



Biotecnología animal

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Simplificación de la fertilización de oocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. (Trabajo en proceso)

Urrego R, Tarazona A, Olivera M, Camargo O. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Universidad de Antioquia. ocamargo@unalmed.edu.co

Con la finalidad de aumentar las tasas de fertilización *in-vitro* y el subsiguiente desarrollo embrionario, uno de los procedimientos que frecuentemente se modifica en la Producción *in-vitro* de embriones - PIVE- es el método de selección de los espermatozoides. Para tal efecto, se han desarrollado varias técnicas como el lavado/centrifugación, el swim-up, el gradiente de percoll y la columna de albúmina entre otros. Todas ellas incluyen como mínimo un paso de las muestras por la centrifuga que aunque fundamental para el lavado y selección de los espermatozoides previa a la fertilización *in-vitro* - FIV- se ha asociado con un aumento en la producción basal de especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales causan daño en la membrana plasmática y en el ADN de los gametos masculinos afectando indirectamente las tasas de fertilización y el desarrollo embrionario. En humanos y animales domésticos se ha demostrado que uno de los factores que afectan la viabilidad embrionaria es la calidad de los espermatozoides; por lo cual, se aspira a que el daño causado e inherente a la manipulación espermática *in-vitro* sea el menor posible. En este trabajo se pretende por lo tanto evaluar un nuevo proceso que simplificaría la selección de espermatozoides en la FIV de oocitos bovinos, en el cual se obvia el paso de la centrifugación y por ende sus efectos deletéreos sobre estas células, los resultados obtenidos utilizando esta nueva metodología para FIV serán comparados con los obtenidos utilizando la metodología convencional mediante una prueba T. Una innovación de este tipo permitiría ahorrar tiempo y recursos y a la vez aumentar las tasas de fertilización y de desarrollo embrionario *in vitro*.

Termoprotección de la Cisteamina al choque calórico en embriones bovinos producidos *In vitro*

Méndez V, Moreno D, Peña M, Góngora A. Grupo GIRGA-Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia miguelpejo@hotmail.com

Se determinó el efecto termoprotector de la cisteamina a diferentes niveles sobre el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*. Los oocitos fueron recuperados de ovarios de vacas recién sacrificadas del frigorífico (frigoriente) del Municipio de Villavicencio (Meta), madurados por 24hr en medio de maduración TCM-199 suplementado con Suero Fetal Bovino 10%, LH y FSH 0.5%, penicilina/streptomycin 1%, piruvato 0.5%. Luego de 18 hrs posfertilización con semen de un toro sanmartinero de reconocida fertilidad se sometieron a uno de dos tratamientos T1: choque calórico 41 °C por 4 hr (n:185) y diferentes niveles de cisteamina adicionado al medio de cultivo (0mM: (n:36), 50 mM: (n:43), 100 M: (53),

150 mM (n:53) o T2: Control 39° C por 4 horas (n:173) y diferentes niveles de cisteamina (0mM: (n:33), 50mM (n: 41), 100mM: (n:50) y 150 mM (n:49). Los oocitos fueron puestos en medio SOF en estufa a 39C adicionado de 5% de CO2 y una atmósfera de alta humedad hasta su evaluación al día 7. Se utilizó un ANAVA de una vía para establecer diferencias entre las variables choque calórico, niveles de cisteamina y división embrionaria y una prueba de comparación de medias mediante de prueba de tukey en el programa SAS. No se encontró diferencias entre tratamientos para los diferentes niveles de cisteamina. Se sugiere probar niveles mas altos de los utilizados en el estudio sin alcanzar niveles de 500mM los cuales se han considerados tóxicos.

Alternativas de utilización de moléculas sintéticas o definidas para el reemplazo de productos biológicos en la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*

Moreno A, Ávila M, Peña M, Neira J. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA. Bogotá, Colombia. jneira@corpoica.org.co

Con el propósito de reemplazar los productos biológicos animales (Suero Fetal Bovino) en los medios de criopreservación de embriones. Se evaluó la viabilidad post descongelación de embriones bovinos producidos *in vitro*, utilizando VF5 Surfactant y Fosfatidilcolina como moléculas definidas. Los oocitos procedentes de ovarios de matadero, fueron madurados (TCM-199), fecundados (TL-TALP) y cultivados (SOF Vajta con SFB 10%). Al séptimo día los embriones fueron evaluados y distribuidos en cada uno de los tratamientos; se utilizó EG 1,5 M + 0.2 M Sacarosa, suplementados con: 20% de SFB (T1= Grupo control); 0.2% de VF5 (T2); 0.1% de Fosfatidilcolina (T3), diluidos en PBS. Los embriones fueron descongelados y colocados en co-cultivo con células Vero. Se estimó la viabilidad post- descongelación observando el desarrollo 24, 48 y 72 horas. Se empleó un diseño estadístico en Bloques Completos al Azar. De los 109 embriones congelados, aquellos pertenecientes al grupo control presentaron mayor tendencia a re-expandir. Al considerar los tratamientos, se observa diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control (52.5%) y el T3 (22.5%), pero no hubo diferencia significativa con el T2 (36.8%). Los resultados de viabilidad, estuvieron altamente asociados con el estadio inicial del embrión ($P < 0.05$); se obtuvieron mejores proporciones de desarrollo en la congelación de Blastocistos y Blastocistos jóvenes (51.4%); frente a las reexpansiones observadas en los Blastocistos expandidos (17.0%). Sin embargo, al observar los blastocistos eclosionados no existieron diferencias entre ellos (14.28%). En conclusión, es posible sustituir los productos biológicos animales en los medios de congelación por moléculas sintéticas (en el caso del VF5 Surfactant), convirtiéndose en una manera eficaz de garantizar mayor control sanitario en todos los procesos, sin que se vea alterada la viabilidad de estos embriones.

Software prototipo para la evaluación morfológica de espermatozoides bovinos a partir de procesamiento digital de imágenes y redes neuronales artificiales

Cruz A, Cardona D, Ángel R, Cruz-Casallas PE. Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, A.A. 110, Villavicencio, Meta – Colombia. ing.angel@gmail.com, marcela.cardona@gmail.com.

Se presenta una propuesta de software prototipo para la evaluación morfológica de espermatozoides bovinos a partir de imágenes digitalizadas, obtenidas a través de microscopía óptica, utilizando técnicas de procesamiento digital de imágenes y reconocimiento de patrones, como segmentación por regiones, extracción de características por medio de descriptores geométricos y momentos invariantes afines, utilizados como entradas de un sistema clasificador basado en una red neuronal artificial. Se recopiló un total de 138 imágenes en formato JPG, 57 en resolución de 320x240 y 81 en resolución 640x480 de un microscopio óptico, utilizando una magnificación de 1000 aumentos. Se evaluaron características de la cabeza del espermatozoide y de la cola, tales como área, compacticidad, diámetro mayor y menor y descriptores de momentos estadísticos. La topología de la red neuronal artificial empleada posee tres capas de neuronas (17-33-2) y un vector de entrada de las siete características de la cabeza del espermatozoide. Las dos neuronas de la capa de salida indican el grado de pertenencia (entre 0 y 1) a cada una de las clases (normal y anormal), donde 0 es pertenencia nula y 1 pertenencia absoluta; de igual forma, se crea una red para la morfología de la cola y la combinación de ambas debe ser igual o mayor al porcentaje mínimo de normalidad permitido (70%). El sistema se está probando en el Laboratorio de Crioconservación de Gametos de la Universidad de los Llanos analizando espermatozoides bovinos, obtenidos tanto de semen fresco como crioconservado. Hasta ahora se ha obtenido un porcentaje de sensibilidad de 54% y de especificidad de 100%. Se espera que la sensibilidad alcance 80% en su etapa prototipo. Se pretende que este sistema se constituya en la primera herramienta asistida por computador realizada en Colombia para el análisis de espermatozoide bovino, comúnmente conocida como CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos (trabajo en proceso)

Urrego R, Olivera M, Márquez M, Camargo O. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Universidad de Antioquia. ocamargo@unalmed.edu.co.

Un proceso de FIV en bovinos implica someter los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en donde los espermatozoides de mayor movilidad son separados de los inmóviles o muertos, del plasma seminal y de otras estructuras por medio de técnicas como el Swim-up y el Gradiente de Percoll. Ambas requieren como mínimo un paso de centrifugación, en el cual se puede generar daño a la membrana plasmática de los gametos masculinos y aumentar la producción basal de radicales libres. Una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) conduce a la pérdida de la funcionalidad y viabilidad espermática, correlacionadas con los efectos deletéreos causados por la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar si la integridad de la membrana plasmática y el ADN de los espermatozoides pueden ser afectados por el proceso de lavado y selección. Para evaluar la alteración en la funcionalidad de la membrana y la fragmentación del ADN espermático causada por el aumento basal en la producción de EROs se utilizará el test hipoosmótico y el ensayo cometa, respectivamente. A fin de determinar si la centrifugación afecta el ADN y la membrana plasmática de espermatozoides bovinos estos serán procesados convencionalmente (centrifugados) y sin centrifugar, el análisis estadístico de los datos se hará mediante una prueba de T. En animales,

una serie de estudios muestran que la viabilidad embrionaria es dependiente de la calidad del espermatozoide, lo cual indica la necesidad de ser prudentes en el manejo de los reproductores así como en la manipulación del semen en el laboratorio a fin de no alterar drásticamente su capacidad de fecundar y de llevar a feliz término el desarrollo embrionario bovino.

Efecto de la utilización de medios sintéticos o definidos en la maduración y fecundación de ovocitos bovinos in vitro

Novoa IM^{1,2}, Aguirre A^{1,2}, Moreno A¹, Peña MA¹, Neira JA¹. C.I. Tibaitata-Corpoica¹, Programa de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal. Universidad de Cundinamarca². jneira@corpoica.gov.co

Con el propósito de sustituir los productos biológicos en los medios de maduración de ovocitos bovinos para la producción de embriones totalmente *in vitro*. Se evaluaron algunos medios sintéticos o definidos. Para este experimento se usaron ovocitos de ovarios de vacas sacrificadas en matadero, estos ovocitos fueron distribuidos aleatoriamente en 4 tratamientos de maduración: T1, SOF, EGF 50 ng/ml, T2, SOF, FSH 0,1 UI/ml, LH 0,1 UI/ml, Surfactant 1 /ml, T3, SOF, EGF 50 ng/ml y Surfactant 1 /ml, T4 (control) TCM-199, Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, EGF 50 ng/ml. Posteriormente los ovocitos fueron clasificados y escogidos para colocarlos en una gota de 50 microlitros X 25 ovocitos. Se valoró el número de cigotos clivados por tratamiento. El diseño estadístico utilizado fue un modelo factorial en bloques completos al azar en donde los bloques corresponden al número de repeticiones realizadas para cada ensayo. El porcentaje de cigotos clivados por tratamiento fue, 55,75% para el T1, 50,75% para el T2, 58,75% para el T3 y 64% para el grupo control. Los resultados del presente estudio demostraron que los ovocitos bovinos pueden ser madurados, sin perder su capacidad de desarrollo en condiciones completamente definidas, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). Pero aun así se observó una mejor respuesta tanto en la maduración como en el porcentaje de clivaje del T3, con respecto al T1 y T2, indicándonos que puede ser el más eficaz para sustituir los medios comúnmente utilizados. En esta técnica la habilidad para madurar los ovocitos y el subsiguiente cultivo de embriones en ausencia de sustancias biológicas, es un paso importante en el desarrollo de un sistema de producción *in vitro* (IVP) completamente definido, que será de gran valor tanto para los investigadores como para los programas de crianza.

Efecto de los antioxidantes quercetina y otopafenol sobre espermatozoides equinos sometidos a estrés oxidativo

Pareja-López A, González CV, Torres CH, Correa LG, Márquez ME, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. apareja@unalmed.edu.co

Los espermatozoides equinos producen especies reactivas de oxígeno (ERO) en su actividad metabólica normal, pero el balance entre la generación y la captura de estas, determina el efecto observado. Altas concentraciones de ERO producidas por los espermatozoides son capaces de dañar moléculas biológicas como carbohidratos, proteínas, lípidos de membranas y ADN, comprometiendo la viabilidad espermática. Por otro lado, bajas concentraciones de ERO, causan una pérdida reversible de la movilidad espermática. Con el propósito de mantener este equilibrio, en las técnicas de procesamiento y almacenamiento de semen equino, se han utilizado algunos antioxidantes para reducir el efecto dañino; consiguiendo resultados bastante promisorios. En este trabajo se cuantificó las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) como medida de peroxidación lipídica, los quiebres en la cadena de ADN por medio del ensayo cometa y el efecto sobre la movilidad individual de los espermatozoides equinos tratados con los antioxidantes quercetina y otopafenol y sometidos a

estrés oxidativo exógeno controlado (100 mM H₂O₂ y 2.7 mM FeSO₄). Los datos se generaron con base en un diseño de bloques completos al azar, tomando la muestra de caballo como factor de bloqueo. Se evaluaron seis tratamientos: cuatro concentraciones de cada antioxidante y dos controles, uno positivo y uno negativo. La exposición de los espermatozoides a un estrés oxidativo exógeno controlado resultó en un incremento en la generación de SRATB y quiebres en la cadena sencilla ($p < 0.05$), pero no se observó efectos significativos sobre la movilidad, de otro lado, tanto la quercetina como el otobafenol regularon la producción de SRATB y los quiebres en la cadena de ADN, pero las concentraciones intermedias mostraron menor reducción en la movilidad individual de los espermatozoides equinos. Los resultados indican que los daños oxidativos inducido exógenamente en membrana y en ADN espermático pueden ser regulados por los antioxidantes quercetina y otobafenol sin afectar notablemente la movilidad individual.

Evaluación de la producción *in vitro* de embriones bovinos utilizando como suplemento proteico durante la maduración del oocito, suero de vaca en estro y albúmina sérica bovina

López ML, Hernández MJ, Serrano-Novoa CA. Grupo de Investigación en Ciencias Animales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, AA 2019. cica01_mvz_bga@correoucc.edu.co

Este trabajo evaluó el efecto de la maduración *in vitro* de oocitos bovinos, empleando como suplementación proteica albúmina sérica bovina (ASB al 0.6%), suero de vaca en estro (SVE al 10%) y suero fetal bovino (SFB al 10%) a fin de establecer el porcentaje de producción de mórula/blastocisto a las 168 post-fertilización. Durante 15 semanas consecutivas, se aspiraron folículos ováricos pequeños (2 – 5 mm) provenientes de vacas destinadas al sacrificio que estuviesen vacías o en su defecto con gestaciones inferiores a los tres meses. Del total de oocitos aspirados se seleccionaron los de calidades tipo 1 y tipo 2 de acuerdo a la IETS (1230 en ASB, 1149 en SVE y 693 en SFB respectivamente), los cuales se sembraron de acuerdo al suplemento proteico empleado durante la maduración, depositando 25 oocitos por cada gota de 95 microlitros de medio de maduración cubiertas previamente con aceite mineral e incubadas por un tiempo de 24 horas a 38°C en aire con 5% de CO₂. Al cabo de este tiempo y posterior al lavado en HEPES, estos oocitos se depositaron en medio TALP Fert y se fertilizaron a dosis de 4 microlitros de semen capacitado mediante la técnica de SWIM-UP y ajustada su concentración a 1 millón de espermatozoides por ml.

Seguidamente se incubaron por 18 horas, al cabo de las cuales se lavaron en HEPES y se pasaron a medio de desarrollo CR1-AA, a partir de este momento se empezaron a evaluar los cigotos a las 36 – 48 – 72 y 168 horas post-fertilización mediante el uso de estereoscopio, evaluando su estado de desarrollo. Los datos (porcentaje de mórulas/blastocitos) fueron analizados por ANAVA y por prueba de Tukey. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) en el porcentaje de mórulas y blastocitos obtenidos, siendo mayor para ASB, seguida de SVE y SFB.

Efecto del cocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*

López A^{1,4}, Tarazona A^{2,4}, Olivera-Angel M^{3,4}. ¹Estudiante Zoo U de A² Zoot Aspirante a MSc, U de A, ³MV, Dra. Sci. Agr. Grupo Reproducción Fisiología y Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. angeladir7@gmail.com

La producción de embriones bovinos *in vitro* es una biotecnología que permite tener una mayor cantidad de crías por año de una misma hembra, sin embargo, las tasas de obtención de embriones viables para transferencia obtenidos por este método son bajas. El cigoto debe viajar a través de los oviductos para llegar hasta la implantación en el útero, posiblemente en este trayecto las células oviductales aporten secreciones o factores que sean benéficos para el embrión en desarrollo. Igualmente las condiciones intrauterinas en cuanto a la concentración de CO₂ y Oxígeno son de vital importancia debido a la disminución en la producción de radicales libres que afecten al embrión. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del cocultivo sobre la tasa de producción y la calidad de blastocitos en bajas tensiones de oxígeno. Para esto se utilizarán técnicas de cocultivo embrionario con células de oviducto en suspensión y monocapas de células de granulosa. Se tomarán ovarios de vacas sacrificadas en la planta de beneficio local para la extracción de los ovocitos que serán puestos en medio de maduración TCM 199 suplementado con hormonas, se fertilizarán con semen criopreservado descongelado y se cocultivarán en células de oviducto en suspensión, o monocapas de células de granulosa. Se evaluará celularidad por tinción de Hoechst y apoptosis por tinción diferencial AO/EB. Se tendrán en cuenta los siguientes tratamientos: T1 células granulosa, T2 células de oviducto, T3 células de granulosa+oviducto. El cultivo se hará en incubadora, además de un ambiente controlado de gases que sea semejante a las condiciones intrauterinas para un embrión *in vivo*. Se espera encontrar un efecto de las técnicas de cocultivo sobre el desarrollo de los embriones bovinos hasta estadios preimplantatorios.