050).

Los presuntos cigotos fueron transferidos en grupos de 10 a gotas de 50 µl de medio de desarrollo cubiertas con aceite mineral y preincubadas por un tiempo mínimo de 2 horas bajo las condiciones de cultivo. La división fue evaluada al día 3 y la tasa de mórulas y blastocistos fue evaluada al día 7 de cultivo.

Análisis estadístico

La comparación entre el porcentaje de ovocitos clivados y de embriones obtenidos con los medios de desarrollo CR1aa y KSOM (evolve[®]) se realizó mediante un análisis de varianza y una prueba de Fisher. El análisis estadístico fue realizado usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

Resultados

Para el presente estudio, un total de 488 y 631 ovocitos fueron usados para conformar los grupos de estudio del medio KSOMaa (evolve[®]) y el CR1aa, respectivamente (ver tabla 2). Las tasas de clivaje en el grupo donde se utilizó KSOMaa (evolve[®]) fue del 83% mientras que las tasas de clivaje obtenidas en el medio CR1aa fueron del 44%, encontrándose una diferencia significativa ($P < 0.05$). De igual forma, se encontró diferencia entre los blastocistos producidos (0% vs 15%) con el medio KSOMaa (evolve[®]) y el CR1aa, respectivamente (ver figura 1).

Tabla 1. Composición del medio CR1aa y el KSOMaa en cultivo de embriones bovinos.

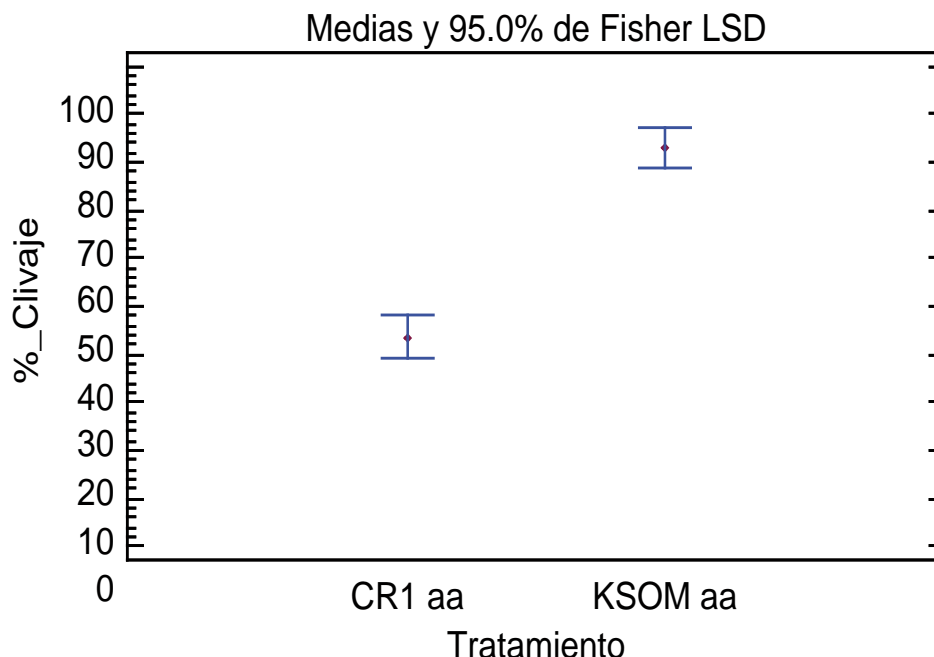
Componentes (mM)	CR1	KSOM
NaCl	114.7	95.0
KCl	3.1	2.5
KH ₂ PO ₄		0.35
MgCl ₂		
MgSO ₄		0.2
NaHCO ₃	26.2	25.0
CaCl ₂		1.7
Na ₂ HPO ₄		2.0
Na piruvato	0.4	0.2
Na lactato		10.0
Ca lactato	5.0	
Glucosa		0.2
Glutamina	1.0	1.0
EAA (μl/ml)	10	10
NEAA (μl/ml)	20	20

Tabla 2. Desarrollo embrionario bovino en dos medios de cultivo diferentes

Método de fertilización	Ovocitos (n)	Clivados (n)	Clivaje (%)	Blastocistos (n)	Blastocistos (%)
CR1aa	631	275	44 ^a	0.0	0.0 ^a
KSOMaa	488	404	83 ^b	60	15 ^b

Valores en la misma columna con diferente letra (a, b,) indican diferencia significativa (p<0.05).

Figura 1. Comparación entre la tasa de clivaje de los presuntos cigotos cultivados en medio CR1aa y en medio KSOMaa (evolve®). Se observa diferencia significativa entre ambos ($p < 0.05$).



Discusión

Diferentes estrategias han sido utilizadas para formular medios exclusivos para la producción *in vitro* de embriones ^(2, 17). El éxito para cultivar embriones de mamífero ha sido logrado gracias a un mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales obtenidos por alteraciones en las condiciones de cultivo ⁽¹⁾. Sin embargo, a pesar de las recientes mejoras en los medios y sistemas de PIV, la producción de embriones sigue siendo limitada. El principal inconveniente en la PIV es el cultivo *in vitro* de los presuntos cigotos hasta el estado de blastocisto, lo cual sugiere que el cultivo de los embriones postfertilización es un periodo de importancia crítica en el proceso que va a afectar la producción de blastocistos ⁽¹⁰⁾.

En el presente estudio, la tasa de clivaje y de blastocistos fue significativamente más alta con el medio KSOMaa (evolve®) que con el CR1aa ($p < 0.05$). Sin embargo, la composición de los medios es muy similar y sólo se encuentran una ligeras diferencias. Estos medios de cultivo junto con el SOF son los medios más comunes utilizados para el desarrollo embrionario en condiciones *in vitro* en la especie bovina. Por lo tanto, se puede

inferir que algo diferente a la composición de sales, de carbohidratos, de lípidos y de proteínas afectó el desempeño del medio CR1aa preparado en nuestro laboratorio.

Todos los reactivos con los que se prepararon los diferentes medios fueron adquiridos en Sigma (San Luis, USA) y recomendados por la casa comercial para ser utilizados en el cultivo de embriones. A los diferentes medios, también se les realizó control de calidad a nivel de pH, osmolaridad, tiempo de gasificación. La incubadora también fue sometida a controles de temperatura, CO₂ y humedad relativa.

El agua es uno de los componentes fundamentales en el trabajo del laboratorio, ya que es la base de los medios de cultivo, congelación y transferencia. Los medios de cultivo se producen con agua ultrapura, libre de pirógenos ⁽¹³⁾. En el presente estudio, el agua utilizada para realizar el medio de FIV y el medio de cultivo de embriones CR1aa fue suministrada por un equipo Milli Q (tipo Organex, Nihon Millipore Ltda; Tokyo Japón).

Varios estudios han indicado que los embriones bovinos, son extremadamente sensibles a la calidad del agua con la cual se prepara el medio, además, el desarrollo embrionario temprano en los bovinos es

seriamente afectado por el método de purificación y el periodo de almacenamiento del agua ^(3, 11, 19). Se ha encontrado que cuando se utiliza en los medios de cultivo agua altamente purificada Milli-Q y recién obtenida la tasa de blastocistos bovina es significativamente más alta con respecto a otros tipos de agua como la clorhidratada, desionizada y la doblemente destilada ⁽¹¹⁾.

Se ha demostrado, que tanto el agua ultrapura Milli-Q como el agua comercialmente disponible (sigma W3500) pueden generar tasas de blastocistos comparables en presencia de BSA; sin embargo, los blastocistos obtenidos en el medio preparado con agua Milli-Q son de mejor calidad en términos de ICM/total de células embrionarias ⁽³⁾.

Contrario a los resultados obtenidos por otros autores, en este trabajo se encontró que los medios preparados con agua Milli-Q afecta negativamente la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos. Por tal motivo, se puede inferir que las tasas de clivaje y blastocistos en el medio CR1aa fueron bajas quizá por la contaminación con electrólitos y compuestos

orgánicos que disminuyen la capacidad de desarrollo embrionario al actuar como agentes embriotóxicos. Lo cual también sugiere que al no hacer el debido control de calidad con el equipo de agua Milli-Q, los filtros perdieron la capacidad de desionizar y eliminar eficazmente todas las posibles impurezas y tóxicos (por ejemplo metales pesados) antes de las ósmosis reversa.

Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio, nos permiten concluir que las diferencias en las tasas de clivaje y de desarrollo embrionario no se deben tanto a la composición de los medios CR1aa y KSOM (evolve[®]) sino a la calidad del agua utilizada en la preparación del medio CR1aa. Además, este estudio muestra como el desarrollo embrionario bovino es un buen sistema para evaluar la calidad del agua utilizada en sistemas biológicos y la necesidad de unos adecuados controles de calidad que permitan monitorear la totalidad de las actividades realizadas en un laboratorio de producción in vitro de embriones bovinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnett, D.K., Bavister, B.D., 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 43, 105–133.
2. Biggers, J.D., McGinnis, L., Summers, M.C., 2006. Reply: one-step versus twostep culture of mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 21, 1936–1939.
3. Duque P, Hidalgo CO, Gómez E, Pintado B, Facal N, Díez C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. *Reprod Nutr Dev.* 2003 Nov-Dec;43(6):487-96
4. Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019. 2006
5. Feugang JM Camargo O Memili E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science* 121 (2009) 141–149
6. Gardner, D., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J.J.H., 1998. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in-vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 13, 3434–3440.
7. Hawk, H. W, Wall, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. I. Selection oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994; 41:1571-83.
8. Krisher RL, Lane M & Bavister BD 1999 Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction* 60 1345–1352.
9. Leibfried ML, Critser, ES, Parrish, JL, Fist, NL. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989; 31: 61-74,
10. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J & Boland MP 2003 Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction* 69 1424–1431.
11. Nagao Y, Sacki K, Hoshi M, Takahashi Y, Kanagawa H. Effects of water quality *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology* 1995, 44: 433–444.
12. Niemann H & Wrenzycki C 2000 Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53 21–34.
13. Palma GA. *Biología de la Reproducción*. 2ª Edición. Mar del Plata, 2008.
14. Pope CE, Mcrae MA, Plair BL, Keller GL, Dresser BL. *In-vitro* and *in-vivo* developmental of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. *J Reprod Fertil* 1997; 51:69-82.
15. Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J., Memili, E., 2006. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131, 895–904.

16. Summers MC, McGinnis LK, Lawitts JA & Biggers JD 2005 Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. Human Reproduction 20 1364–1371.
17. Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil. 30, 493–497.
18. Thibier Michel. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. IETS newsletter, 2006, 24, (4). data retrieval committee annual report.
19. Wiemer KE, Anderson A, Stewart B. The importance of water quality for media preparation. Hum Reprod 1998, 13: 166–172.