

NOTA CORTA [SHORT NOTE]

EVALUACIÓN DE DOS MEDIOS DE MADURACIÓN *in vitro* PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES OVINOS

[EVALUATION OF TWO *in vitro* MATURATION MEDIUM FOR EMBRYO PRODUCTION IN SHEEP]

**J.M. Robledo Verduzco¹, J. Herrera-Camacho^{2*}, M. Cajero-Juárez²,
M.C. Navarro-Maldonado³ and A. García-Valladares⁴**

¹*Instituto Tecnológico del Valle de Morelia.*

²*Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales UMNSH. Posta Zootécnica km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. CP 58880. Tarímbaro Michoacán, México.*

E-mail: josheca@hotmail.com

³*Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.*

⁴*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.*

**Corresponding author*

RESUMEN

Se evaluó la tasa de maduración (MIV), de fertilización (FIV) y el desarrollo embrionario (DIV) *in vitro* a partir de ovocitos de oveja madurados en dos medios de cultivo. Los complejos cúmulo-ovocitos (COC) se obtuvieron, por punción/aspiración de folículos de 2-6 mm de diámetro de ovarios de ovejas sacrificadas en rastro. Un total de 120 COC de calidad 1 y 2 fueron distribuidos aleatoriamente en dos medios de maduración; 57 de los cuales fueron colocados en medio de cultivo para embriones de hámster 9 (HECM-9, por sus siglas en inglés: Hamster Embryo Culture Medium) y 63 en el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199, por sus siglas en inglés: Tissue Culture Medium), ambos medios suplementados con hormona folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y factor de crecimiento epidérmico (EGF); los COC fueron colocados en 450 µL de medio de maduración e incubaron por 24 h. Para la FIV, cada grupo de COC fueron transferidos a 450 µL de medio de fertilización (SOFm + Oaa) donde se adicionaron 0.5×10^6 espermatozoides móviles y fueron incubados durante 24 h; semen fresco obtenido mediante vagina artificial, fue utilizado. Los cigotos fueron transferidos a 450 µL de medio de cultivo (SOFm+Oaa+Glucosa). Las condiciones ambientales, en todas las etapas se desarrollaron, bajo una atmósfera saturada de humedad, a 38.5° C y 5 % de CO₂ en el aire. El desarrollo y morfología de embriones fue evaluado a 2, 4, 5 y 6 días de iniciado el cultivo, retirándose de las cajas de cultivo los ovocitos no fertilizados y cigotos no desarrollados, a partir del día 2; la tasa final de producción embrionaria se determinó al día 8 post-FIV. La tasa de MIV no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los dos tratamientos (73.3 vs 71.4 % en HECM-9 y TCM-199, respectivamente).

La tasa de FIV fue diferente ($P < 0.05$) entre tratamientos, observando una mejor respuesta de los ovocitos madurados en HECM-9 respecto a los madurados en TCM-199 (47.4 vs 28.6%, respectivamente). La tasa de DIV fue mayor con los ovocitos madurados en HECM-9 respecto a los madurados en TCM-199 (26.3 vs 7.9%, respectivamente). El medio HECM-9 favoreció las tasas de fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de ovinos en comparación con el medio TCM-199.

Palabras clave: Maduración, fertilización, ovocitos, embriones, ovinos

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of HECM-9 and TCM-199 as maturation media on maturation (MR), *in vitro* fertilization (IVF) and embryo development (ED) rate of oocytes from hair sheep collected from slaughter house ovaries. Cumulus-oocyte-complexes (COC) were obtained by manual aspiration, from 2-6mm diameter follicles. Groups of 10-20 COC, quality 1 and 2 were placed into 450µL of HECM-9 or TCM-199 and incubated 24h at 38.5 °C and 5% CO₂. For IVF, COC were transferred to 450µL of SOFm+Oaa, 0.5×10^6 motile spermatozoa were added and then incubated at 38.5 °C and 5% CO₂. Alleged zygotes were transferred to 450µL of SOFm+Oaa+glucose. Embryo development and morphology were evaluated at 2, 4, 5 and 6 days of culture, not developed zygotes were removed on day 2 and the final rate of embryo production was determined on day 8 of culture. Oocyte MR showed no significant differences ($P > 0.05$) between treatments (73.3 vs. 71.4 % HECM-9 and TCM-199,

respectively). Fertilization rate was different ($P < 0.05$) between treatments, observing a better response from oocytes matured in HECM-9 than those matured in TCM-199 (47.4 vs. 28.6%, respectively). Embryo development was greater ($P < 0.05$) in oocytes matured in HECM-9 than those matured in TCM-199 (26.3 vs.

7.9%, respectively). We conclude that HECM-9 increased *in vitro* fertilization rate and embryo development in ovine oocytes.

Key words: Maturation, fertilization, oocytes, embryos, ovine

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales factores que limitan la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* (PEIV), es la maduración *in vitro* (MIV), ya que aún después de la selección cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito (COC), solo poco más de la tercera parte alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para su transferencia, lo que ocasiona que ésta técnica de reproducción asistida sea menos eficiente, comparada con la producción de embriones *in vivo* (De Wit *et al.*, 2000, Rizos *et al.*, 2002); probablemente debido a la incapacidad del medio de cultivo utilizado durante la MIV para reproducir las complejas señales y comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio (Eppig *et al.*, 1996), afectando la tasa de fertilización *in vitro* y su desarrollo embrionario (Cognié *et al.*, 2003, Korhonen *et al.*, 2005).

Los medios comerciales comúnmente utilizados para la MIV, tal como el TCM-199 suplementado con suero de origen animal o derivados de éste, son complejos y químicamente no definidos, se han obtenido resultados aceptables; sin embargo, para algunos autores, el uso de tales medios presenta algunos inconvenientes. Al respecto, el TCM-199, originalmente diseñado para el cultivo de células somáticas (Pinyopummintr y Bavister, 1991) y uno de los medios base más comúnmente usado en la PEIV en animales (Sutton *et al.*, 2003), contiene algunos componentes, como la hipoxantina (Bavister *et al.*, 1992), la glucosa y fosfatos (Pinyopummintr y Bavister, 1991) que han sido asociados con el bloqueo o inhibición del desarrollo embrionario temprano en bovinos y en hámsteres, respectivamente. Adicionalmente, anomalías tales como una gestación prolongada y un mayor peso al nacimiento en ovinos han sido atribuidas al uso de sueros o sus derivados en los medios de MIV, FIV, DIV, representando además, una potencial vía de introducción de agentes patógenos o toxinas (Thompson, 2000).

Alternativamente, se han desarrollado medios de cultivo simples, químicamente definidos y libres de proteína, tales como el fluido oviductal sintético (SOF), utilizado para la MIV de COC en bovinos (Ali y Sirard, 2002, Oyamada *et al.*, 2004) y en ovinos

(Walker *et al.*, 1996), con resultados satisfactorios. Variantes subsecuentes del medio de cultivo para embriones de hámster o HECM, debido a cambios en sustratos de energía, aminoácidos y vitaminas, se han utilizado para la producción de embriones en diversas especies. Al respecto, el HECM-6, se ha utilizado para la MIV en bovinos soportando igual tasa de maduración (66-78 %) y desarrollo embrionario (21 y 25 %) comparado con los COC madurados en TCM-199 (Rose-Hellekant *et al.*, 1998). De igual forma, Navarro *et al.* (2006), obtuvieron una tasa de maduración del 65 %, utilizando el HECM-9 como medio de MIV en ovinos.; sin embargo, no existen reportes de la obtención de embriones de ovino, a partir de ovocitos madurados en este medio, por lo que el objetivo del estudio fue la evaluación de dos medios de maduración *in vitro* sobre la tasa de maduración, fertilización y desarrollo embrionario, con ovocitos inmaduros, colectados de ovarios de ovejas de pelo. La justificación del trabajo radica en la necesidad de desarrollar un sistema simple de cultivo que confiera al ovocito la capacidad de maduración y que permita una buena tasa de fertilización y desarrollo embrionario. La hipótesis a probar es que, utilizando el HECM-9 como medio de maduración en comparación con el TCM-199, se obtienen mayores tasas de fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se realizó en la Fac. Med. Vet. y Zoot. – Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en el Km. 9.5 de la Carretera Morelia-Zinapécuaro, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México.

Obtención de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de ovejas de razas de pelo sacrificadas en rastro y transportados al laboratorio dentro de las 2 h siguientes, en solución salina al 0.9%, a una temperatura de 25-30° C (Goswami *et al.*, 2004).

Colección, evaluación y selección de complejos cúmulo-ovocitos (COC)

Los COC fueron obtenidos por punción/aspiración manual de folículos de 2-6 mm de diámetro, utilizando

una aguja hipodérmica de calibre 18 y una jeringa de 5-10 cc; empleándose como soporte el medio TCM-199-Hepes-amortiguador (M-199, bicarbonato de sodio, Hepes y alcohol polivinílico o PVA 0.1%), suplementado con 100 UI/ml de heparina. Los COC colectados fueron evaluados y clasificados, con base en la morfología del citoplasma y capas celulares, tomado los criterios descritos por Ward et al. (2000). Dado que todos los COC fueron colectados en previamente los COC se lavaron en 3 ocasiones consecutivas en el medio de maduración correspondiente.

Maduración *in vitro* (MIV)

De un total de 375 COC colectados, 120 de ellos clasificados como grados 1 y 2, fueron seleccionados para su cultivo *in vitro*, distribuyéndose aleatoriamente en los dos medios de maduración a evaluar: 57 COC fueron colocados en HECM-9 y 63 en TCM-199; lavándose previamente, en el medio de maduración correspondiente en 3 ocasiones consecutivas. Para su manejo, se colocaron grupos de 10-15 COC en 450 μ L de medio por cada pozo, cubriéndose con aceite mineral, incubándose durante 24 h, a 38.5° C y 5 % de CO₂, en aire saturado de humedad. El TCM-199 fue suplementado con bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 0.91mM, D-glucosa 3.05mM y cisteína 0.57mM. El HECM-9, fue elaborado con medio básico-3 o BM-3 (NaCl 113.6 Mm, KCl 3.0 Mm, MgCl₂-6H₂O 0.46 Mm, NaHCO₃ 25.0 Mm, DL Lactato de sodio 4.5 Mm, HCl 0.0014 Mm, CaCl-2H₂O 1.9 Mm), suplementado con 11 aminoácidos (L-Ácido Aspártico 0.01 Mm, L-Ácido Glutámico 0.01 Mm, L-Asparangina 0.01 Mm, L-Cisteína 0.01 Mm, L-Glicina 0.01 Mm, L-Glutamina 0.2 Mm, L-Histidina 0.01 Mm, L-Lisina 0.01 Mm, L-Prolina 0.01 Mm, L-Serina 0.01 Mm, Taurina 0.5 Mm) y pantotenato 3.0 Mm (McKiernan and Bavister 2000). Ambos medios de maduración fueron enriquecidos con 0.5 μ g/ml de FSH, 0.5 μ g/ml de LH, 10ng/ml de EGF, 75 μ g/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina, ajustándose el pH a 7.0-7.2.

Fertilización *in vitro* (FIV)

Para la FIV se utilizó, el fluido oviductal sintético modificado suplementado con aminoácidos (SOFm + Oaa), independientemente del medio utilizado para la maduración de los COC. Una vez transcurrida la MIV, los COC fueron lavados 2-3 veces en medio de fertilización y Hepes e inmediatamente transferidos a otra caja de cultivo, conteniendo en cada pozo 450 μ L de medio de fertilización, cubierto con aceite mineral. Aproximadamente 0.5 X 10⁶ espermatozoides móviles, obtenidos de la fracción superior del medio a través del procedimiento de Swim up”, fueron depositados en cada pozo; semen fresco obtenido mediante la técnica

de vagina artificial, fue utilizado. Los COC y espermatozoides fueron subsecuentemente incubados durante 24 h a 38.5° C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en aire. El medio de fertilización, SOFm + Oaa, fue preparado conforme a lo descrito por Walker *et al.* (1996); este medio contiene fluido oviductal sintético modificado (SOFm) como medio base (NaCl 107.7 Mm, KCl 7.16 mM, KH₂PO₄ 1.19 mM, CaCl₂ 1.71mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaHCO₃ 25.07 mM, Lactato de Sodio 3.30 mM, Piruvato de Sodio 0.33 mM y PVA 0.1%, en sustitución de suero), suplementado con 21 aminoácidos (Oaa) a concentraciones existentes en el fluido oviductal (L-Arginina 0.090 mM, L-Ácido Aspártico 0.022 mM, L-Asparagina 0.024 mM, L-Alanina 0.431mM, L-Cistina 0.040 mM, L-Ácido Glutámico 0.054 mM, L-Glutamina 0.101 mM, L-Glicina 1.390 mM, L-Histidina 0.042 mM, L-Isoleucina 0.097 mM, L-Leucina 0.194 mM, L-Lisina 0.194 mM, L-Metionina 0.055 mM, L-Ornitina 0.019 mM, L-Fenilalanina 0.095 mM, L-Serina 0.009 mM, L-Taurina 0.049 mM, L-Treonina 0.009 mM, L-Tirosina 0.089 mM, L-Valina 0.264 mM).

Desarrollo embrionario *in vitro* (DIV)

Transcurridas 24 h de FIV, remanentes de las capas de células del *cúmulus oophorus* y espermatozoides fueron removidas mediante pipeteo continuo. Subsecuentemente, los ovocitos fertilizados fueron lavados dos veces, en medio de desarrollo y transferidos a la caja de cultivo donde cada pozo contenía 450 μ L de medio de desarrollo (SOFm + Oaa + glucosa + PVA), cubiertos con aceite mineral. El cultivo se mantuvo a 38.5° C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en el aire. El desarrollo y morfología de embriones fue evaluado a 2, 4, 5 y 6 días de iniciado el cultivo, retirándose de las cajas de cultivo los cigotos no desarrollados a partir del día 2; la tasa final de producción embrionaria se determinó al día 8 post-FIV.

Análisis estadístico

La tasa de maduración (MIV), de fertilización (FIV) y de desarrollo embrionario (DIV), fueron consideradas como variables de respuesta. La MIV se evaluó a 24 h post-FIV, considerando como signos de maduración los ovocitos que mostraban segmentación, así como aquellos ovocitos no segmentados con expulsión del primer cuerpo polar. La FIV, fue considerada como el porcentaje de ovocitos que a la evaluación microscópica mostraron segmentación, así como los ovocitos en donde se observó la formación de pronúcleos y la presencia de dos cuerpos polares. La DIV, fue considerada como el porcentaje de embriones que presentaron blastómeros y cambios en su morfología y estado de desarrollo durante los 8 días

pos-FIV. El análisis estadístico para cada una de las variables de respuesta, se realizó mediante la prueba de X^2 , utilizando el paquete estadístico SAS (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de ovocitos madurados (Tabla 1) en función de los COC sometidos a este proceso, no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre los dos tratamientos, observando una tasa de MIV de 73.3 vs 71.4 % en el medio HECM-9 y TCM-199, respectivamente. Una respuesta inferior a la encontrada en el presente trabajo fue reportada por Navarro *et al.* (2006), quienes observaron una tasa de MIV de 65.0% en medio HECM-9 y de 71.0% en TCM-199, aunque tampoco tuvieron diferencias significativas.

Para la variable FIV, existieron diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos, quedando fertilizados el 47.4 % de los ovocitos madurados en HECM-9 contra 28.6 % de aquellos madurados en TCM-199. Navarro *et al.* (2006) también reporta una mejor tasa de fertilización, utilizando el HECM-9 como medio de maduración (25 %) contra 6 % al utilizar el TCM-199.

En lo referente al DIV, se observó una mejor respuesta ($P<0.05$) en los ovocitos que fueron madurados en HECM-9 (26.3 %) respecto a los madurados en TCM-199 (7.9 %). Esta respuesta puede ser atribuida a la presencia de pantotenato en el medio HECM-9 (no contenida en el TCM-199), vitamina hidrosoluble esencial para la biosíntesis de coenzima A, la cual es

un cofactor para una cantidad importante de reacciones enzimáticas incluyendo la oxidación de los ácidos grasos, piruvato, lactato y aminoácidos; nutrientes indispensables para el cultivo de células, incluyendo los embriones (McKiernan y Bavister, 2000). Al respecto, los mismos autores, reportan que la adición de pantotenato 3.0 mM al medio HECM-6 (ahora designado HECM-9) mostró un efecto positivo sobre el desarrollo de embriones de hámster (en promedio, 24.3 % más blastocitos), en comparación con la adición de otras vitaminas al medio HECM-6.

Este es el primer reporte de desarrollo embrionario post-fertilización *in vitro* en ovinos, utilizando el HECM-9 como medio de maduración, sin suplementación de suero. Y si se compara con resultados en bovinos, el porcentaje de blastocitos obtenidos es similar a lo reportado por Keskinpepe *et al.* (1995), quienes obtuvieron el 28%, utilizando el TCM-199 como medio de MIV y SOFm como medio para fertilización y desarrollo embrionario. Considerando estadísticas generales respecto a la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*, que señalan que del total de COC utilizados en este proceso, aproximadamente el 30-40% pueden alcanzar el estado de blastocito (Lonergan *et al.*, 2001), la tasa de DIV obtenida en el presente trabajo, utilizando un medio simple libre de proteínas de suero o derivados para su maduración (HECM-9) es alentador, no obstante de no haberse evaluado su viabilidad para ser transferidos a ovejas receptoras. En conclusión, la maduración de ovocitos en medio HECM-9 favoreció la fertilización y el desarrollo de embriones *in vitro* hasta la etapa de blastocito.

Tabla 1. Efecto de dos medios de cultivo sobre la maduración, fertilización y desarrollo embrionario en ovinos.

Medios de cultivo	Número de COC	MIV		FIV		DIV	
		No.	%	No.	%	No.	%
HECM-9	57	42/57	73.6 ^a	27/57	47.4 ^a	15/57	26.3 ^a
TCM-199	63	45/63	71.4 ^a	18/63	28.6 ^b	5/63	7.9 ^b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $p<0.05$.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. José Herrera Camacho, agradece al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública, por el financiamiento otorgado para el desarrollo trabajo.

REFERENCIAS

- Ali, A., Sirard, M.A. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* 66: 901-905.
- Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37:127-146.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59:171-188.

- De Wit, A.A.C. Wurth, Y.A., Kruij, Th. A.M. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science* 78:1277-1283.
- Eppig, J.J., O'Brien, M., Wigglesworth, K. 1996. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 44:260-273.
- Goswami, P.C., Ali, S.Z., Khandoker, M.A.M.Y., Azmal, S.A., Alam, M.K., Khatun, R. 2004. Collection and grading of bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) from slaughter house ovaries in view of *in vitro* maturation, fertilization and culture. *Pakistan Journal of Biological Science* 10:1777-1781.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of Reproduction* 52:1410-1417.
- Korhonen, K., Matomäki, J., Ketoja E, Kananen K, Halmekytö B, Rätty M, Peippo J 2005. The effect of *in vitro* maturation medium on cryosurvival, cell numbers and apoptotic indexes of bovine embryos. *Proceedings of the Annual Conference of International Embryo Transfer. Reproduction, Fertility and Development* 17: 293.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 41:427-437.
- McKiernan, S.H., Bavister, B.D. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Human Reproduction* 15:157-164.
- Navarro, M.C., Ducoy, R.Y., Galindo, R.A., Rosado, G.A. 2006. Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to *in vitro* fertilization. *Reproduction Fertility and Development* 18:275-276.
- Oyamada, T., Iwayama, H., Fukui, Y. 2004. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocyte using a chemically defined medium. *Zygote*. 12:143-150.
- Pinyopummintr, T., Bavister, B. D. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 45: 736-742.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*. 61:234-248.
- Rose-Hellekant, T.A., Libersky-Williamson E. A., Bavister B.D. 1998. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote*. 6:285-294.
- SAS. 2000. Statistical Analysis System. Institute Inc. North Carolina. USA.
- Sutton, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G. 2003. Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction*, 9:35-48.
- Thompson, J.G. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* 60–61:263–275.
- Walker, S.K., Hill, J.L., Kleemann, D.O., Nancarrow, C.D. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction* 55:703-708.
- Ward, F.A., Lonergan P, Enright BP, Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*. 54:433-446.

Submitted June 26, 2008 – Accepted October 29, 2008
Revised received November 21, 2008