

Selección, cultivo y agrupamiento de embriones bovinos

Rosa A Sierra^{1,3} Bact, Jesús A Berdugo^{2,3} MV Msc, Hernán Echavarría^{2,3} Zoot Ms, Martha Olivera Angel³ MV Dr Sci Agr

¹ Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. ² Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.

³ Grupo de Biotecnología Animal. Biogénesis. Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido: 24 febrero, 2000; aceptado: 8 agosto, 2000)

Resumen

La producción in vitro de embriones bovinos (PIV) es una metodología bien establecida. Sin embargo la proporción de mórulas (M) o blastocistos (B) obtenida de oocitos fertilizados permanece baja (<30%). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de agrupar los embriones basados en su desarrollo a las 72 horas post inseminación (hpi) y su cultivo en el medio inicial y en medio nuevo. El procedimiento de obtención, maduración, fertilización y cultivo se realizó de acuerdo con lo descrito por Camargo et al. (4). A las 72 hpi, los embriones fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo con su desarrollo (2, 3-4, 5-8, 9-16 células) y cultivados por 96 horas adicionales. Algunos cultivos fueron hechos en el mismo medio y otros en medio nuevo. La proporción de M y B fue evaluada. Como control se utilizaron microgotas con cigotos no seleccionados según su desarrollo. Diferencias con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Nuestros resultados muestran el efecto benéfico de la selección ($p < 0.05$), los embriones en estado avanzado (5-8 y 9-16 células) mostraron las mejores tasas de desarrollo. El cambio de medio no tuvo ningún efecto en el desarrollo. Se propone como estrategia de cultivo descartar los embriones de clivaje lento a las 72 hpi para mejorar la eficiencia de la práctica de PIV. Nuestros resultados abren un campo excitante de investigación en el desarrollo temprano y la cinética de los embriones. Podría ser posible que los embriones de rápido desarrollo produzcan factores embriotrópicos que promuevan su desarrollo y/o que los embriones de clivaje lento produzcan factores tóxicos deletéreos para el embrión.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, embriones, producción in vitro.

Introducción

La obtención de oocitos de ovarios provenientes de hembras de sacrificio es una práctica económica para la PIV, que se está haciendo rutinaria como un método para optimizar el recurso animal, para estudios de biología reproductiva y como fuente de embriones para las diferentes técnicas de biotecnología. Sin embargo la proporción de oocitos fertilizados que clivan hasta el estadio de mórulas (M) o blastocistos (B) es baja (<30%), razón por la cual se hace necesario plantear estrategias de cultivo que permitan aumentar la cantidad de M/B. Para ello se han utilizado diferentes métodos: la selección morfológica temprana de cigotos y oocitos (10), la adición de factores de

crecimiento (TGFbb-1 y EGF) al medio de cultivo (13), la selección según la tasa de clivaje a las 35 y 48 horas (13) y la fertilización individual de oocitos y su cultivo en forma individual o en grupos (5,6).

Dos criterios son usados comúnmente para medir la calidad de los embriones producidos *in vitro*: su cinética de desarrollo y el número total de células. Algunos estudios han demostrado la ventaja de seleccionar los embriones para transferirlos con base en la morfología y en la tasa de desarrollo (11,13,16), lo cual se refleja en un aumento en la tasa de preñez. Aunque se ha encontrado que los diferentes protocolos aumentan la proporción de M/B, aún no se conocen las variables mayores que determinen la eficiencia del proceso.

El conocimiento de los fenómenos asociados a la competencia de los oocitos, que madurados artificialmente deben convertirse en mórulas y blastocistos es imperativo dentro de un programa de fertilización *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue, con base en el criterio de clivaje de los embriones a las hpi, evaluar el efecto de la selección y cultivo embrionario en el medio inicial o haciendo cambio de medio, sobre la proporción de mórulas y blastocistos obtenidos.

Materiales y métodos

El procedimiento de obtención, maduración y fertilización se realizó de acuerdo con lo descrito por Camargo et al. (4) hasta las 72 horas posinseminación (hpi). A las 72 hpi los embriones fueron clasificados y agrupados de acuerdo con su número de células (2, 3-4, 5-8, 9-16) y cultivados por 96 horas adicionales, en medio suplementado con 10% de suero fetal bovino. Algunos se dejaron en el medio inicial (CR1) y otros fueron transferidos a gotas con medio fresco. Al final del período se evaluó el desarrollo embrionario mediante la observación en estéreo microscopio el número de mórulas y blastocistos. Como control se utilizaron microgotas con cigotos no seleccionados según su desarrollo. Se realizaron 6 repeticiones de cada experimento

Todos los procedimientos de incubación fueron llevados a cabo en una incubadora con atmósfera de 5% CO₂ en aire, a 39°C de temperatura y 99% de humedad relativa.

El efecto de los diferentes medios de cultivo fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA), y la comparación de los grupos de embriones con diferentes tasas de clivaje se hizo con la prueba de Kruskal Wallis. Diferencias con ($p < 0.05$) fueron consideradas estadísticamente significativas.

Resultados

En este experimento se utilizaron un total de 1081 óvulos; 690 (58.4%) de ellos clivaron al menos una vez. El 27.5% (190) de los embriones se desarrollaron hasta el estadio de mórula y blastocisto. (véase tabla 1).

El desarrollo hasta el estado de dos células fue observado en 70 embriones, de los cuales 39 fueron cultivados en medio nuevo y 31 en el medio inicial; de éstos ninguno llegó a convertirse en M o B al día 7 de cultivo (véase tabla 2).

Tabla 1: Número y proporción de embriones cultivados y desarrollo embrionario en los diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Total de oocitos cultivados	# y % de M & B día 7
Medio Nuevo	420	74 (27,7%) ^a
Medio Inicial	400	82(37,6%) ^a
Control	361	34(9,4%) ^b
Total	1081	190(27,5%)

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$).

Tabla 2. Efecto del cambio de medio y la selección de cigotos 72 hpi en el desarrollo embrionario

Tratamiento	# Células	# Embriones 72 hpi	# Mórulas 168 hpi	# Blastocistos 168 hpi
Selección a Medio	2	39 (14,6%)	0	0
	3 - 4	71 (26,6%)	6 (8,4%) ^a	9 (12,6%) ^a
	5 - 8	106 (43,4%)	16 (13,8%) ^b	25 (21,5%) ^b
Nuevo	9 - 16	41 (15,3%)	13 (31,7%) ^b	5 (12,2%) ^b
	2	31 (14,2%)	0	0
Selección en Medio Inicial	3 - 4	56 (25,7%)	4 (7,1%) ^a	4 (7,1%) ^a
	5 - 8	94 (43,1%)	19 (20,2%) ^b	34 (36,2%) ^b
	9 - 16	37 (17,0%)	9 (24,3%) ^b	12 (32,4%) ^b
Sin Selección	Control	215	15 (6,9%) ^a	19 (8,8%) ^a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$).

El número de embriones que se encontraban en el estadio de 3 a 4 células a las 72 hpi fue de 127; de ellos 71 fueron cultivados en medio nuevo, y de ellos 6 (8,4%) y 9 (12,6%) llegaron hasta el estadio de mórulas y blastocistos respectivamente al día 7 de cultivo. De los 56 embriones restantes que fueron cultivados en el medio inicial, se encontró que 4 (7,1%) se convirtieron en mórulas y 4 (7,1%) en blastocistos al día 7. El grupo control (sin selección), mostró que de 215 embriones con al menos una división, 15 (6,9%) y 19 (8,8%) llegaron a convertirse en mórulas o blastocistos respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales y el grupo control (véase tabla 2).

De los 200 embriones obtenidos de 5 a 8 células, se seleccionaron al azar 106 para cultivo en el medio nuevo y 94 para el medio inicial; de ellos, 16 (13,8%) y 19 (20,2%) se desarrollaron hasta el estadio de mórula y 25 (21,5%) y 34 (36,2%) hasta blastocisto, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de mórulas y blastocistos obtenidos al día 7 de cultivo en estos dos grupos experimentales, pero sí con el grupo control y los embriones de 3 a 4 células ($p < 0,001$) (véase tabla 2).

Finalmente, 78 embriones se encontraban en el estadio de 9 a 16 células de éstos, 41 fueron cultivados en medio nuevo y 37 en el medio inicial; continuaron su desarrollo hasta mórula 13 (31,7%) y 9 (24,3%) y hasta el estadio de blastocisto 5 (12,2%) y 12 (32,4%), respectivamente. En estos últimos se observó una diferencia significativa en el número de mórulas y blastocistos con los embriones que se encontraban clivados en el estadio de 3 a 4 células y el grupo control ($p < 0,01$), sin embargo no hubo diferencia con los embriones de 5 a 8 células, tanto en los que fueron cultivados en medio nuevo como en aquellos donde el cultivo se realizó en el medio inicial (véase tabla 2).

Los embriones de dos células no fueron tenidos en cuenta para el análisis porque todos los resultados fueron cero.

En resumen, se observó un efecto benéfico en el número de mórulas y blastocistos obtenidos al día 7 de cultivo, cuando se cultivan los embriones agrupados con base en sus tasas de división; pero no se ob-

servó efecto ocasionado por el cambio de medio de cultivo a las 72 hpi en esos embriones.

Discusión

La evaluación temprana del clivaje de los embriones no ha sido usada frecuentemente como parámetro para evaluar la calidad embrionaria, aunque Van Soom y colaboradores encontraron que ésta se relaciona con la tasa de compactación de los embriones producidos *in vitro* (19).

El mejoramiento en los resultados, reflejado en el incremento en el número de mórulas y blastocistos obtenidos mediante la selección y cultivo de los embriones seleccionados por tasa de clivaje a las 72 hpi, permite hacer algunas consideraciones sobre el desarrollo embrionario temprano y la cinética de los embriones bovinos. Para explicar este resultado podría sugerirse la producción de factores tóxicos por parte de los embriones de más lento desarrollo o en degeneración (2 y 3 a 4 células), o bien la producción de factores “ayudadores” por parte de los embriones de más rápido desarrollo, que induzcan un efecto sinérgico sobre el clivaje de los embriones vecinos (5 a 8 y 9 a 16 células) (20).

Los embriones que presentan una baja cinética de desarrollo a las 72 horas (< 4 células), reflejan una carencia en su capacidad de desarrollo, que puede ser causada por un bajo contenido crónico de ATP establecido en el oocito (17,18), o por una inadecuada maduración citoplásmica del oocito, ya que el citoplasma juega un papel crucial en el correcto ensamblaje de la maquinaria metabólica, produciendo la energía suficiente para las funciones celulares durante la maduración, clivaje y formación de blastocisto (8,14,20).

Los embriones que presentaban un mayor número de células a las 72 hpi (> 5 células), mostraron tener la capacidad para promover su propio desarrollo hasta estados pre-implantatorios tardíos (mórulas y blastocistos), cuando están cultivados en estrecho vínculo con otros embriones que poseen similar desarrollo. Van Soom y colaboradores (20) demostraron que la separación de los embriones no afecta su desarrollo, pero el hecho de agrupar los embriones que presentan un alto potencial de desarrollo ejerce probablemente un efecto positivo en la habilidad de los embriones para implantarse.

Cuando se evalúa el efecto de cultivar los embriones solos o en grupos sobre la cantidad de mórulas o blastocistos obtenidos, cultivados con o sin células, se demuestra que los embriones que se cultivan de manera individual en monocapas de células de granulosa producen un porcentaje menor de blastocistos, comparados con aquellos que se cultivan en grupos. De esto se puede pensar que las células embrionarias producen factores necesarios para el desarrollo y que existe colaboración entre los embriones para su desarrollo, mediante la secreción de moléculas al medio (6).

Las tasas de desarrollo observadas en los embriones cultivados en grupo podrían ser explicados por la neutralización de los componentes embriotóxicos del medio de cultivo o por la secreción de factores embriotrópicos, o por ambos (1,3,12). Se ha demostrado que el embrión bovino es capaz de producir algunas moléculas para promover su desarrollo, tales como el factor activador de las plaquetas (PAF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor insulinoide y de crecimiento I y II (FCDI) y el factor de crecimiento transformante aa y bb (17,10). Cuando se cultivan embriones individuales en un medio con factor de crecimiento epidermal sin adición de factores coadyuvantes, se obtienen embriones en proporción similar al encontrado en los sistemas en grupo (16).

Dentro del desarrollo de los embriones, es aceptado que su velocidad de división trae como consecuencia una cinética de desarrollo comparable con la de los embriones *in vivo*, es un reflejo de la calidad embrionaria (19). En 1984, se mostró de manera clara cómo los embriones que clivaban más rápidamente tenían una mayor oportunidad de implantarse (7).

En hamster se demostró que los embriones que alcanzan el estado de 8 células en el tiempo similar al de los embriones *in vivo*, mostraban una mayor capacidad para desarrollarse hasta el estado de blastocisto y una mayor habilidad de implantación, comparados con aquellos embriones que no lo hacen en el tiempo normal (13,14). Se destaca el bajo potencial de desarrollo que mostraron tener los embriones de 2-4 células, comparado con los embriones de 5 a 16, células con los que se pudo obtener la mayor proporción de M/B, indicando la importancia de la sincronía que parece existir con la dinámica de los ciclos celulares de los embriones *in vivo*, en relación con el número de células y la edad del embrión.

En este trabajo se observó que el medio no es el factor que influye en el mejor desarrollo de los grupos experimentales, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de mórulas y blastocistos entre los embriones a los que se les hacía un cambio de medio el día de la selección, comparados con aquellos que se dejaban en el medio de cultivo inicial.

Se confirma que el efecto de la selección de los embriones es benéfico, ($p < 0.001$). Los embriones de 5-8 y 9-16 células, de los grupos experimentales mostraron las mejores tasas de progresión a mórula o blastocisto el día 7 de cultivo, de tal manera que se puede plantear como estrategia de cultivo que aquellos de menos de 5 células a las 72 horas post-inseminación, sean descartados.

Se sugiere que, por lo menos en las condiciones del estudio, la selección y cultivo agrupado de los embriones permite aumentar la cantidad de M/B y por consiguiente la eficiencia del procedimiento de PIV.

Summary

Growing, selection and culture of bovine embryos

In vitro production of embryos (IVP) is a well established methodology, nevertheless the ratio of morulae (M) and blastocyst (B) obtained from fertilized oocytes remains low (<30%). The aim of this study was to evaluate the effect of grouping the embryos based on their development at 72 hours postinsemination (hpi) and their culture in fresh or old medium. The collection, maturation, fertilization and culture were performed as reported by Camargo (4). At 72 hpi, embryos were divided into four groups according to their development (2, 3-4, 5-8, 9-16 cells) and cultured for other 96 hours. Some cultures were performed in the same medium and others in a new one. The proportion of M and B was recorded. Our results show the beneficial effects of selection ($p < 0.05$). Microdrops with unselected

zygotes were used as control. Advanced stage embryos (5-8 and 9-16 cells) show better developmental rates. The medium being new or old had not effect on the development. We propose as a culture strategy to discard slow-cleaving embryos at 72 hpi to improve the efficiency of the IVP practice. Our results open an exciting field of research in the early development and kinetics of embryos. It could be possible that fast-cleaving embryos produce factor(s) that promote development and/or slow cleaving embryos produce toxic factors deleterious for the other embryos.

Key words: embryonic development, embryo selection, in vitro production.

Referencias

1. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod.* 1992;7:1339-1341.
2. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod.* 1995; Up date 1:91-98.
3. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. The search for improved in vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum. Reprod.* 1993;8:1055-1062.
4. Camargo O, Sierra R, Berdugo JA, Olivera Ángel M. Obtención de embriones bovinos in vitro. *Rev. Col. de Cien. Pec.* 1997; Vol 10, suplemento.
5. Carolan C, Lonergan P, Khatir H, Mermillod P. In vitro production of bovine embryos using Individual oocytes. *Mol. Rep. Dev.* 1996; 45:145-150.
6. Doherty EM, Wade MG, Hill JL, Boland M. Effects of culturing bovine oocytes either single or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*, 1997; 48:161- 169.
7. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J in Vitro Fert Transf.* 1984; 1: 3-23.
8. Fulka J, Jung T, Moor R. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 32:372-382.
9. Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994; 41:95-100.
10. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 1994; 41:1571-1583.
11. Hill GA, Freeman M, Bastias MC, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fert Steril.* 1989;52:801-806.
12. Kane MT, Carney EW, Ellington JE. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cell in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, 1992; 38:297-313.
13. Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 1994; 41:1323 -1331.
14. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 1998; 49:103-104.
15. Mckiernan SH, Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum. Reprod.* 1994; 9:2123-2129.
16. Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 4756-4760.
17. Schini SA, Bavister BD. Two cell- block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 1988;39:1083-1092.
18. Van Berkomp J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.* 1995;10:415-424.
19. Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, de Kruif A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*. 1992;38:905-919.
20. Van Soom A, Ysebaert MT, De Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in In vitro-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. and Dev.* 1997; 47:47-56.