

---

---

## **CULTIVO DE EMBRIONES A TRAVÉS DE UN MEDIO MODIFICADO PARA AUMENTAR LA PREÑEZ EN GANADO BOVINO**

Andrés Quezada Casasola, Elisa A. Ramírez Padilla, Manuel Arellano Carrillo, Juan A. Quintero Elísea, Imelda Ramos Garcia, Mateo Itzá Ortiz, Jaime Romero González, Raymundo Rene Rivas Cáceres

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

### **RESUMEN**

Las condiciones de cultivo in vitro mejoran la calidad del embrión durante el desarrollo temprano y tardío, y modificaciones en las condiciones de cultivo pueden aumentar la expresión génica, el metabolismo celular o el estado de la impresión genómica. La investigación se enfocó en el metabolismo del embrión que fue medido en un medio modificado describiendo las principales vías por las cuales se implementa el Adenosin Trifosfato. Los medios usados para la capacitación espermática fueron HTF QUEEN, HTF HEPES, SPERM WASH MEDIUM, también se utilizó ATP. El espermatozoide fue incubado para la fertilización in vitro junto con los medios modificados para luego transferir los embriones a las vacas receptoras. El embrión tuvo un mejor desarrollo en presencia del ATP que con los medios estándares usados, preñándose 2 de las 5 vacas.

**Palabras Clave:** Embriones, medios modificados, fertilización in vitro, preñez.

### **INTRODUCCIÓN**

Se ha observado que las condiciones de cultivo in vitro afectan al embrión durante el desarrollo temprano y tardío. Modificaciones en las condiciones de cultivo pueden aumentar la expresión génica, el metabolismo celular o el estado de la impresión genómica, esto durante el desarrollo temprano, y también puede tener mejores condiciones en el desarrollo prenatal y postnatal, cuando embriones bovinos son cultivados en presencia de medios estandarizados.

Esta investigación se enfocará en el metabolismo del embrión que puede ser medido por un medio modificado, que describe las principales vías por las cuales se implementa ATP (Adenosin Trifosfato). Se

ha observado que las condiciones de cultivo in vitro mejoran la calidad del embrión durante el desarrollo temprano y tardío. Modificaciones en las condiciones de cultivo pueden mejorar; la expresión génica, el metabolismo celular o el estado de la impresión genómica, esto durante el desarrollo temprano, y también puede tener éxito en el aumento de las tasas de preñez. Ampliamente observados cuando embriones bovinos son cultivados en presencia de ATP.

### **METODOLOGÍA**

Los medios estándar utilizados para la capacitación espermática y la fertilización in vitro fueron; HTF QUEEN, HTF HEPES, SPERM WASH MEDIUM (Lavado de espermatozoides), con excepción de ATP 0.2 M, a partir de los cuales se realizaron los

medios modificados para la capacitación y los cultivos embrionarios.

**Obtención de Ovocitos:** Se obtuvieron ovarios de vaquillas de los cuales se extrajo el líquido folicular de cada uno de ellos, colocándose en una solución de KCl 0.1 % previamente incubada a una temperatura de 37 °C. Para la eliminación de la membrana se realizó una microcirugía con la ayuda microscopio estereoscópico para la liberación del ovulo, 24 horas después se llevaron los oocytos a una placa para embriones con medio HTF HEPES en campana de flujo, previamente clasificados como; Muy bueno, bueno, regular y/o malo, para llevarlos a incubación a 37 °C.

**Medios modificados:** El semen de toro Holstein contenido en pajillas se colocó en fresco en los siguientes medios (ATP 0.2 M, HTF QUEEN + ATP 0.2 M, HTF QUEEN, Control QUEEN, Control lavado, lavado HTF) a temperatura de 37 °C para capacitar al espermatozoide.

**Fertilización in vitro (FIV):** El espermatozoide tratado se incubo durante 1 hora a 37 °C, junto con los medios modificados, para posteriormente añadir 10 µl del espermatozoide tratado (Tabla 1).

**Transferencia de embriones (TE):** Se utilizaron un total de cinco vacas receptoras del rancho universitario, para realizar la transferencia de embriones con cuatro pajillas diseñadas con diferentes medios y sus controles (Tabla 2).

## RESULTADOS

Con los resultados se observó un mejor desarrollo del embrión en presencia de ATP, en comparación con los medios estándar utilizados, preñándose 2 vacas con medio modificado de fluido humano de transferencia mas Adenosin Trifosfato, (HTF-ATP). Al realizar transferencias de embriones de un total de cinco receptoras del rancho universitario (UACJ).

### Diseño experimental:

Tabla 1: Ovocitos fertilizados con espermatozoides capacitados en una modificación de medios tradicionales.

<i>N° Ovocitos</i>	<i>Etapas de desarrollo</i>	<i>Medio</i>
<i>1</i>	<i>Embrión 16 células (No bien desarrollado)</i>	<i>HTF QUEEN</i>
<i>2</i>	<i>Embrión de 16 células</i>	<i>CONTROL LAVADO</i>
		<i>LAVADO HTF</i>
<i>2</i>	<i>Blastocito</i>	<i>CONTROL QUEEN</i>
	<i>Blastocito Temprano</i>	<i>HTF QUEEN</i>
<i>1</i>	<i>Blastocito</i>	<i>QUEEN + ATP0.2M</i>
<i>1</i>	<i>Mórula compacta</i>	<i>ATP 0.2M</i>

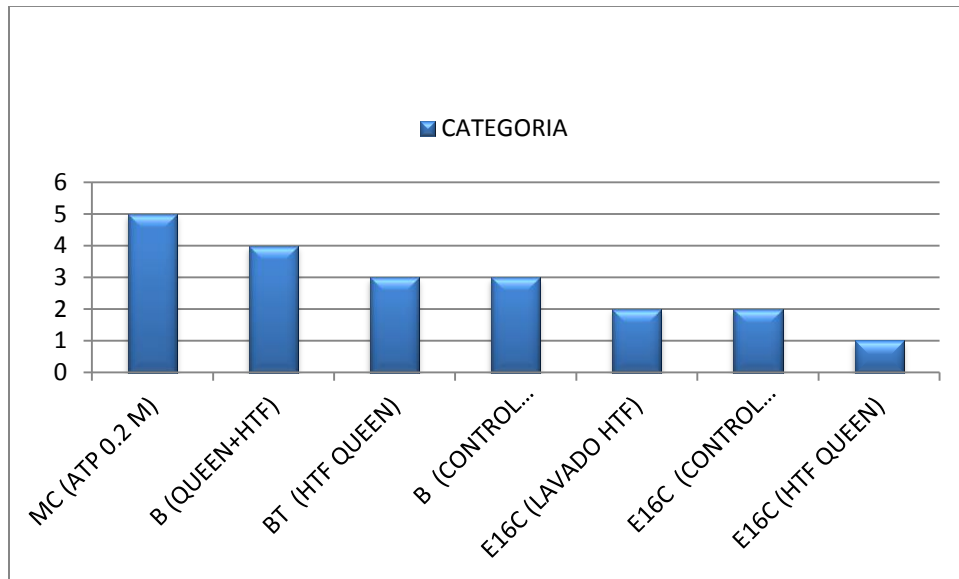


Fig. 1. Ovocitos fecundados

Tabla 2: Etapas de desarrollo embrionario con medios modificados (agregar ATP) y sus controles (HTF con hepes y Queen).

<i>ETAPA/MEDIO</i>	<i>CATEGORIA</i>
<i>MORULA COMPACTA (ATP 0.2 M)</i>	5
<i>BLASTOCITO (QUEEN+HTF)</i>	4
<i>BLASTOCITO TEMPRANO (HTF QUEEN)</i>	3
<i>BLASTOCITO (CONTROL QUEEN)</i>	3
<i>EMBRION DE 16 CELULAS (LAVADO HTF)</i>	2
<i>EMBRION DE 16 CELULAS (CONTROL LAVADO)</i>	2
<i>EMBRION DE 16 CELULAS (HTF QUEEN)</i>	1

<i>CATEGORIA</i>	
<i>MUY MALO</i>	1
<i>MALO</i>	2
<i>REGULAR</i>	3
<i>BUENO</i>	4
<i>MUY BUENO</i>	5

Tabla 3: Pajillas modificadas, calidad y días de desarrollo de los embriones, número de identificación de las vacas, raza y edad en meses, tamaño de crecimiento del cuerpo lúteo.

<i>Pajillas</i>	<i>Calidad</i>	<i>Día</i>	<i>I.D.</i>	<i>Raza</i>	<i>Edad (meses)</i>	<i>Cuerpo Lúteo</i>
<i>HTF + ATP</i>	<i>Excelente/Excelente</i>	<i>7</i>	<i>#5874</i>	<i>Holstein</i>	<i>48</i>	<i>14 mm</i>
<i>HTF + ATP</i>	<i>Bueno/Excelente</i>	<i>7</i>	<i>#5882</i>	<i>Charoláis</i>	<i>36</i>	<i>11 mm</i>
<i>HTF Queen</i>	<i>Excelente/Excelente</i>	<i>7</i>	<i>#5904</i>	<i>Angus Rojo</i>	<i>36</i>	<i>15 mm</i>
<i>HTF Hepes + ATP</i>	<i>Bueno/Bueno</i>	<i>4</i>	<i>#3900</i>	<i>Charoláis</i>	<i>36</i>	<i>13 mm</i>
<i>HTF Hepes</i>	<i>Excelente/Regular</i>	<i>4</i>	<i>#5878</i>	<i>Holstein</i>	<i>48</i>	<i>14 mm</i>

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La tasa de nacidos vivos por FIV-TE es del 30% por ciclo en humanos, Según el reporte del SART en Estados Unidos en el 2009 de manera global. Las posibilidades de éxito en bovinos varían mucho dependiendo de la calidad de los espermatozoides, raza y edad de los ovocitos que se utilizan (Tabla 3), para mejorar las posibilidades de implantación y preñez.

En la medida en que se mejora el conocimiento sobre los factores que afectan las tasas de implantación, se ha logrado obtener buenas tasas de preñez, con las transferencias de embriones (TE), de un número mínimo de dos embriones. Los embriones se clasifican según el número de células, la velocidad de crecimiento y el grado de fragmentación, Por lo que los embriones los clasificamos como: muy buenos (categoría 5), buenos (categoría 4), regular (categoría 3), malos (categoría 2) y muy malos o fragmentados (categoría 1), preñándose dos vacas con transferencia de dos embriones de categoría muy bueno y bueno (categoría 5 y 4) y buenos (Categorías 4 y 4). El número de embriones a transferir depende de la cantidad disponible, meses de la receptora, consideraciones diagnósticas. Otros factores que determinan la tasa de éxito incluyen la calidad de los ovocitos, los espermatozoides, y el estado del útero.

La literatura reporta diferencias significativas en los nacidos vivos cuando se transfieren embriones en día 4 o en día 7. Pero sabemos que entre más nos acerquemos a los estadio de mórula compacta y blastocito más probabilidad de implantación tendrá el embrión y más sincronizada estará también la receptividad del endometrio con el estadio de los embriones.

En lo particular nosotros cultivamos a un día 7 cuando tenemos un embrión y en el día 4 cuando tenemos 2 embriones en cultivo, hay que tomar en cuenta que tales estadios de desarrollo en condiciones in vivo se encuentran en los cuernos uterinos y no en el útero, por lo que puede (no siempre) dar bajas tasas de preñez que si se transfieren embriones en estadios de compactación o blastocito.

Una alternativa es realizar transferencias de embriones en estadios de mórula compacta y blastocito; día 7 (D+7 ET) para disminuir el número de embriones transferidos, afortunadamente hoy en día se cuenta con un mejor control del laboratorio de FIV., así como también contamos con una variedad de medios de cultivo (ATP-HTF) el cual nos permite desarrollar embriones hasta estadios de mórula compacta y blastocito con resultados favorables.

También pudimos ver en los resultados que de las razas Charoláis, Holstein y Angus Rojos, las únicas receptoras que se preñaron fueron las Charoláis, además que las vacas de mayor edad (48 meses) no se preñaron en comparación con las más jóvenes (36 meses). De igual manera pudimos corroborar que al utilizar el medio modificado (HTF-ATP), se preñaron dos vacas de cinco programadas, representando un 40% por ciclo, un 10% más efectivos en comparación con los ciclos de vanguardia utilizados en humanos. Por lo tanto al aplicar este medio modificado creemos que el ATP entran a las células embrionarias, y presenta un mejor metabolismo de los embriones in vitro que puede ser correlacionados con la viabilidad del embrión y el aumento de preñez en la transferencia de embriones.

## REFERENCIAS

Summers, M.C. Biggers, J.D. (2005). *Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues*. Hum Repro Update 9: 557-82.

Khosla, S. Dean, W. Reik, W. et al. (2001). *Culture preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype*. Hum Reprod. Update. 7: 419-27.

Papanikolaou, E.G. Camus, F. Tournaye H.M. Verheyen, H. Van Steirteghem, A. et al. (2006). *Early pregnancy loss is significantly higher after day 3 single embryo transfer than after day 5 single blastocyst transfer in GnRH antagonist stimulated IVF cycles*. Reprod Biomed online. 12: 60-65.

Ballantyne, C. (2008). *Better tests boost IVF success*. Nature Medicine 14: 1169.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P (2006). *In Vitro Fertilization with Single Blastocyst-Stage versus Single Cleavage-Stage Embryos*. N Engl J Med 354: 1139.

Urbina, M.T. Lerner, J. (2008). *Fertilidad y reproducción asistida*. La ed Caracas: Editorial Medica Panamericana capítulo 46, pp491- 511.

Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2009. (REDLARA)

[http://www.redlara.com/aa\\_espanhol/registro.asp](http://www.redlara.com/aa_espanhol/registro.asp)

Sart (Society for Assisted Reproductive Technology). (2006). American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: results generated from the American Society for Reproductive

Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology (2009).

Buchanan, A. Brock, D.W. Daniels, N. Wikler, D. (2000). *Chance to Choice: Genetics and Justice*. Cambridge University Press.

Ajduk, A. y Zernicka-Goetz M. (2012) *Advances in embryo selection methods*. F1000 BiologyReports 4:11.

Harper JC, Harton G. (2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. Fertility and Sterility 94: 1173-1177

*Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential*. Gardner DK et al. Fertility and Sterility 2001, 76:1175-1180.

Emre Seli et al. (2010). Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryos assessment in women undergoing single embryo transfer. Fertility and Sterility, 94:535-542.