

ISBN: 970-27-0770-6

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE BOVINO *IN VITRO* A PARTIR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA HUMANOS, CON LA UTILIZACIÓN DE HORMONAS HCG Y FSH

Jorge Humberto Villarreal Rodas¹, Enrique Octavio García Flores²

1 Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Altos. 2 Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Departamento de Producción Agrícola, Apartado Postal 48900 Autlán de Navarro, Edo. Jalisco, México.

Introducción

La producción de embriones de bovino *in Vitro* inicia con la obtención de los óvulos contenidos en los folículos ováricos ya sea por punción o sección de los mismos. Para obtener los embriones *in Vitro*, es necesario recuperar los ovocitos y finalizar 3 procesos biológicos: maduración (MIV) y fertilización (FIV) de los ovocitos y los cigotos resultantes cultivarlos hasta el estado de blastocisto (CIV) en donde pueden ser congelados o transferidos a receptoras sincronizadas.

La fecundación *in Vitro* es de gran apoyo en el desarrollo de técnicas que tienen un potencial importante en la reproducción animal, tales como la micromanipulación de embriones y producción de animales transgénicos. El desarrollo de esta biotecnología permite la producción de embriones hasta estadios avanzados compatibles con la transferencia a hembras receptoras ([First y Parrish, 1987](#)).

Desde el punto de vista biológico, el establecimiento de la fecundación *in Vitro* es una alternativa valiosa para la investigación de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las interacciones gaméticas, fecundación y desarrollo embrionario temprano ([Barros y Leal, 1982](#)).

Es bien conocido que los cigotos pueden ser co-cultivados *in vitro* con células oviductales o en el medio previamente condicionado por estas células desarrollando hasta un 30% a blastocistos ([Eyestone y First, 1989](#); [Eyestone et al., 1990](#)).

Objetivo

El objetivo de este estudio fue el de desarrollar una técnica para la producción de embriones de bovino *in Vitro* a partir de medios de cultivo para humanos, con la utilización de hormonas hCG y FSH.

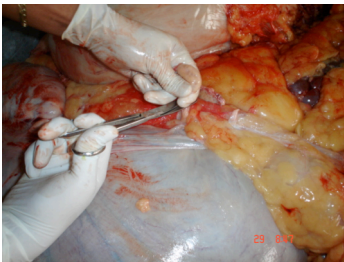


Materiales y métodos

1. Recolección de ovarios y maduración in vitro de ovocitos

Los ovarios fueron recolectados después del sacrificio de los animales en el rastro municipal de Autlán de Navarro Jalisco, y se trasladaron al laboratorio en solución salina fisiológica a 35 °C en un periodo de dos horas. La aspiración de los Complejo Cúmulo-Ovocitos (CCOs) se realizó con jeringas de 10 ml sin caucho y agujas de calibre 18 G a folículos de 2-8 mm de diámetro. El líquido folicular aspirado se colocó en placas Petri cuadradas de 15 x 100 mm (Falcon®). Se procedió a la búsqueda y selección de los CCOs por medio de un microscopio estereoscópico a un aumento de 10X. Solamente ovocitos rodeados por un cúmulo compacto y citoplasma homogéneo fueron utilizados para el cultivo ([Leibfried y First, 1979](#)). Los CCOs seleccionados y todos los demás procedimientos fueron realizados a una temperatura de 38.5 °C. Previo a la maduración, los ovocitos fueron lavados manualmente con una jeringuilla de 1 ml adaptada a una puntilla de 2 mm de diámetro 2 veces en gotas de 100 μ l de solución buferada fosfatada (PBS) y una en 100 μ l de medio de maduración constituido por HTF HEPES (In Vitro Care®) formulado con EDTA y una forma estabilizada de glutamino suplementado con hCG (2 UI/ml) y FSH (0.75 UI/ml).

De 20 a 25 ovocitos fueron colocados en gotas de 200 μ l de medio depositadas en una placa de Petri de 35 x 10 mm (Falcon®), las cuales fueron cubiertas con aceite mineral e introducidas a una bolsa con cierre hermético a la cual se le agregó una mezcla de gases que se tenía previamente preparada en un tanque con: el 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ y se incubaron a 38.5 °C durante 24 h.



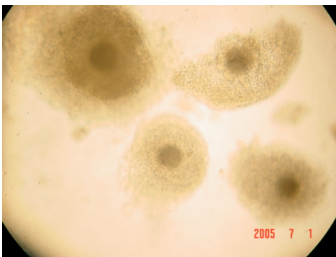
Recolección



Solución salina fisiológica



Aspiración folicular



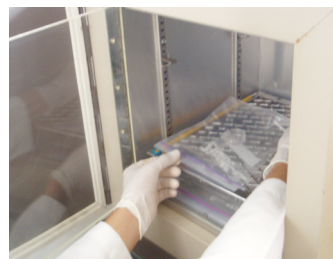
Ovocitos



Medio y hormonas

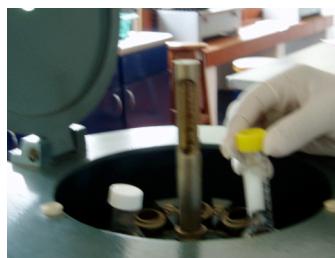


Lavados y maduración

**Adición de gases****Incubación**

2. Recolección y preparación del semen para la fertilización

El semen fue procesado de manera similar a lo descrito por [Takahashi y First \(1992\)](#). Se utilizó semen fresco de varios toros, el cual fue recolectado y puesto en diluyente compuesto por: 80% de agua destilada, 2.9 % de citrato de sodio y 20% de yema de huevo a temperatura de 37 °C. Se centrifugó dos veces durante 5 minutos a 1,000 g utilizando el medio de fertilización SPERM WASH (In Vitro Care[®]) preparado con 0.5 % HSA HEPES-formula buferada y con adición de 5 UI/ml de heparina. Posteriormente se extrajo el sobrenadante y el pellet se suspendió con medio de fertilización a una concentración de 2×10^6 espermatozoides/ml.

**Semen****Centrifugación****Camara de Neu Bauer**

3. Fertilización in vitro de ovocitos

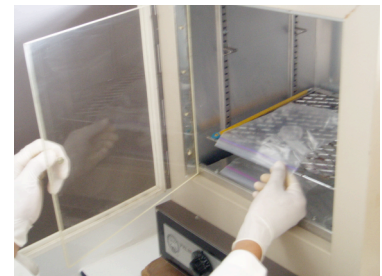
Después de 24 horas de cultivo, los ovocitos fueron lavados dos veces en PBS y una vez en el medio de fertilización SPERM WASH (In Vitro Care) preparado con 0.5 % HSA HEPES-formula buferada y con adición de 5 UI/ml de heparina. Con este mismo medio se depositaron gotas de 100 μ l (gotas de fecundación) en una placa Petri de 10 x 35 mm (Falcon[®]) las cuales fueron cubiertas con aceite mineral. Posterior al lavado de los CCOs se tomaron de 20-25 ovocitos y fueron colocados en las gotas de fecundación. Posteriormente, se agregó a la gota 100 μ l del semen procesado alcanzando un volumen final de 200 μ l, una concentración espermática de 2×10^6 espermatozoides/ml. Los CCOs fueron cultivados a la temperatura y atmósfera anterior durante 24 horas.



**Fertilización en medio
Medio Sperm Wash**



Mezcla de gases



Incubación

4. Cultivo in vitro de presuntos cigotos

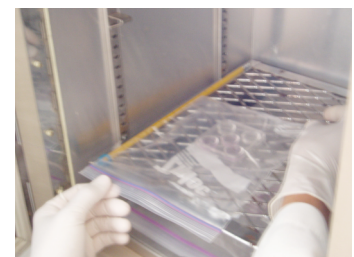
Finalizado el periodo de fertilización, los CCOs fueron desnudados mediante pipeteos continuos con pipetas Pasteur y fueron lavados 2 veces en PBS y una tercera vez en el medio de cultivo IVC-TWO (In Vitro Care[®]) formulado con EDTA, Taurina y Glutation, y una forma estabilizada de glutamino. De este mismo medio, se colocaron gotas de 500 μ l en cada pozo de la placa de cultivo de cinco pozos (Minitube[®]) cubierto con aceite mineral y se depositaron de 20-25 cigotos por pozo. Se cultivaron a una temperatura y atmósfera similar a las anteriores durante 7 días. Se evaluó la división celular a los dos días después de la fertilización (día 0: inseminación in Vitro) y al día 7 de cultivo la producción de embriones.



**Separación de células y
lavados**



Mezcla de gases



Incubación

Resultados y discusión

N° Total de ovocitos	N° de Ovocitos Madurados (%)	Embriones	
		Día 2 2 Células (%)	Día 7 Blastocistos (%)
519	450(86.8)	42(8)	26 (5)

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los de Men y Monson (2001) los cuales reportan una producción de blastocistos al día 7 con adición de FSH y medios adecuados para bovinos del 5.19%, sin embargo estuvieron muy por debajo a los obtenidos por Yvès y Cogniè (2001) que reportan una producción del 32% de blastocistos con adición de suero fetal bovino.

Conclusión

Se logró desarrollar la técnica para la producción de embriones de bovino *in Vitro* a partir de medios de cultivo para humanos, con la utilización de hormonas hCG y FSH, aunque la baja producción de blastocistos obtenidos podrían ser atribuidos al tiempo invertido en el dominio de la técnica.

Bibliografía

- Barros, C. y J. Leal. 1982. *In vitro* fertilization and its use to study gametes interactions, in *in vitro* fertilization and embryo transfer. *En*: Hafez, E.S. y Semm, K. International Medical Publishers. pp. 37-49.
- Eyestone, W.H., J.M. Jones y N.L. First. 1990. The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology*. 33: 226.
- Eyestone, W.H. y N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85: 715-720.
- First, N.L. y J.J. Parrish. 1987. *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 34 (Suppl.): 151-170.
- Men H., R.L. Monson, y J.J. Rutledge. 2001. Effect of maturation protocols on bovine oocyte freezing tolerance. *Theriogenology*. 55: 311.
- Leibfried, L. y N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48: 76-86.
- Takahashi, Y. y N.L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 37: 963-978.
- Yvés Cognié. y P. Mermillod. 2001. Maduración del ovocito y producción *in vitro* de embriones en rumiantes. Segundo curso de Fisiología de la Reproducción en Rumiantes Texcoco Edo. México. p 47-64.