

EFFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES *Bos taurus x indicus*

Effect of Different Culture Media on the *In Vitro* Production of *Bos Taurus X Indicus* Embryos

Zeylin Millano-Bracho, Liz Rosell-Viloria, Yadira Urribarrí-Rodríguez, Rafael Sánchez-Parra, Francisco Báez-Contreras y Patricia Villamediana-Monreal.

Laboratorio de Citogenética. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. franciscobaez81@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción *in vitro* (PIV), contenido lipídico e índice de apoptosis de blastocistos bovinos mestizos, utilizando como base el medio de fluido oviductal sintético modificado (mSOFAaci) suplementado con alcohol-polivinílico (PVA), albúmina sérica bovina (BSA) y suero fetal bovino (FCS). Para ello, se colectaron ovarios de hembras sacrificadas en matadero, los complejos *cúmulus*-ovocito (COCs) fueron madurados, fecundados y luego los presuntos cigotos se cultivaron *in vitro* en los diferentes medios: (1) mSOFAaci+PVA (0,1mg/mL) desde el día 1 (D1) al día (D8), (2) mSOFAaci+BSA (6mg/mL) desde el D1 al D8, (3) mSOFAaci+BSA + 5% FCS desde el D6 al D8 y (4) mSOFAaci+BSA+ 1% FCS desde el D1 al D8. Los resultados no mostraron diferencias significativas ($P<0,05$) entre las tasas de blastocistos de D8 producidas por los tratamientos con PVA, BSA, BSA + 5% FCS (16,56; 19 y 15,6%, respectivamente), pero si hubo diferencias entre el tratamiento de PVA y BSA con el grupo de BSA + 1% FCS (11,6%; $P<0,05$). Para el contenido lipídico, los tratamientos con PVA y BSA presentaron menor cantidad de gotas lipídicas y en su mayoría gotas pequeñas, mientras que con BSA + 1 y 5% de FCS, la presencia de gotas grandes fue mayor, respecto a los otros tratamientos ($P<0,05$). De igual manera, el índice de apoptosis aumenta con la presencia de suero en el medio de cultivo. En conclusión, el medio de cultivo con PVA es capaz de soportar el desarrollo embriones bovinos mestizos. El medio libre de suero que se empleó para producir *in vitro* embriones bovinos debe seguir perfeccionándose para cubrir los requerimientos y demanda a gran escala.

Palabras clave: *In vitro*; blastocistos; bovino; gotas lipídicas; apoptosis.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of different culture media on *in vitro* production (IVP), lipid content and rate of apoptosis of crossbred bovine embryos, using the modified synthetic oviduct fluid (mSOF) medium supplemented with polyvinyl-alcohol (PVA), bovine serum albumin (BSA) and fetal calf serum (FCS). For that, ovaries from slaughtered females were collected, the *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were matured, fertilized and then the embryos were cultured *in vitro* in the different systems: (1) mSOFAaci+PVA (0.1mg/mL from day 1 (D1) to day (D8), (2) mSOFAaci+BSA (6mg/mL) from D1 to D8, (3) mSOFAaci+BSA + 5% FCS from D6 to D8 and (4) mSOFAaci+BSA+ 1% FCS from D1 to D8. The results showed no significant differences ($P<0.05$) among the rates of blastocysts at D8 produced by treatments whit PVA, BSA, BSA + 5% FCS (16.5; 19 and 15.6%, respectively), but there were differences between treatment whit PVA y BSA + 1% FCS (11.6%). For the lipidic content, treatments whit PVA and BSA have fewer lipidic droplets and mostly small drops, while with BSA + 1 and 5% FCS the presence of large drops was higher compared to the other treatments ($P<0.05$). Similarly apoptotic index increased by the presence of serum in the culture medium. In conclusion, the culture system with PVA is capable of supporting the crossbred embryos development. The serum-free medium used in this work to produce *in vitro* bovine embryos should be further improved to meet the requirements and demand at a large-scale.

Key words: *In vitro*; blastocyst; bovine; lipid droplets; apoptosis.

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones bovinos (*Bos taurus x indicus*) se practica en todo el mundo con fines comerciales y de investigación [34]. Una de las principales preocupaciones de los proveedores de embriones bovinos es el impacto de los medios de PIV sobre la calidad embrionaria [35]. Se considera que las condiciones del cultivo para embriones son óptimas cuando proporciona una tasa alta de embriones desarrollados hasta la etapa de blastocisto con resultados repetibles, además de producir blastocistos de alta calidad que tienen la capacidad de convertirse en terneros normales [28]. Aunque los embriones bovinos pueden ser

cultivados *in vitro* en un medio simple bajo condiciones definidas [5], la suplementación con FCS o BSA ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre su desarrollo hasta el estadio de blastocisto [25].

Sin embargo, el suero es considerado un compuesto variable e indefinido [15], lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la repetibilidad de los resultados obtenidos [29]. La adición de FCS al medio de cultivo puede ocasionar la acumulación anormal de gotas lipídicas en el citoplasma embrionario [3, 37], lo que hace a los embriones más sensibles al proceso de criopreservación disminuyendo su calidad [9], además, la adición de FCS puede generar anomalías del metabolismo energético del embrión [3] y aumentar el índice de apoptosis [42, 44].

Una vía de reducción de los lípidos embrionarios es la utilización de medios de cultivo que no incluyen suero. Así, su sustitución por BSA o PVA da lugar a la obtención de embriones con menor cantidad de inclusiones lipídicas y de menor tamaño [18]. Reportes sobre la tasa de producción de embriones bovinos mestizos en diferentes medios de cultivo (FCS y BSA) son escasos, por lo que se hace necesario la realización de investigaciones en la que se analice la tasa de producción de blastocistos, contenido lipídico e índice de apoptosis, lo que permitiría mejorar la calidad embrionaria y su criotolerancia. Ambos aspectos son de importancia capital para rentabilizar el costo que supone la aplicación de estas tecnologías en las explotaciones pecuarias a nivel nacional.

El FCS es necesario para obtener una mayor tasa de blastocitos aunque éstos tienen una calidad comprometida. No obstante, la reducción de su concentración o la eliminación de su uso durante las diferentes etapas de la PIV puede ser necesario para obtener embriones de mayor calidad. [25]. Es por ello, que es necesario continuar desarrollando y mejorando los medios de cultivo para incrementar su simplicidad, eficiencia y calidad, durante el cultivo de los embriones bovinos. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción, desarrollo, contenido lipídico e índice de apoptosis de blastocistos bovinos mestizos producidos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción *in vitro* de embriones: los ovarios fueron obtenidos después del sacrificio de hembras bovinas mestizas en un matadero comercial y transportados al laboratorio en un tiempo inferior a 90 min a ~35°C en solución de NaCl al 0,9% suplementada con 1000 UI/mL penicilina G (G1397, Sigma) y 50 mg/mL de sulfato de estreptomina (S9137, Sigma) en recipientes isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con la misma solución y a la misma temperatura anteriormente descrita. Los COCs, se recuperaron mediante la aspiración de los folículos, con ayuda de una aguja de 18G incorporada a una jeringa de 10 mL, y fueron depositados en un tubo cónico de 50 mL (Axigen®, California, EUA) con medio

de lavado TCM-199 HEPES (11150-030, Gibco) y suplementado con 22 mg/L de piruvato sódico (P4562, Sigma), 50 mg/L de gentamicina (G1397, Sigma), 0,4 g/L de BSA (A6003, Sigma) y 10% de FCS (F4135, Sigma). Fueron seleccionados, aquellos COCs con mayor tamaño, al menos tres capas completas de células del *cúmulus* compacto y citoplasma homogéneo. El medio de maduración empleado fue el TCM-199 (M7528, Sigma), suplementado con 275 mg/mL de piruvato sódico (P4562, Sigma), 50 mg/mL de gentamicina, 146 mg/mL de L-glutamina (G-15120, Sigma), 10 µg/mL de Folltropin-V®, 1 µg/mL de 17β-estradiol (E-2758, Sigma) y 10% de FCS (F4135, SIGMA). Los COCs fueron cultivados durante 22-23 h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ y en aire saturado de humedad.

Los espermatozoides fueron seleccionados mediante la técnica de *swim-up* [31]. Una vez descongeladas las pajueltas (37°C x 30 seg) en un baño de María (Lab-Line, 18012, EUA), fueron depositadas en tubos de polietileno con 5 mL de medio Sperm-TALP y centrifugadas (Thermo Scientific, IEC CL10, EUA) durante 5 minutos (min) a 1000 xg. Se descartó el sobrenadante y el pellet de 400 µL fue depositado en el fondo de dos tubos eppendorf con 1 mL de medio de capacitación. Después de 1 hours (h) de incubación, 800 µL del sobrenadante de cada eppendorf fue depositado en un tubo de polietileno con 5 mL de medio TL-FIV, suplementado con suplementado con 10 µg/mL de heparina (H3149, Sigma), 20 µM de penicilamina (P4875, Sigma), 10 µM de hipotaurina (H1384, Sigma) y 2 µM de epinefrina (E4250, Sigma). Los tubos se centrifugaron a 1000 xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y al pellet de 100 µL aproximadamente se le determinó la concentración espermática con la cámara Neubauer. Los COCs madurados fueron lavados tres veces en el medio Sperm-TALP y dos veces en medio TL-FIV, y luego fueron trasladados en grupos de 20 a gotas de 100 mL de medio TL-FIV, y fecundados con una concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL. Los gametos fueron cultivados durante 17 h, a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y en aire saturado de humedad.

La separación de las células del *cúmulus* y los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos se realizó mediante agitación mecánica en medio TCM-199, suplementado con HEPES a 25mM. El medio de cultivo base fue mSOF suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales (BME 50X, MEM 100X, Sigma), citrato (106448, Merck), myo-inositol (17508, Sigma): mSOFaaci, descrito por Holm y col. [20]. Los presuntos cigotos fueron cultivados en microgotas de 100 µL de cuatro medios diferentes: (1) PVA: mSOFaaci suplementados con 0,1 mg/mL de PVA (P8136, Sigma), desde el D1 al D8 de cultivo; (2) BSA: mSOFaaci suplementado con 6 mg/mL de BSA, desde el D1 al D8 de cultivo; (3) BSA + 5% FCS: mSOFaaci + 6 mg/mL de BSA + 5% de FCS, desde el D6 al D8; (4) BSA + 1% FCS: mSOFaaci + 6 mg/mL de BSA + 1% de FCS, desde el D1 al D8.

Las microgotas fueron cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma) e incubados 38,5 °C, 5% de CO₂ y aire saturado de

humedad durante 8 días (d). El medio de cultivo se recambió el d 3 y 6 post-FIV, empleando para ello placas nuevas con gotas de 100 mL de medio mSOFaaci y suplemento de cada grupo.

Evaluación de la división y desarrollo embrionario: la tasa de embriones divididos se evaluó el día 3 ó 72 h post-inseminación (hpi), tomándose en cuenta para ello el total de embriones de 2 o más células obtenidos en relación al total de presuntos cigotos puestos en cultivo. La tasa de mórulas, blastocistos, blastocistos totales y expandidos en cada medio de cultivo, fueron evaluados los días 6; 7 y 8, respectivamente. Todos los embriones fueron observados bajo microscopio estereoscópico (Olympus, SZX12, Japón) y los blastocistos se separaron del resto de los embriones.

Contenido lipídico: las gotas lipídicas se analizaron con la metodología propuesta por Abe y col. [1]. Los embriones fueron fijados en 10% de formaldehído en PBS, pH 7,4, durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron en agua destilada con 0,05% de PVA y luego fueron transferidos a gotas de etanol al 50% durante dos min. Los embriones fueron teñidos en gotas de 1% de Sudan Black B (S-668, Fisher) (m/v) en etanol al 70% durante 1-2 min. Después se lavaron tres veces en etanol al 50% durante 5 min en cada lavado, y un lavado de 5 min en 0,05% de PVA en agua destilada. Finalmente, fueron colocados en 10 μ L de glicerol sobre portaobjetos y se observaron bajo el microscopio óptico (600X; Olympus, CX31, Japón). Para estimar la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma de cada embrión, se empleó una rejilla con cinco cuadros de 1,600 μ M² (40 x 40), diseñado por el software Image J 1.41 [36]. Las gotas de lípidos fueron clasificadas como pequeñas, medianas y grandes (< 2 μ M, 2-6 μ M y >6 μ M, respectivamente). El número de gotas contadas en los cinco cuadros fueron contadas y clasificadas en cada embrión. Los datos relativos a la acumulación de lípidos se expresaron como número de gotas por 1,000 μ M².

Tinción de apoptosis: los blastocistos fueron fijados y teñidos para determinar apoptosis mediante TUNEL, según lo reportado originalmente por Gavrieli y col. [16], usando el Kit de detección de muerte celular *in situ* (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, G3250, Promega). Los blastocistos fueron lavados tres veces en gotas de 50 μ L de PBS con PVA a 0,1mg/mL durante dos min en cada paso. Posteriormente, fueron fijados en paraformaldehído (K31076805, Merk) al 4% en PBS a pH 7,4 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego fueron permeabilizados con Triton X-100 (H5142, Promega) al 0,5% en PBS durante 40 min, manteniéndose por 2 ó 3 sem. en placas *nunc* a 4°C en PBS-BSA (10mg/mL) o usados directamente para la tinción. Los blastocistos fueron lavados en PBS-PVA e incubados en gotas de 25 μ L de la mezcla de reacción de TUNEL, que contiene 12-desoxiuridina trifosfato (dUTP) unido a fluoresceína y la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT) por 1 h a 37°C en oscuridad. Las muestras fueron lavadas tres veces en PBS-PVA. Blastómeras intactas fueron teñidas con 4, 6 diamino-2 fenilindol dihidroclorido (DAPI, D9542, Sigma) (1 μ g/mL) en gotas de 25 μ L por 10 min en oscuridad. Después fueron lavados dos veces en gotas de PBS-PVA. Después de la incubación con H₂O₂ (H0904,

Sigma) a 100 μ M en gotas de 25 μ L por 2 h, el control positivo fue teñido con el Kit de TUNEL, mientras que el control negativo fue incubado en la solución de tinción en ausencia de la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT). La evaluación del total de células y las células TUNEL-positivas se realizó mediante la evaluación de cada uno de los blastocistos a través de un microscopio de fluorescencia (BX40, Olympus, Japón) equipado con un filtro de 450-490 nm de excitación, una barrera de 520 nm de emisión, usando un objetivo de 40X. Las células apoptóticas se observaron de color verde o rojas usando un filtro de 520 \pm 20 nm, mientras que los núcleos normales aparecen como un color azul a 460 nm. El índice de apoptosis fue calculado como la relación entre el número de núcleos TUNEL-positivos entre el número total de núcleos contados.

Análisis estadístico: los resultados obtenidos en la tasa de división embrionaria y de blastocistos fueron expresados como frecuencias y analizados mediante el test de χ^2 . El contenido lipídico y el número de núcleos apoptóticos de blastómeras de embriones fueron expresados en media \pm desviación estándar (DE) y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el modelo lineal general (GLM) del paquete estadístico SAS® [39]. Las medias fueron comparadas usando el test de Tukey. Las diferencias entre las frecuencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Un total de 1962 presuntos cigotos fueron puestos en cultivo y distribuidos al azar en los cuatro grupos experimentales. Catorce repeticiones fueron realizadas en este trabajo. La mayor tasa de embriones, de 2 o más células, lo mostraron el grupo de PVA (69,0%) y BSA (64,8%), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con el grupo de BSA+1% FCS (53,8%). A los 6 d de cultivo, fue valorado el porcentaje de mórulas, en el que se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos de cultivo evaluados. Una vez realizado el conteo de mórulas, en cada una de las experimentales, cerca del 50% del total de embriones provenientes del grupo de BSA fueron transferidos al azar a medio nuevo suplementado con 5% de FCS (BSA+5% FCS) hasta el D8. En el D7 de cultivo, el menor porcentaje de blastocistos y blastocistos expandidos lo mostró el grupo de BSA+ 1% FCS ($P < 0,05$). Los porcentajes más altos de blastocistos en el D8, fueron para el grupo de BSA y PVA, aunque sólo mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo de BSA+ 1% FCS. En cuanto al número de blastocistos expandidos del mismo día, sólo se mostraron diferencias entre el tratamiento suplementado con BSA más suero al 1 y 5% (TABLA I).

Cuarenta y cuatro blastocistos fueron teñidos con Sudan Black B (11 para cada tratamiento; FIG. 1). En la evaluación del tamaño de las gotas lipídicas se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) para el número de gotas pequeñas entre los grupos de BSA + FCS y el resto de los tratamientos. Para el grupo de gotas medianas el menor número lo presentó el sistema de cultivo con PVA (0,1 mg/mL) y BSA + 1% FCS. El tratamiento con BSA +

TABLA I
EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *In vitro*
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

mSOFaaci	División Día 3 (%)	Mórulas Día 6 (%)	Blastocistos Día 7 (%)	Blastocistos Día 8 (%)	Expandidos Día 8 (%)
PVA N: 632	436 (69) ^a	342 (54,1) ^a	124 (19,6) ^a	104 (16,5) ^a	22 (3,5) ^{a,b}
BSA N: 823	534 (64,8) ^a	311 (37,8) ^b	97 (22,8) ^a	81 (19) ^a	19 (4,4) ^{a,b}
BSA+5% FCS	-	-	81 (20,3) ^a	62 (15,6) ^{a,b}	20 (5) ^a
BSA+1% FCS N: 507	273 (53,8) ^b	147 (29,0) ^c	64 (12,6) ^b	59 (11,6) ^b	12 (2,3) ^b

(%)^{a,b}: Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).
PVA: alcohol-polivinílico, BSA: albúmina sérica bovina, FCS: suero fetal bovino.

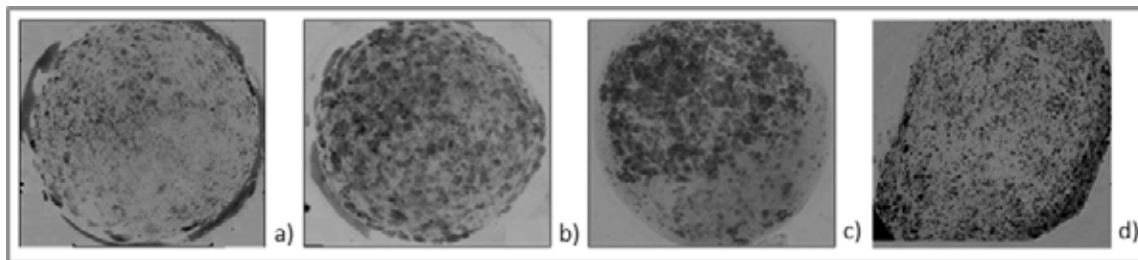


FIGURA 1. BLASTOCISTOS DE D8 DE CULTIVO TEÑIDOS CON SUDAN BLACK B (600X). EMBRIONES CULTIVADOS EN MEDIO MSOFAACI SUPLEMENTADO CON: (A) PVA, (B) BSA, (C) BSA+5% FCS Y (D) BSA+1% FCS.

5% FCS, mostró el mayor número de gotas grandes (>6 µm) (P<0,05), seguido de los embriones cultivados en presencia de BSA (FIG. 2). El número de núcleos totales, apoptóticos e índice de apoptosis fueron detectados en un total de 43 blastocistos y blastocistos expandidos de D8. La media de núcleos apoptóticos de los blastocistos procedentes de los medios suplementados con PVA resultó similar a los de BSA. El mayor número de núcleos totales y apoptóticos aumenta con la presencia de suero. El

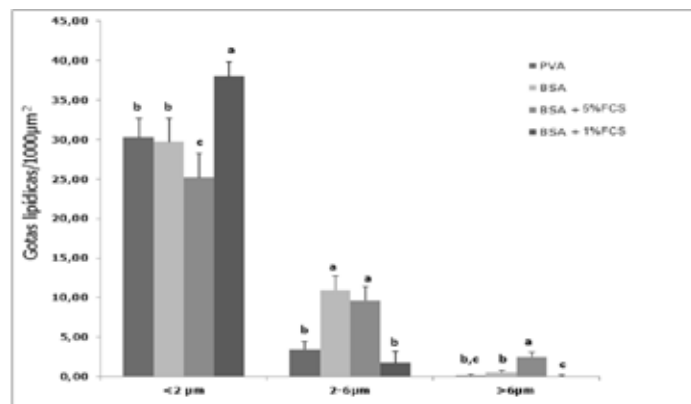


FIGURA 2. EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SOBRE EL NÚMERO DE GOTAS LIPÍDICAS PEQUEÑAS (<2MM), MEDIANAS (2-6MM) Y GRANDES (>6MM) EN BLASTOCISTOS BOVINOS PIV (MEDIA ± DE).

mismo efecto aparece con el índice de apoptosis. Los resultados se muestran en la TABLA II.

Cada vez es más frecuente la utilización de medios químicamente definidos para la PIV de embriones bovinos. Quizás la mayor ventaja de la adopción de estos medios es que permite obtener resultados de mayor repetibilidad, además de garantizar un mayor control de los agentes infecciosos en los componentes de origen biológico (BSA y suero) que son empleados de manera rutinaria en los laboratorios de FIV [19]. Orsi y Lesse [30], evaluando el establecimiento de sistemas de PIV con medios químicamente definidos, demostraron que la tasa más alta de embriones divididos, fue de un 68,45% con 1 mg/mL de PVA en medio mSOFaa. Más tarde, Pereira y col. [32], obtuvieron un 69,7 % de división a las 48 hpi en medio mSOFaa + 3 mg/mL de PVA. Trabajos en los que se emplea la BSA, medios de PIV medianamente definidos, se observa un 84 y 83% de división embrionaria con medio SOF suplementado con 3 mg/mL y 16 mg/mL de BSA, respectivamente [37]; y un 77% de divididos para el mSOFaaci + 6 mg/mL de BSA [20]. Un resultado similar al de este trabajo (64,8%), fue el reportado por Orsi y Lesse [30], con 68,83% empleando un medio mSOFaa + 4% BSA.

TABLA II
DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE TUNEL EN
BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO* EN
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

mSOFaaci	Blastocistos n	Núcleos apoptóticos, media ± DE	Núcleos totales, media ± DE	Índice de apoptosis, % ± DE
PVA	11	7,2 ± 1,0 ^b	83,4 ± 7,6 ^c	8,0 ± 1,9 ^b
BSA	12	7,5 ± 1,3 ^b	99,5 ± 4,5 ^b	7,5 ± 1,2 ^b
BSA+5% FCS	11	11,0 ± 3,5 ^a	112,7 ± 10,1 ^a	9,2 ± 2,4 ^{a,b}
BSA+1% FCS	9	13,0 ± 4,5 ^a	116 ± 19,6 ^a	10,4 ± 2,9 ^a

(a,b,c): Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($P < 0,05$). PVA: alcohol-polivinílico, BSA: albúmina sérica bovina, FCS: suero fetal bovino.

Los resultados de las tasas de blastocistos en este trabajo coinciden con los reportados en trabajos anteriores, en donde el cultivo de embriones bovinos en mSOFaaci + PVA (0,1 mg/mL) no incrementó las tasas de desarrollo aportadas por el mSOFaaci + BSA (6 mg/mL), incluso en presencia de aminoácidos esenciales y no esenciales, citrato y myo-inositol [10, 21, 24, 27]. En cuanto al uso del FCS, existen evidencias que han demostrado que una exposición prolongada de suero en el medio de cultivo puede alterar la morfología y bioquímica de los embriones bovinos [1, 6, 7, 11], al compararlos con los cultivados sin suero [14, 40]. Los trabajos de Rizos y col. [37], Gómez y col. [18], Vandaele y col. [48] y Pinyopummintr y Bavister [33] demostraron que, la incorporación del FCS después de 42; 47 y 72 hpi (24; 29 y 54 h de iniciado el CIV), respectivamente, o incluso en etapas más avanzadas proporciona los mejores resultados de producción de blastocistos. Estrategias metodológicas durante la etapa de CIV pueden contrarrestar o evitar los efectos inhibitorios por parte del FCS durante etapas iniciales e incluso reducir la aparición de gotas lipídicas en el estadio de blastocisto [42].

En este trabajo, el mayor número de gotas lipídicas pequeñas fue aportada por los blastocistos del tratamiento con mSOFaaci + BSA + 1% FCS, mientras que el mayor número de gotas grandes aparecen en presencia de 5% FCS ($P < 0,05$) (FIG. 1). Estos resultados coinciden con lo obtenido por Sudano y col. [42, 44], quienes reportaron, con el mismo método de valoración utilizado en este estudio, que el incremento de las concentraciones de FCS en el medio de cultivo de embriones (5 y 10%) causó un aumento del número de gotas lipídicas medianas y grandes en su citoplasma. Abe y col. [1] afirman que, la presencia de FCS desde el inicio del cultivo, y no otro componente, es la causa de las diferencias en el desarrollo observada en los embriones PIV, con una aparición de una gran cantidad de gotas pequeñas.

Los mecanismos y la fuente de acumulación de lípidos citoplasmáticos en embriones bovinos cultivados con FCS son bastante complejos [43] y aún no están claros [1]. Se ha demostrado que las células en cultivo pueden tomar fácilmente

ácidos grasos, fosfolípidos y triacilglicéridos de los medios suplementados con suero [41]. Las lipoproteínas presentes en el suero pueden ser internalizadas por las células embrionarias incrementando el contenido de lípidos citoplasmáticos [38]. Sudano y col. [42], afirman que la adición de etosulfato de fenazina a los medios de cultivo reduce efectivamente los lípidos intracitoplasmáticos en los embriones PIV. Del mismo modo, la L-carnitina, otra sustancia química moduladora de lípidos, mejora el desarrollo embrionario temprano mediante utilización de lípidos, principalmente a través de la β -oxidación [45].

Si bien, el contenido lipídico en los embriones PIV es considerado como un indicador de calidad [17], otro indicador, es el número de células que constituyen el embrión [20]. Este último, es un factor condicionante de su competencia y dicho número no depende únicamente del medio utilizado durante el cultivo, sino que está condicionado también por el ambiente [4]. Los datos sobre la población celular de los embriones bovinos PIV son abundantes, debido a la multitud de condiciones experimentales existentes, y que tienen un efecto directo sobre este parámetro.

Así, en medios químicamente definidos (PVA) la media del número de blastómeras es de 91 ± 5 [22], 70 ± 23 [20], $74,8 \pm 4$ [13] y 89 ± 4 [30], similares a los reportados en este trabajo ($83,4 \pm 7,6$). Asada y col. [2] y Orsi y Lesse [30] reportan que, la reducción inducida por el PVA en las tasas de cavitación y de eclosión está asociado con un número reducido de células del blastocisto. En cuanto a la suplementación con BSA, el promedio se ubica en $105,3 \pm 3,9$ [30], $124,7 \pm 4,9$ [29], $154 \pm 8,8$ [46], $131,6 \pm 4,1$ [42] y $126,3 \pm 3,4$ [49], mientras que la media para el trabajo que aquí se presenta para el grupo de BSA fue de $99,5 \pm 4,5$, valor por debajo de los publicados por autores anteriormente mencionados.

Fouladi-Nashta y col. [12] y Sudano y col. [42], señalan que los medios de cultivo con suero aumenta el número de blastómeras en los embriones PIV, existiendo una relación entre la cantidad de suero y el número de blastómeras. En el trabajo de Sudano y col. [42, 44], a medida que aumenta la concentración de FCS, también lo hace el número de blastómeras y el índice de apoptosis. En este trabajo, la proporción de células positivas a la tinción de TUNEL para los blastocistos cultivados en presencia de PVA fue de $8,0 \pm 1,9\%$ y en BSA de $7,5 \pm 1,2\%$, sin mostrar diferencias significativas (TABLA II). Esta última, más baja que la reportada por Sudano y col. [42], Plourde y col. [34] y Wang y col. [49] con $10,3 \pm 10,9\%$; $13,8 \pm 1,2\%$; $17 \pm 8\%$ y $9,3 \pm 0,9\%$, respectivamente, pero más alta que la publicada por Trigal y col. [46] con un $3,9 \pm 1,4\%$ de núcleos apoptóticos.

Se ha demostrado que la incidencia de apoptosis en los embriones puede verse afectada de manera significativa por la edad de la donadora de ovocitos, las condiciones de la fecundación y la composición del medio de cultivo en el caso de la PIV [8, 17, 20, 26]. Así, al incluir el FCS al 1%, el índice de apoptosis aumentó hasta un $10,4 \pm 2,9\%$, y con 5% (FCS), el índice de apoptosis fue de $9,2 \pm 2,4\%$, sin mostrar diferencias

significativas; estos datos son similares a los observados por Zullo y col. [51] ($8,1\pm 0,1\%$), Van Soom y col. [47] ($10,7\pm 1\%$) y Yuan y col. [50] ($10\pm 1\%$); pero inferiores al reportado por Sudano y col. [42] ($20,7\pm 1,9\%$). Con el objetivo de disminuir la incidencia de apoptosis, Wang y col. [49], propone el uso de polifenoles de té verde (*Camellia sinensis*) a $15\ \mu\text{M}$ durante el CIV; mientras que Ghanem y col. [17], plantean la incorporación de etosulfato de fenazina y L-carnitina, dos agentes reductores del contenido lipídico. Barceló-Fimbres y Seidel [3] señalan que, las mejoras en la calidad del embrión se atribuyeron a la reducción de contenido de lípidos citoplasmáticos, lo que podría haber disminuido la peroxidación lipídica, reduciendo de este modo la producción de radicales libres dentro del embrión.

La definición de un medio de cultivo adecuado se ha complicado dada la multiplicidad de las condiciones de cultivo y el hecho de que los mismos embriones tienen diferentes capacidades para lograr completar su desarrollo en un medio de cultivo en particular. No hay duda que los medios de cultivo embrionario afectan la calidad embrionaria [1, 3, 23, 27], por lo que hasta el momento, no hay suficiente información para concluir cuál es el "mejor" de los medios o sistemas de cultivo, aunque es evidente que hoy en día, la mayoría de los medios definidos o semidefinidos (en un sistema estático o secuencial) producen embriones de buena calidad (contenido lipídico, número de células y criotolerancia). Sin embargo, los embriones morfológicamente normales, no garantizan plenamente un mejor éxito durante el desarrollo después de la transferencia embrionaria [23].

CONCLUSIONES

El medio de cultivo embrionario químicamente definido representado por el tratamiento con $0,1\text{mg/mL}$ de PVA es capaz de soportar el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto, de manera similar a los cultivos suplementados con BSA y FCS. El medio de cultivo químicamente definido (mSOFaaci + PVA) es una alternativa para la PIV de embriones bovinos mestizos. Los medios de cultivo suplementados con PVA y BSA mostraron menor número de gotas lipídicas y núcleos apoptóticos; además de porcentajes de blastocistos comparables a los medios suplementados con FCS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABE, H; YAMASHITA, T; SATOH, T; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.** 61:57-66. 2002.
- [2] ASADA, M; ISHIBASHI, S; IKUMI, S; FUKUI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenol.** 58:1199-1208. 2002.
- [3] BARCELÓ-FIMBRES, M; SEIDEL, G. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.** 74:1406-1418. 2007.
- [4] BLOCK, J; BONILLA, L; HANSEN, P. Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **J. Dairy Sci.** 93:5234-5242. 2010.
- [5] CAROLAN, C; LONERGAN, P; VAN LANGENDOCKT, A; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenol.** 43:1115-28. 1995.
- [6] CROSIER, A; FARIN, P; DYKSTRA, M; ALEXANDER, J; FARIN, C. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.** 62:1459-1465. 2000.
- [7] CROSIER, A; FARIN, P; DYKSTRA, M; ALEXANDER, J; FARIN, C. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.** 64:1375-1385. 2001.
- [8] CUI, X; JEONG, Y; LEE, H; CHEON, S; KIM, N. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. **Reprod.** 127:125-130. 2004.
- [9] DUQUE, P; GÓMEZ, E; DÍAZ, E; FACAL, N; HIDALGO, C; DÍEZ, C. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. **Theriogenol.** 59:889-899. 2003.
- [10] ECKERT, J; PUGH, P; THOMPSON, J; NIEMANN, H; TERVIT, H. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. **Reprod. Fert. Develop.** 10:327-332. 1998.
- [11] FAIR, T; LONERGAN, P; DINNYES, A; HYTTEL, P; WARD, F; BOLAND, M. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryo production on blastocysts quality. **Mol. Reprod. Dev.** 58:186-195. 2001.
- [12] FOULADI-NASHTA, A; ALBERIO, R; KAFI, M; NICHOLAS, B; CAMPBELL, K; WEBB, R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. **Reprod. Biomed. Online.** 10:497-502. 2005.
- [13] GANDHI, A; LANE, M; GARDNER, D; KRISHER, R. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Hum. Reprod.** 15:395-401. 2000.
- [14] GARDNER, D. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. **J. Reprod. Fertil. Supp.** 54:461-475. 1999.

- [15] GARDNER, D; LANE, M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. **Hum. Reprod.** 13:148-159. 1998.
- [16] GAVRIELI, Y; SHERMAN, Y; BEN-SASSON, S. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.** 119:493-501. 1992.
- [17] GHANEM, N; HA, A; FAKRUZZAMAN, M; BANG, J; LEE, S; KONG, I. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenol.** 82:238-250. 2014.
- [18] GÓMEZ, E; RODRÍGUEZ, A; MUÑOZ, M; CAAMAÑO, J; HIDALGO, C; MORÁN, E; FACAL, N; DíEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenol.** 69:1013-1021. 2008.
- [19] HERNÁNDEZ-FONSECA, H; SIRISATHIEN, S; BOSH, P; CHO, H; LOTT, J; HAWKIINS, L; HOLLET, R; COLEY, S; BRACKET, B. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. **Anim. Reprod. Sci.** 69:151-158. 2002.
- [20] HOLM, P; BOOTH, P; SCHMIDT, M; GREVE, T; CALLESEN. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenol.** 52:683. 1999.
- [21] HOLM, P; BOOTH, P; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reprod.** 123:553-565. 2002.
- [22] KESKINTEPE, L; BRACKETT, B. In vitro developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol. Reprod.** 55:333-339. 1996.
- [23] KHOSLA, S; DEAN, W; REIK, W; FEIL, R. Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development: Part II: culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. **Hum. Reprod. Update.** 7:419-427. 2001.
- [24] KURAN, M, ROBINSON, J; STAINES, M; MCEVOY, T. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. **Theriogenol.** 55:593-606. 2001.
- [25] LEIVAS, F; BRUM, D; FIALHO, S; SALIBA, W; ALVIM, M; BERNARDI, M; RUBIN, M; SILVA, C. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus* x *indicus* embryos. **Theriogenol.** 75: 429-433. 2011.
- [26] LIU, Z; FOOTE, RH. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biol. Reprod.** 53:786-790. 1995.
- [27] LONERGAN, P; O'KEARNEY-FLYNN, M; BOLAND, M. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenol.** 51:1565. 1999.
- [28] MOMOZAWA, K; FUKUDA, Y. Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. **J. Reprod. Develop.** 57: 681-689. 2011.
- [29] MUCCI, N; ALLER, J; KAISER, G; HOZBOR, F; CABODEVILA, J; ALBERIO, R. Effect of estrous cow serum during bovine embryos culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenol.** 65: 1551-1562. 2006.
- [30] ORSI, N; LEESE, H. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. **Theriogenol.** 61:561-572. 2004.
- [31] PARRISH, J; SUSKO-PARRISH, J; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M; CRITSER, F; EYESTONE, W; FIRST, N. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenol.** 25:591-600. 1986.
- [32] PEREIRA, R; BAPTISTA, M; VASQUES, M; HORTA, A; PORTUGAL, P; BESSA, R; CHAGAS E SILVA, J; SILVA, M; MARQUES, C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12cCLA). **Anim. Reprod. Sci.** 98:293-301. 2007.
- [33] PINYOPUMMINTR, T; BAVISTER, B. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenol.** 41:1241-1249. 1994.
- [34] PLOURDE, D; VIGNEAULT, CH; LAFLAMME, I; BLONDIN, P; ROBERT, C. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. **Theriogenol.** 77:1767-1778. 2012.
- [35] PONTER, A; GUYADER-JOLY, C; NUTTINCK, F; GRIMARD, B; HUMBLLOT, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenol.** 78:632-645. 2012.
- [36] RASBAND, W. Image J. U.S. *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2011.

- [37] RIZOS, D; GUTIÉRREZ-ADÁN, A; PÉREZ-GARNELO, S; DE LA FUENTE, J; BOLAND, M; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.** 68:236-243. 2003.
- [38] SATA, R; TSUJI, H; ABE, H; YAMASHITA, S; HOCHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **J. Reprod. Develop.** 45:97-103. 1999.
- [39] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide. Version 8.2. Cary, NC. 2001.
- [40] SHAMSUDDIN, M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. **J. Vet. Med. A.** 41:307-316. 1994.
- [41] SPECTOR, A. Fatty acid, glyceride, and phospholipid metabolism. In: *Rothblat, G.* (Ed.); **Growth Nutritive Metabolism Cells Culture.** Elsevier. Pp 257-296. 1972.
- [42] SUDANO, M; PASCHOAL, D; RASCADO, T; MAGALHÃES, L; CROCOMO, L; LIMA-NETO, J; LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenol.** 75:1211-1220. 2011.
- [43] SUDANO, M; RASCADO, T; TATA, A; BELAZ, K; SANTOS, V; VALENTE, R; MESQUITA, F; FERREIRA, C; ARAÚJO, J; EBERLIN, M; LANDIM-ALVARENGA, F. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenol.** doi: 10.1016/j.theriogenology. 2016.03.025. 2016.
- [44] SUDANO, M; SANTOS, V; TATA, A; FERREIRA, C; PASCHOAL, D; MACHADO, R; BURATINI, J; EBERLIN, M; LANDIM-ALVARENGA, F. Phosphatidilcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus x indicus* and *Bos taurus x taurus in vitro* and *in vivo*-produced blastocysts. **Biol. Reprod.** 130:1-11. 2012.
- [45] TAKAHASHI, T; INABA, Y; SOMFAI, T; KANEDA, M; GESHI, M; NAGAI, T; MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.** 25:589-599. 2013.
- [46] TRIGAL, B; GÓMEZ, E; DIÉZ, C; CAAMAÑO, J; MARTÍN, D; CARROCERA, S; MUÑOZ, M. *In vitro* development of bovine embryos cultured with activin A. **Theriogenol.** 75:584-588. 2011.
- [47] VAN SOOM, A; YUAN, Y; PEELMAN, L; MATOS, D; DEWULF, J; LAESENS, H; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenol.** 57:1453-1465. 2002.
- [48] VANDAELE, L; MATEUSEN, B; MAES, D; DE KRUIF, A; VAN SOOM, A. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility?. **Theriogenol.** 65:1691-1703. 2006.
- [49] WANG, A; FU, CH; YU, S. Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos. **Theriogenol.** 79:186-192. 2013.
- [50] YUAN, Y; VAN SOOM, J; COOPMAN, F; MINTIENS, K; BOERJAM, M; VAN ZEVEREN, A; DE KRUIF, L; PEELMAN, L. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenol.** 59:1585-1596. 2003.
- [51] ZULLO, G; ALBERO, G; NEGLIA, G; DE CANDITIIS, C; BIFULCO, G; CAMPANILE, G; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. **Theriogenol.** 85: 688-697. 2016.