

CULTIVO DE EMBRIONES DEL GANADO BOVINO FECUNDADOS "IN VITRO"

Por: Vilma Moreno Melo, Zootecnista, PhD en Biología, Universidad de Cundinamarca Tel: 91867 38 26 Fusagasugá, Octubre de 1993

CONTENIDO

1. CARACTERISTICA GENERAL DEL TRABAJO
2. OBJETIVOS
3. MATERIAL Y METODOS DE INVESTIGACION
4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACION
5. CONCLUSIONES
6. PROPOSICION PRACTICA
7. BIBLIOGRAFIA
8. ANEXOS

I. CARACTERISTICA GENERAL DEL TRABAJO

Durante los últimos años para mejorar el potencial genético del ganado bovino se emplea ampliamente un nuevo método de cría de animales como es el transplante de embriones. Este método permite recibir de una vaca donadora genéticamente sobresaliente 20 o más embriones al año. De esta manera se consigue liberar a la hembra de la necesidad de llevar a término una gestación, y tan solo se incrementa la salida de óvulos que después de ser fertilizados, son extraídos en la fase de embriones tempranos y transplantados a las hembras receptoras (nodrizas) de menos valor desde el punto de vista genético. De tal manera, empleando el método de transplantación de embriones, se puede utilizar con mayor eficacia las hembras de alta calidad como donadoras de embriones.

Un importante factor que contiene el empleo de éste método en la práctica de cría de los animales vacunos es la baja salida de embriones de la vaca donadora (3-4 embriones durante una extracción) y su alto precio como resultado de la carestía de los preparados hormonales para la estimulación de la poliovulación y de la necesidad de sobremanutención de las vacas donadoras.

La eliminación de tal factor negativo, por la opinión de los científicos se ve en la elaboración del método de maduración y fecundación de los óvulos del ganado mayor fuera del organismo. Con la elaboración del método descrito en el trabajo dado, la recepción de los ovarios de las terneras y de las vacas de alta producción desecharadas por causas no relacionadas con la infracción de la función reproductiva, podría ser una fuente conveniente y barata de los ovocitos. Estos últimos pueden ser llevados a maduración, fecundados y cultivados *in vitro* hasta conseguir tal fase de desarrollo en la cual sea posible su transplantación.

Los logros de los últimos años en la recepción de la descendencia del ganado bovino de los óvulos madurados *in vitro* (Brackett et. al. 1982; Ernst L.K. y otros 1983, Hanada et. al 1986) se hicieron el apoyo y conservación de la posibilidad de tales condiciones que sean capaces de asegurar la maduración por lo menos de una parte de los óvulos colocados en cultivo.

Sin embargo la eficacia de la recepción de los embriones fecundados *in vitro* en la fase útil para la transplantación no es todavía suficiente, En la mayoría de los laboratorios del mundo la recepción de las mórlulas y blastocistos de los óvulos fecundados *in vitro* compone no más de 20 - 25%.

De aquí sale la necesidad de las investigaciones ulteriores para perfeccionar el método de la fecundación de los óvulos del ganado bovino *in vitro* incluyendo la utilización de nuevos medios de cultivo, el cultivo en monocapa con células somáticas, selección del esperma de los toros entre otros.

Una ventaja considerable de la tecnología del transplante de embriones es que los terneros recibidos como resultado de dicho proceso, se adaptan mejor a las condiciones de vida, que es muy importante para el futuro de la ganadería en los países en desarrollo donde existe la necesidad en material genético de alta calidad.

Colombia en comparación con otros países tropicales tiene una preferencia porque posee distintas razas nativas de ganado bovino distribuidas por todo el territorio. Estas razas aunque representan en sí un valor considerable, desaparecerán rápido de la fisonomía nacional si no son aprovechadas efectivamente.

2. OBJETIVOS

Sirve de objetivo principal del trabajo, el perfeccionamiento del método de cultivo de los embriones fecundados *in vitro* del ganado mayor, para ser transplantados más tarde.

En el proceso del trabajo era necesario resolver las siguientes tareas concretas:

1. Perfeccionar el método de cultivo de los embriones tempranos recibidos de óvulos madurados y fecundados in vitro en cultivo conjunto con la monocapa epitelial del oviducto y granulocitos.
2. Estudio de la capacidad de los embriones de formar mórulas y blastocistos en dependencia de la fase de desarrollo dentro de 44-46 horas después de la fecundación.

3. MATERIAL Y METODOS DE LA INVESTIGACION

Extracción de los ovocitos:

Los ovarios y oviductos de las vacas fueron llevados del frigorífico en termos con una temperatura de 30 - 36° C en el periodo de 1-1,5 horas después de ser sacrificada la vaca. Los ovocitos fueron extraídos por el método de aspiración con ayuda de una jeringa común al medio M-199 añadiendo suero fetal del 5%, canamicina y heparina. Para el cultivo se seleccionaron los ovocitos con la masa comulosa compacta.

Maduración de los ovocitos:

Los ovocitos seleccionados para la experiencia se colocaron en el medio M-199 añadiendo el suero estral de concentración del 20%, y canamicina. Fueron colocados 20-30 óvulos en una gota de 200 microlitros del medio, cubierta con una capa de aceite mineral. Los óvulos se cultivaron a una temperatura de 38,5 - 39° C, en atmósfera húmeda de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ durante 22-24 horas.

Capacitación del Esperma:

Para la fecundación fué empleado el esperma congelado. La pajilla con esperma congelado se desheló al baño maría a una temperatura de 38 - 40° C durante 10 segundos. Para la capacitación del esperma fue utilizado el método modificado Parrish et al (1986).

Fecundación de los Ovulos:

La fecundación de los óvulos fue realizada en microgotas del medio TALP, pH 7, 6 - 7,8 y cubiertas con aceite mineral. Los óvulos fueron separados parcialmente de las células cumulosas por medio del lavado reiterado con pipeta en el medio M-199. Se colocaron en las gotas de 20-30 ovocitos y se agregó 50 microlitros de esperma. De tal manera la concentración del esperma fué de 2×10^6 espermatozoides/ml.

Cultivo de los Embriones: Despues de 20 horas de cultivo conjunto de los espermatozoides con los óvulos, estos últimos fueron lavados en el medio M-199 y trasladados bien a medios de cultivo en presencia de células epiteliales del oviducto o en presencia de la monocapa de los granulocitos. El cambio de medio fué realizado cada 48 horas y toda la cultivación duró 7 días.

Recepción de la monocapa del epitelio del oviducto:

Los oviductos fueron obtenidos simultáneamente con los ovarios. El epitelio del oviducto fué extraído de dos formas: a) Por medio del lavado de los oviductos con el medio M-199. b) El oviducto fué lavado 3 veces en el medio M-199 y presionado del centro al extremo con el lado obtuso del bisturí. El epitelio fué concentrado en una pipeta y lavado dos veces con el mismo medio. El cultivo del epitelio fué realizado en microgotas de 200 microlitros en el medio M-199, suero estral al 15%, canamicina 1 microlitro/ml. bajo aceite mineral. Atmósfera húmeda de 5% CO₂, 5% O₂, y 90% N₂.

Recepción de la monocapa de granulocitos:

La monocapa de granulocitos se formó en el proceso de cultivo de las células migrantes de los granulocitos que rodean al óvulo y de las células dispersadas en el medio durante el pipeteo de los óvulos antes de ser fecundados. El cultivo de las células granulosas se realizó en gotas con el medio M-199, 20% de suero estral, canamicina 1 microlitro/ml., en la incubadora con una temperatura de 39° C durante 3-4 días, dependiendo de las condiciones del experimento. Las gotas de 200 microlitros fueron cubiertas con aceite mineral.

4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACION

1. Comparación del desarrollo de los embriones (madurados y fecundados in vitro) cultivados en la monocapa del epitelio del oviducto y en la monocapa de células granulosas.

La investigación fué realizada en óvulos de vacas, los cuales fueron madurados y fecundados in vitro. La mitad de dichos óvulos fueron colocados en los medios de cultivo junto con las células epiteliales del oviducto y la otra parte en medios de cultivo con células granulosas, con el fin de estudiar la capacidad de desarrollo de los embriones hasta la fase de blastocisto.

En la Tabla No. 1 son presentados los resultados de la investigación después de 7 días de cultivación conjunta de los embriones con la monocapa del epitelio del oviducto y células granulosas.

El porcentaje de embriones desarrollados hasta la fase de mórlulas, fué de 37,2 y 35,2 correspondientemente, y hasta la fase de blastocistos, se desarrollaron 10,5% y 2,8% embriones. Se puede pensar que el cultivo de los embriones tempranos del ganado bovino en el epitelio del oviducto es un medio más cercano al desarrollo in vivo de los mismos. Las células epiteliales del oviducto crearon condiciones favorables para los embriones y aseguraron su desenvolvimiento in vitro hasta las fases más avanzadas de su desarrollo.

TABLA No. 1
Comparación de la Intensidad de desarrollo de los embriones en medios de cultivo In Vitro, junto con células epiteliales y granulosas

Indicadores	Embriones	De ellos en la fase de:				No.	%
		MORULAS	BLASTOCISTOS	No.	%		
En células epiteliales del oviducto	86	32	37,2	9	10,5		
En células granulosas	71	25	35,2	2	2,8		

2. Capacidad de los embriones de dividirsen hasta la fase de mòrula y blastocisto en dependencia de la velocidad de desarrollo dentro de 44-46 horas después de la fecundación.

El análisis de los resultados del cultivo de embriones in vitro demostró que los embriones que a las 44-46 horas alcanzaron 4-6 blastomeros, poseen una capacidad igual para formar mórulas (45,5% y 36% respectivamente), alcanzando la fase de blastocistos 18,8% y 24,2% embriones correspondientemente. Entonces, el potencial más bajo de desarrollo ($P 0,01$) la tienen los embriones que alcanzan en 44-46 horas después de la fecundación sólo las fases de dos blastometros. De estos sólo 2 de 56 alcanzaron la fase de mórula-blastocisto que corresponde al 3,6%.

TABLA No. 2
Capacidad de los embriones de formar morulas y blastocistos en dependencia de la fase de desarrollo dentro de 44-46 horas después de la fecundación

Fases de desarrollo dentro de 44-46 h.	No. de Embriones	De ellos se desarrollaron hasta				No.	%
		MORULAS	BLASTOCISTOS	No.	%		
2 Blastomeros	56	0	0	2	3.6		
4 Blastomeros	112	51	45.5	21	18.8		
6 y más	157	55	36.0	38	24.2		

3. Análisis citológico de los embriones de ganado bovino fecundados in vitro

El análisis citológico de los embriones (Tabla No. 3) que llegaron a la fase de mórlulas fué hecho en los preparados totalmente fixados y coloreados con solución al 1% de lacmoido. La prueba hecha a los 6 días después de la fecundación demostró que los embriones que alcanzaron dicha fase representan una población heterogénea y cuentan con una cantidad de blastomeros que oscila entre 20-52. El número promedio de mitosis por embrión fué de $1,8 \pm 1,0$; los embriones presentaban una estructura normal, la cantidad de núcleos correspondía al número de blastomeros.

TABLA No. 3

Análisis Citológico de los embriones 6-7 días después de ser fecundados In Vitro

Edad del Embrión (días después de la fecundación)	No. de Blastómeros	No. de Embriones	No. de Mitosis	No. Promedio de mitosis
6 días	más de 20(20-52)	9	16	$1,8 + 1,0$
7 días	más de 32(32-70)	17	16	$4,5 + 2,8$

5. CONCLUSIONES

1. Fué determinada la posibilidad y las condiciones óptimas para el cultivo de embriones del ganado bovino, fecundados in vitro. Para superar el bloque mitótico del desarrollo, observado en su división de 8-16 células empleando en el medio de cultivo una monocapa con células epiteliales del oviducto y células granulosas. El empleo en calidad de monocapa de las células epiteliales aseguró el desarrollo del 47,7% de embriones hasta la fase de mórlulas-blastocistos, y del 38% de los mismos en las células de granulosa.
2. Fué revelada la dependencia entre la velocidad de desarrollo de los embriones fecundados in vitro y el alcance avanzado de las fases de mórlula - blastocistos. Se estableció que el porcentaje alto de embriones (64,3 - 60,2%) continúan su desarrollo hasta mórlula tardía y blastocisto, en caso de que dentro de 44-46 horas después de la fecundación éstos hayan alcanzado una división celular de 4-6 blastomeros y que en su defecto los embriones que durante dicho tiempo solo llegan a dos blastomeros tienen un desarrollo infinitamente pequeño (3,6%).

3. El análisis citológico de los embriones fecundados *in vitro* del ganado bovino en las fases avanzadas de desarrollo mórula-blastocisto, demostró que los embriones tenían una estructura normal, el número de núcleos correspondía al número de blastomeros y la presencia de la mitosis nos habló del funcionamiento normal de los embriones.

6. PROPOSICION PRACTICA

Como criterio de calidad para la efectividad en la fecundación, se recomienda emplear el índice de desarrollo de los embriones fecundados *in vitro* dentro de 44-46 horas. Donde dichos embriones deberán haber alcanzado un desarrollo de 4-6 blastomeros, éste dato representa un éxito del porcentaje del desarrollo de embriones hasta mórulas y blastocistos.

BIBLIOGRAFIA

ERNST L.K. Obtención de descendientes de ovocitos maduros y fecundados *in vitro*. Revista de Ciencias Agropecuarias, No. 7, pag. 67-85, 1983.

PROCOFIEVS M.I. Cultivo de ovocitos utilizando hormonas, Bioquímica y alimentación de animales domésticos, pag. 45-58, 1986.

CHEN-LU H.B. Effect of protein supplements on *in vitro* maturation. Theriog., vol. 33, pag. 205, 1990.

EYESTONE W.H. A study of the 8-to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. Theriog., vol. 25, pag. 152, 1986.

FUKUI Y., FUKUSHIMA M. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriog., vol. 20, pag. 651-660, 1983.

GOODROW K.L. et. al. Meiotic maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. Theriog., vol. 33, pag. 237, 1990.

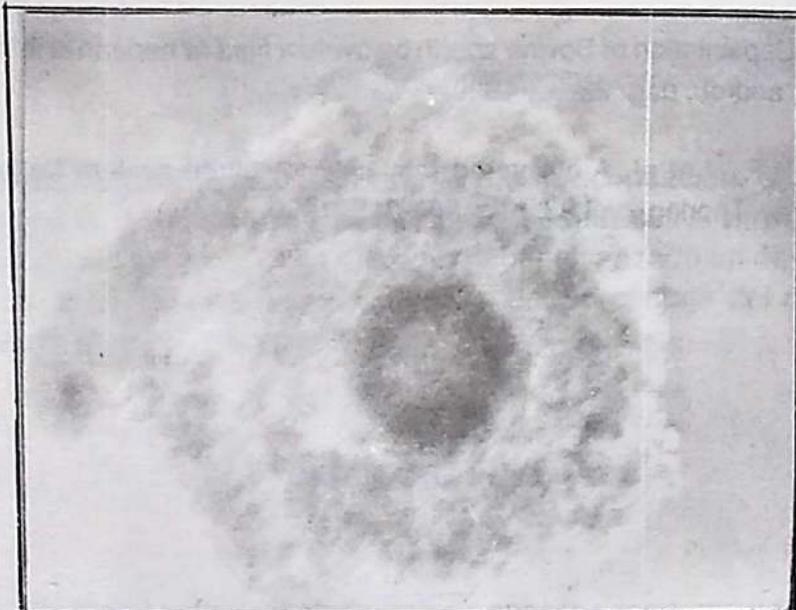
MOOR R.M., POLGE C. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. J. embriol. and appl. morphol., vol 56, pag. 319-355, 1980.

PARRISH J.J. Effects of swimup separation and heparin preteartment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. Biol reprod., pag. 122, 1984.

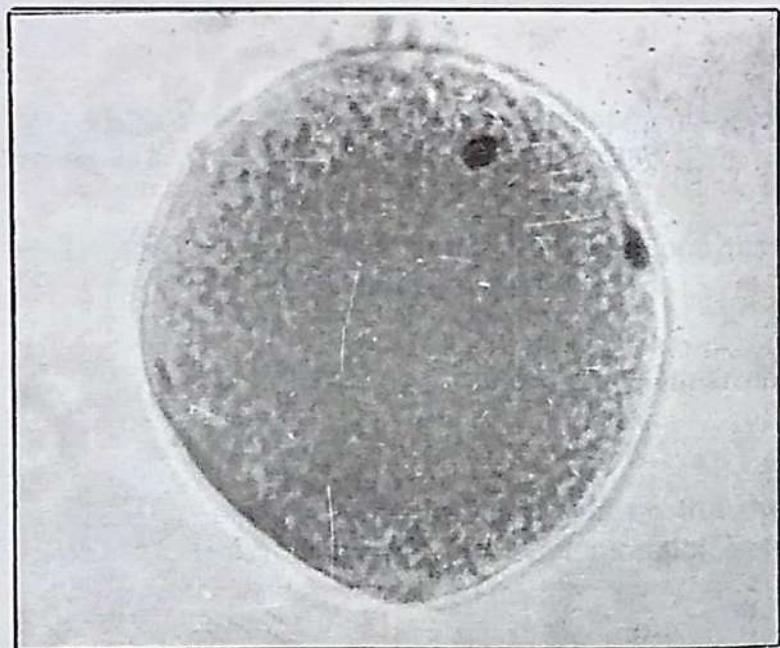
PARRISH J.J. Capacitation of Bovine sperm by oviduct fluid or heparin is inhibited by glucoce. j. androl., pag. 22-30, 1990.

RODRIGUEZ H.F., et al. A bylayered fetal-cell co-culture system for culturing bovine embryos. Theriog., vol 33, pag. 309-315, 1990.

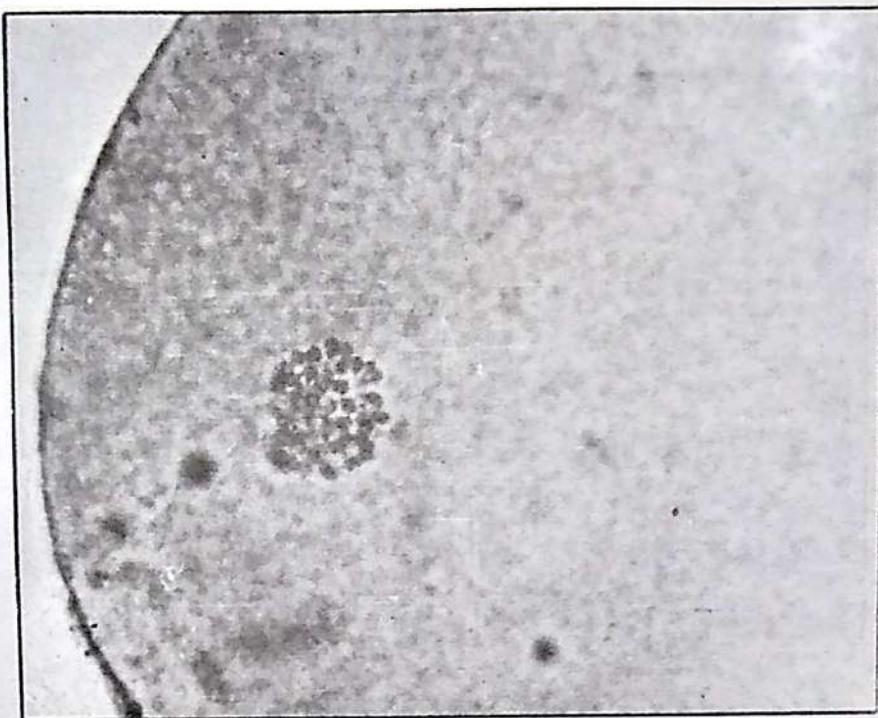
OVULO RODEADO DE CELULAS GRANULOSAS



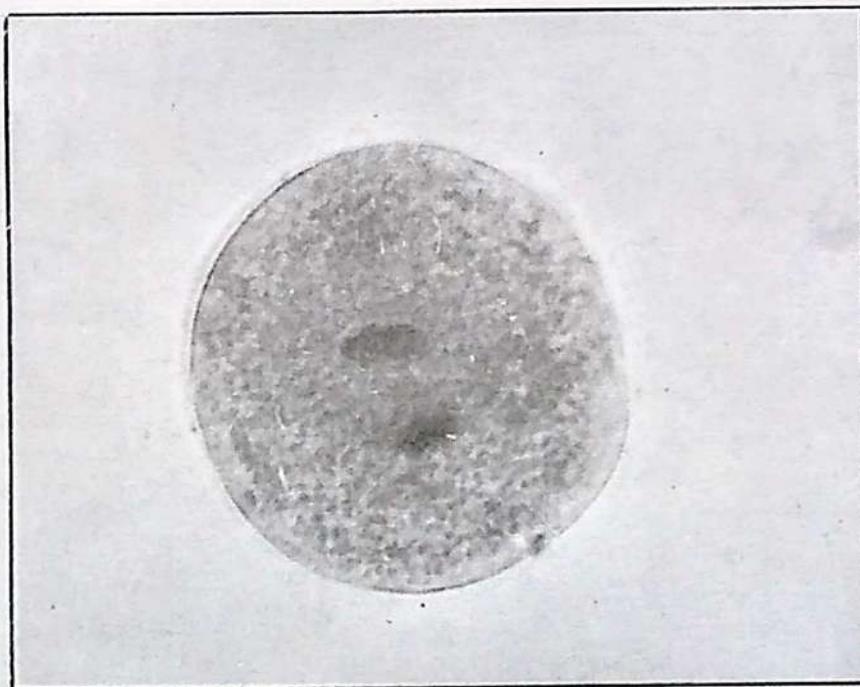
OVOCITO - MEIOSIS. II METAFASE



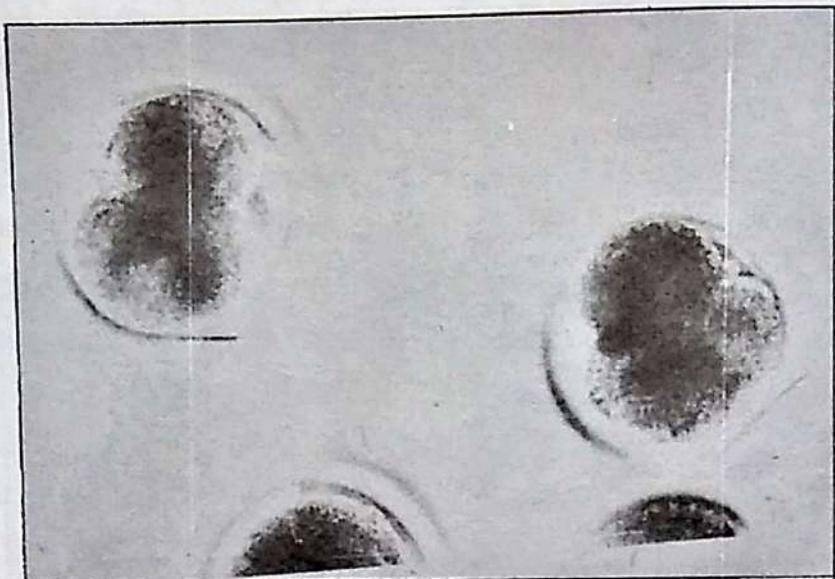
SEGMENTACION. METAFASE I



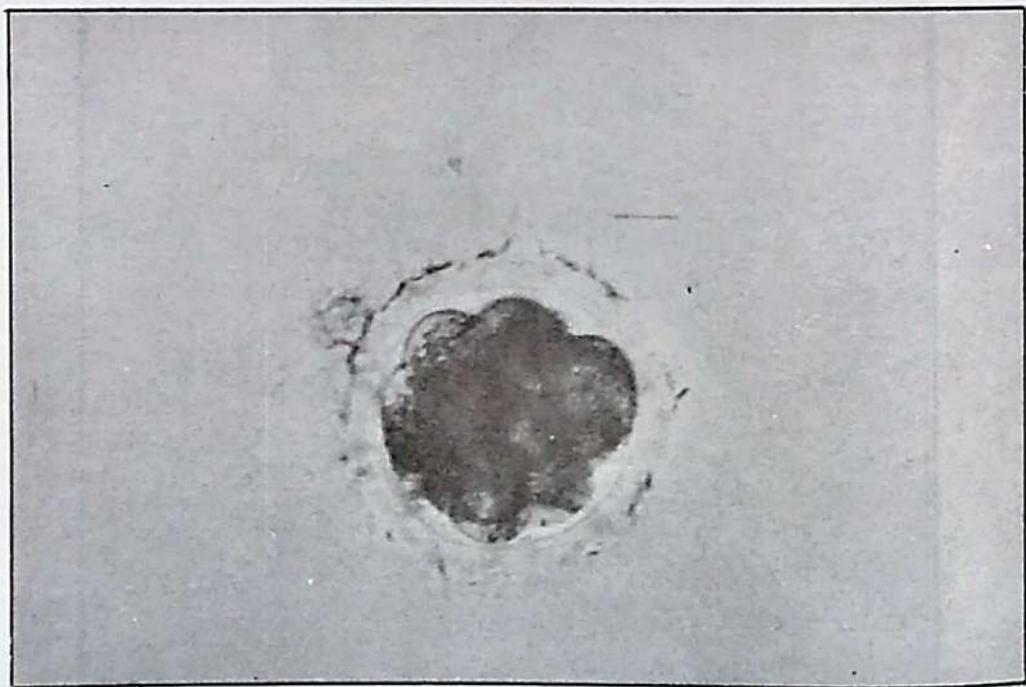
SEGMENTACION. TELOFASE I.



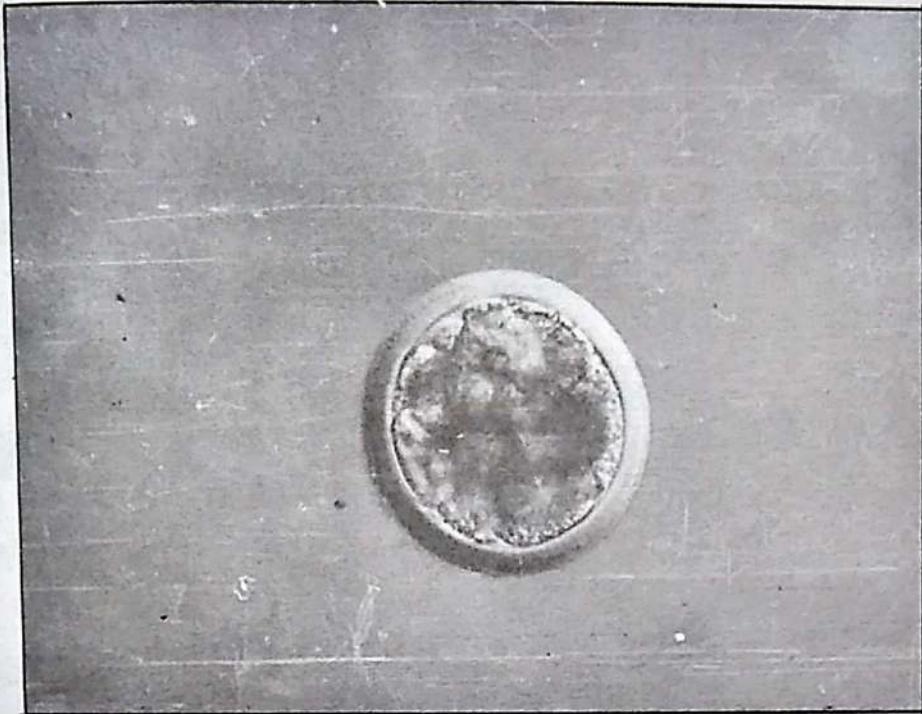
EMBRIONES 48 HORAS DESPUES DE LA FECUNDACION IN VITRO



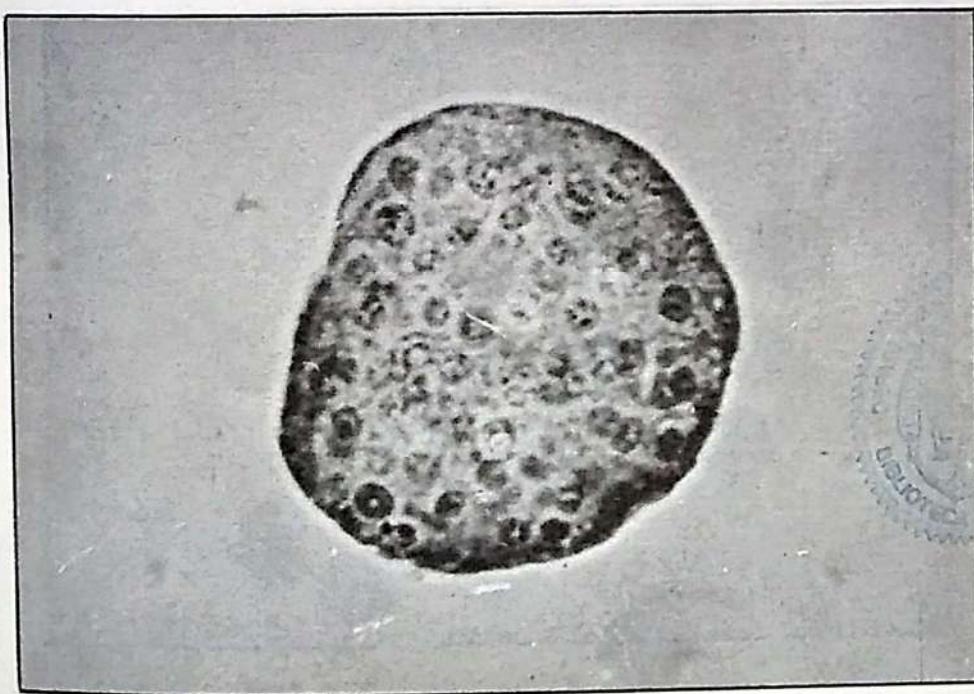
EMBRION EN LA FASE DE 8 CELULAS



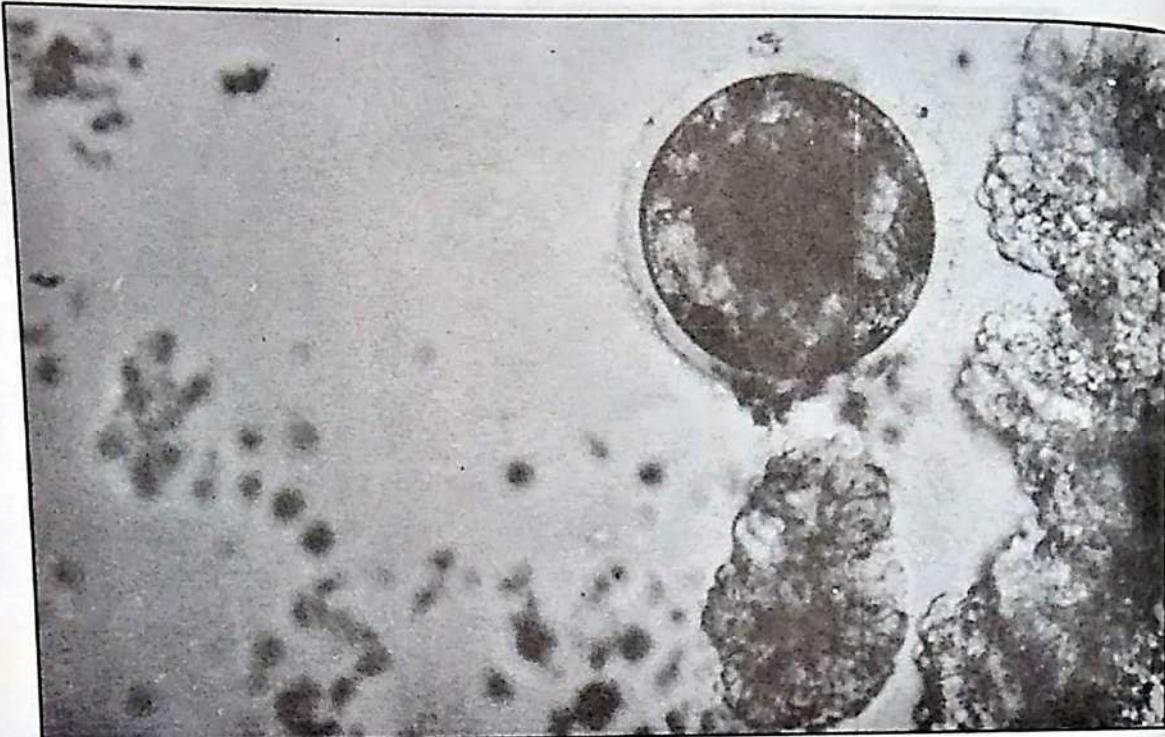
MORULA TARDIA



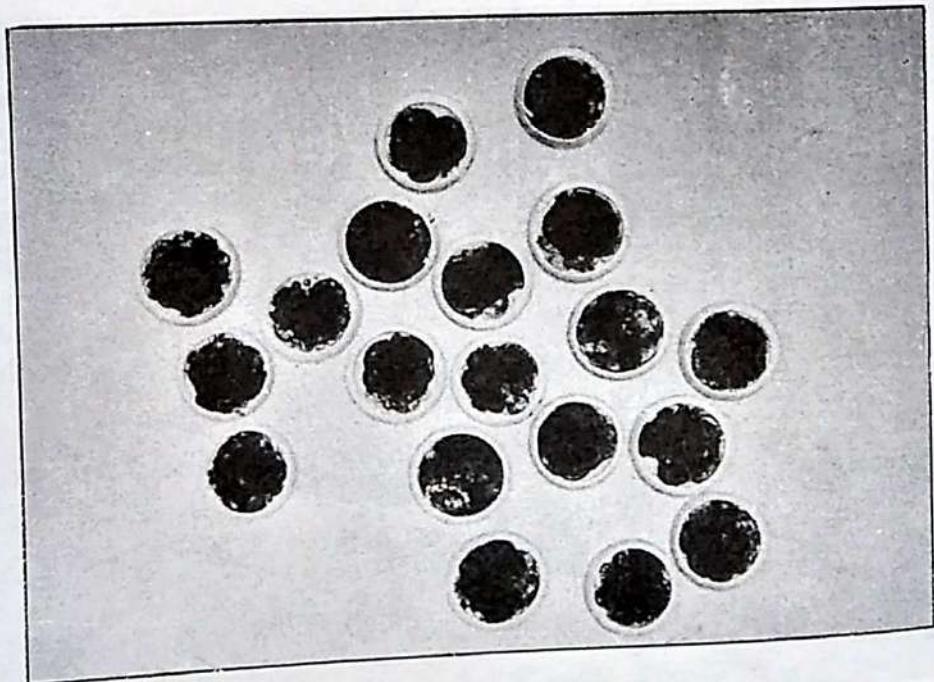
PREPARADO CITOLÓGICO DE UNA MORULA



BLASTOCISTO



**MORULAS Y BLASTOCISTOS 7-8 DIAS DESPUES
DE LA FECUNDACION IN VITRO**



MONOCAPA DE CELULAS GRANULOSAS



(RESEÑA SOBRE LA CULTURA DE LAS CELULAS
DE LA MAMMA HUMANA)

MONOCAPA DE CELULAS EPITELIALES



**EMBRIONES DE 8 CELULAS, 3 DIAS DESPUES DE LA FECUNDACION
(PREPARADO TOTAL CON LACMOIDE)**

