

Complemento cromosómico de embriones bovinos (*Bos taurus indicus*) producidos *in vitro*

Francisco Báez Contreras, Yoeli Méndez López y Patricia Villamediana Monreal*
Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido:31-01-2014 Aceptado: 22-03-2014

Resumen

La producción de embriones bovinos de alta calidad es requisito indispensable para alcanzar tasas de desarrollo embrionario satisfactorios y becerros normales después de la transferencia de embriones bovinos producidos *in vitro* (PIV). Un parámetro importante de calidad es la aparición de aberraciones cromosómicas que puede ser detectada en embriones bovinos. El objetivo de este trabajo fue valorar la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones bovinos PIV. Para ello complejos cumulus-ovocito (COC's) fueron obtenidos mediante aspiración a partir de ovarios de hembras bovinas mestizas sacrificadas en matadero. Los COC's madurados *in vitro* fueron fecundados con semen de toros de probada fertilidad, seleccionando los espermatozoides más aptos mediante la técnica de *swim-up*. El cultivo *in vitro* de los embriones se llevó a cabo en medio fluido oviductal sintético (SOF). Se valoró la tasa de maduración *in vitro*, la penetración total y normal a las 18 horas post inseminación (hpi), tasa de división a las 48 hpi. El estudio citogenético fue realizado a 43 embriones y presuntos cigotos. Del total de embriones procesados, 23,25% mostraron al menos una metafase analizable, alcanzándose un índice mitótico de 44,44%. Solo el 11,11% de los embriones analizados fueron portadores de anomalías.

Palabras clave: embriones, *in vitro*, bovinos, mestizos, citogenética.

Chromosome complement of crossbred bovine (*Bos taurus indicus*) embryos produced *in vitro*

Abstract

The produced of bovine embryos of high quality is required to obtain satisfactory embryonic developmental rates and normal calves following transfer of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos. One important quality parameter is the chromosome aberrations, which can be detect in bovine embryos. The aim of this study was evaluate the incidence of chromosomal abnormalities in bovine embryos IVP. For that, cumulus-oocyte complex (COC's) were obtained by aspiration of ovaries from crossbreed females collected at slaughterhouse. The COC's *in vitro* matured were fertilized with semen from bulls with proven fertility. Selection of most suitable sperms were made by *swim-up*. The *in vitro* culture of embryo were done in synthetic oviduct fluid (SOF) medium. Maturation *in vitro* rate, total and normal penetration rate 18 post insemination (hpi), embryo cleavage 48 hpi, the cytogenetic study were made to 43 embryos and presumptive

* Autor para la correspondencia: pvillamediana@gmail.com

zygotes. Of the total fixed embryos, 23.25% show at least one analyzable metaphase, reaching a mitotic index of 44.44%. Only 11.11% of embryos were chromosomally abnormal.

Key words: embryos, *in vitro*, bovine, crossbreed, cytogenetic.

Introducción

La calidad embrionaria relacionada con el potencial de desarrollo es uno de los aspectos más importantes en la embriología moderna. Se ha demostrado que muchos de los blastocistos producidos *in vitro* fallan en eclosionar e implantarse luego de la transferencia a pesar de tener una morfología normal.

Además de la calidad morfológica, el número de células embrionarias de la masa celular interna y del trofoectodermo, la incidencia de apoptosis, la capacidad de eclosión, las anomalías cromosómicas y la expresión de genes específicos han sido aceptados ampliamente como parámetros para determinar la calidad embrionaria (1).

El análisis cromosómico de embriones mamíferos provee evidencia de que una proporción considerable de embriones morfológicamente normales son cromosómicamente anormales (22,6%; 2, 3). Una alta proporción de embriones bovinos producidos *in vitro* (13,7-80%; 4,5), muestran desbalance cromosómico, con la mixoploidía como la anomalía más frecuentemente observada (16-72%; 5) afectando negativamente el desarrollo embrionario (6). El desarrollo de los embriones poliploides es lento y, aparentemente, detienen su desarrollo alrededor del tercer ciclo celular, mientras que los embriones mixoploides parecen seguir el desarrollo (7), localizándose las células poliploides mayormente en el trofoectodermo del blastocisto (8).

En humanos, se han encontrado altas tasas de anomalías cromosómicas en embriones preimplantacionales (9). A pesar de su potencial importancia económica para la producción animal, se han llevado a cabo muy pocos estudios citogenéticos de embriones producidos *in vitro*, reportándose ano-

malías cromosómicas numéricas que comprenden: aneuploidías, haploidías, poliploidías y mixoploidía (5, 6, 7, 10, 11, 12).

Chatzimeletiou *et al.* (13), afirman que una proporción significativa de embriones no alcanza el estadio de blastocisto o no se implantan luego de la transferencia, explicando que una posible causa del bloqueo del desarrollo temprano sería la alta incidencia de anomalías nucleares y cromosómicas observadas en embriones en esos estadios. En nuestro laboratorio, la tasa de división embrionaria es de aproximadamente 60%, mientras que la producción de blastocistos esta cercana a un 20% (14), lo que demuestra la alta tasa de pérdidas embrionarias entre los estadios de 2 células a blastocisto.

El presente trabajo tuvo como objetivo valorar la incidencia de anomalías cromosómicas originadas por las técnicas de maduración y fecundación *in vitro* en embriones bovinos (*Bos taurus* × *Bos indicus*) así producidos.

Materiales y métodos

Maduración *in vitro*

Se recolectaron ovarios de vacas sacrificadas en matadero comercial y transportados al laboratorio en solución salina (0,9% de NaCl) a 35-37°C en recipientes isotérmicos. Se empleó la técnica de aspiración para obtener los COC's, seleccionándose los que presentaron un mayor tamaño, un citoplasma homogéneo y al menos una capa completa y compacta de células del cúmulus. El medio en el que fueron recuperados fue el TCM-199 (M2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO₃, 50 mg/L gentamicina (G1397, Sigma), 25 mM HEPES (Sigma), 0,4 g/L de BSA y 11,1 mg/L de heparina

(H9399, Sigma). Los COC's seleccionados se cultivaron en grupos de 20-25, en microgotas de 100 μL cubiertas con aceite mineral (M-8410, Sigma) durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO_2 en aire saturado de humedad, utilizando el medio de cultivo tisular 199 (TCM-199, 7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato de sodio (P-5280, Sigma), 146 mg/L de L-glutamina (25030-081, Gibco), FSHp 0.02 U.I (Pluset®, Calier, S.A. Barcelona-España), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 17 β -estradiol (E8875, Sigma), 10 % suero fetal bovino (26146-079, Gibco) según la metodología de Marquant *et al.* (14), adicionalmente se agregó 50 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (EGF, EF001, Gibco). Se tomó una muestra para evaluar la progresión meiótica, los ovocitos fueron tratados y clasificados según la metodología propuesta por Báez *et al.* (14).

Fecundación in vitro

Los espermatozoides fueron recuperados mediante la técnica de *swim-up* (15). Los COC's madurados fueron lavados tres veces en el medio Sperm-TALP y dos veces en medio TL-FIV, para luego ser trasladados a placas de petri de 35 \times 10mm, en grupos de 20 a gotas de 100 μL de medio TL-FIV-hasta alcanzar una concentración final de 1 \times 10⁶ espermatozoides por mL. Los gametos fueron cultivados durante 17 horas, a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO_2 en aire saturado de humedad. La penetración de los ovocitos, fue valorada mediante la recogida de una muestra de ovocitos de todas las gotas de fecundación. Los ovocitos tras ser teñidos con aceto-orceína, fueron considerados penetrados cuando se observó al menos una cola de espermatozoide en su citoplasma, estos a su vez, fueron clasificados según Martino *et al.* (16).

Cultivo in vitro de embriones

La separación de las células del cumulus y los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos se realizó

mediante agitación mecánica en medio TCM-199. Los presuntos cigotos fueron lavados dos veces en el mismo medio y depositados, en grupo de 20, en microgotas de 20 μL medio mSOFaa, suplementado con aminoácidos (BME 50x, MEM 100X, Sigma), citrato (106448, Merk), myo-inositol (I7508, Sigma) y 6 mg/mL de BSA (A6003, Sigma) descrito por Holm *et al.* (17). Las microgotas fueron cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma) e incubados 39 °C, 5% de CO_2 , 5% de O_2 y aire saturado de humedad durante 3 días (4 días pi). El medio de cultivo se recambió día 3, empleando para ello placas nuevas con 20 μL de medio mSOFaa. A las 72 hpi se evaluó la tasa de división contando el número de ovocitos no divididos y el número de embriones de 2 o más células. Los resultados obtenidos en la tasa de: maduración, fecundación, división, fueron expresados como frecuencias.

Análisis citogenético

Para evaluar la ploidía se siguió la metodología propuesta por Wang *et al.* (18). Los presuntos cigotos y los embriones de 2 o más células fueron transferidos a gotas de medio de cultivo conteniendo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Colcemid® (9311, Irvine Scientific) para sincronizarlos en metafase durante 6 horas. Luego del tratamiento con tripsina (840-7072IM, Gibco) al 0,5% durante 10 min, los embriones fueron transferidos a una solución hipotónica de citrato de sodio al 0,88% por 5 min y montados en portaobjetos previamente desengrasados. En el mismo portaobjeto se les dejó caer una gota de solución metanol: ácido acético (3:1) para la preparación de las extensiones y luego fueron fijadas en metanol: ácido acético (3:1) durante toda la noche. Luego de secados al aire, los portaobjetos fueron teñidos con orceína al 1,1% durante 5 min. Sólo los núcleos celulares intactos y con cromosomas extendidos fueron analizados. Para cada embrión se contó el número total de células y el número total de metafases analizables fueron examinadas bajo microscopia de campo claro (Olympus,

CX21, Japón) con aceite de inmersión a una magnificación de 1000x para determinar el número de cromosomas. Los embriones en los que todos núcleos analizados contenían dos set de cromosomas ($2n=60$) fueron clasificados como diploides, y aquellos que mostraron un solo set de cromosomas ($n=30$) fueron clasificados como haploides. El índice mitótico fue calculado como la relación entre el número de células mitóticas y el número de total de células.

Resultados y discusión

Un total de 479 ovocitos fueron obtenidos a partir de 68 ovarios de hembras sacrificadas en un matadero comercial (7 ovocitos por ovario). El porcentaje de ovocitos maduros luego de 24 horas de cultivo alcanzó un 65,71% (23/35) (metafase II + corpúsculo polar) y 14,28% (5/35) de inmaduros (metafase I).

A las 18 hpi se observó una tasa de 57,14% (20/35) de ovocitos normalmente fecundados, con un porcentaje de 11,42% (4/35) de penetraciones anormales. Tras 72 hpi la tasa de división embrionaria fue de 57,14%. El 27,55% correspondieron a embriones de 2 células, seguido de un 11,22%

de 4 células y de 18,36% para el estadio de >5 células.

Un total de 43 embriones fueron fijados, de los cuales 33 no pudieron ser analizados, sólo 9 lograron valorarse. En la tabla 1, se muestra la clasificación y número de núcleos analizados después del estudio citogenético. Del total de embriones procesados, el 20,93% (9/43) mostraron al menos 1 metafase analizable, alcanzándose un índice mitótico de 44,44% (12/27). El porcentaje de embriones citogenéticamente anormales fue de un 11,11% (1/9), siendo la haploidía la única anomalía observada.

Los resultados de este estudio muestran que la mayoría de los embriones producidos *in vitro* obtenidos con nuestro protocolo son diploides. Los mismos provienen de procesos de maduración (65,71%) y fecundación *in vitro* (57,14%) que permiten alcanzar tasas similares a las obtenidas por otros tantos laboratorios de producción *in vitro* en bovinos.

Al menos una metafase pudo ser analizada en 23,25% de los embriones producidos *in vitro* utilizados en este estudio. Kitiyanat *et al.* (20), cariotipando embriones bovinos observó que el número de embriones

Tabla 1
Ploidía de embriones bovinos producidos *in vitro*

Embrión	No. de células	Estimación de ploidía de núcleos individuales							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	2	D	NS						
2	4	H	H	H	I				
3	2	D	I						
4	2	D	D						
5	2	D	NA						
6	8	D	P	P	P	P	P	A	I
7	3	D	P	P					
8	2	D	DG						
9	2	D	NA						

H: haploide. D: diploide. I: interfase. P: prometafase. A: anafase. DG: degenerado. NA: no analizable.

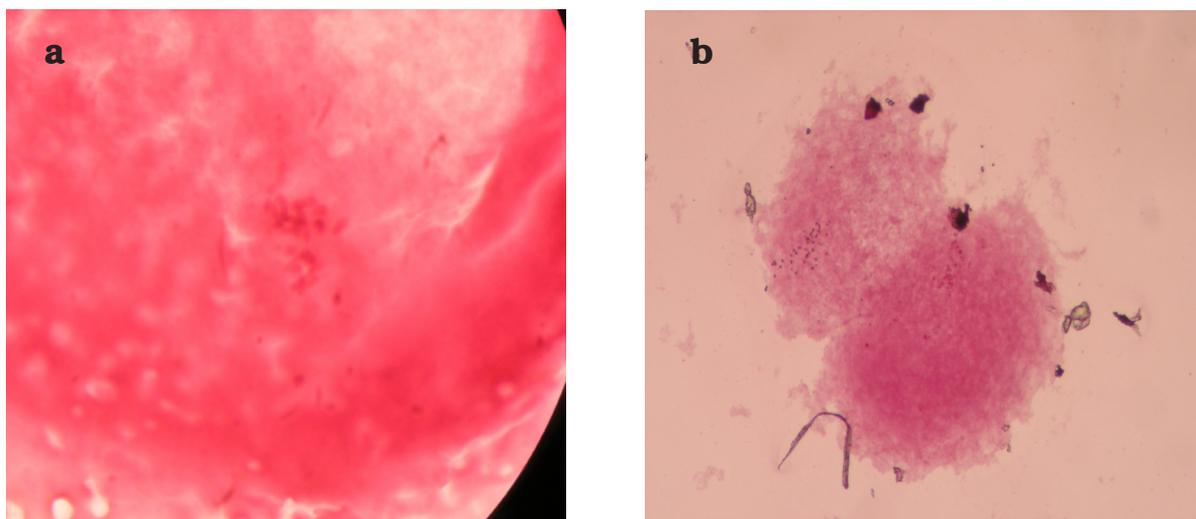


Figura 1. Complemento cromosómico de embriones bovinos producidos *in vitro*. (a) Metafase haploide de embrión en estadio de 4 células (1000X). (b) Metafases diploides de embrión de 2 células (200X).

no analizables fue relativamente alto (19% no tenían células metafásicas, y 10% metafases con mala apariencia). Lattanzi *et al.*, (21), estudiando el desarrollo embrionario en bovinos, pudo valorar 124 de 189 embriones en estadio de 2 a 10 células (día 2), 65 embriones mostraron solamente núcleos interfásicos o metafases no analizables.

El índice mitótico fue de 44,44%. Sugimura *et al.* (1), estudiando la incidencia de anomalías cromosómicas en blastocistos, encuentra que el número de células mitóticas analizadas se ubicó en un rango entre 2 y 47 células mitóticas por blastocisto, siendo el índice de $0,39 \pm 0,13$. Rubessa *et al.* (22), tomando embriones desde el día 0 hasta el día 7, reporta un índice mitótico del 19,6 % (28/143 células) en el día 2, 18,6 % (41/221 células) en el día 3, 10,3 % (27/263 células) en el día 4, 7,1 % (26/367 células) en el día 5, 0,7 % (5/681 células) en el día 6 and 0,6 (9/1425 células) en el día 7. Chatzimeletiou *et al.* (13), estudiando las anomalías del huso mitótico en embriones humanos preimplantacionales, encuentra que el índice mitótico en embriones con desarrollo normal, basado en la identificación de husos metafásicos marcados con α -tubulina, varía entre 1,8 y

3,9%. En las pruebas realizadas por estos autores, ninguno de los embriones detenidos en estadios de división tempranos en el día 3 mostró huso mitótico, mientras que los detenidos en los días 4 y 5 el índice mitótico no difirió significativamente de los embriones con desarrollo normal en el mismo día.

El estudio de parámetros citológicos como lo son el número de células y el índice mitótico pueden resultar en una mejor estimación de la calidad embrionaria, más allá de las evaluaciones subjetivas basadas en las características morfológicas. El índice mitótico en embriones puede variar por efecto del estrés térmico, el número de células, entre otros (6, 22).

Entre las dificultades de las investigaciones citogenéticas de extensiones metafásicas embrionarias esta la identificación de los cromosomas en ganado, un hecho bien ilustrado por el debate que se observa en la literatura científica sobre los estándares del cariotipo en bovino (23). El cariotipo normal bovino consta de 58 cromosomas autosómicos y 2 sexuales. Todos los autosómicos son acrocéntricos, sus centrómeros son terminales, y sólo difieren en la longitud. Por lo tanto, el cariotipo bovino se establece de

acuerdo a este último criterio. Los cromosomas sexuales son más fáciles de identificar porque sus centrómeros están situados en la región media. El cromosoma X es similar en longitud al autosómico más largo, mientras que el Y es uno de los más cortos de todo el cariotipo (24).

La identificación de cromosomas individuales es aún más dificultosa en extensiones metafásicas embrionarias, principalmente debido a la condensación y la sobreposición de cromosomas. Debido a estas dificultades, combinadas con el hecho de que no todos los blastómeros producen extensiones metafásicas, muchos estudios están basados en solo pocas extensiones cromosómicas por embrión (5).

La única anomalía observada fue la haploidía. La haploidía ha sido observada en embriones de animales domésticos y humanos con frecuencias de 1 a 22%. En bovinos, la tasa de embriones haploides varía entre 1,1 a 8,3%. La incidencia de haploidía podría ser causada por una maduración citoplasmática del ovocito incompleta (11).

El desarrollo haploide es una parte normal en el ciclo de vida de algunos animales (avispa parasita), pero no se observa en mamíferos. Estudios en ratón revelan que el potencial desarrollo preimplantacional de los embriones haploides se ve significativamente afectado en relación al de los embriones diploides. El genoma mamífero, en contraste con el genoma de otros organismos, esta sometido a mecanismos de regulación genética que alteran la capacidad del genoma haploide de sobrellevar el desarrollo embrionario temprano. Las razones para esta severa limitación del potencial del desarrollo de los embriones haploides en mamíferos no ha sido discernida (25).

La principal anomalía cromosómica encontrada en embriones bovinos producidos *in vitro* es la mixoploidía, embriones conteniendo una mezcla de células diploides normales y células portadoras de más o menos dos sets de cromosomas (5). Los embriones

poliploides se desarrollan lentamente y aparentemente se detienen en el tercer ciclo celular, mientras que los mixoploides parecen continuar su desarrollo. La mixoploidía no parece afectar de manera crítica el desarrollo embrionario subsecuente. Una alta frecuencia de cromosomas anormales por blastocisto (>25%) puede sin embargo, ocasionar serias consecuencias (1).

De varios estudios previos se puede resumir que las variaciones cromosómicas se incrementan en frecuencia debido a las técnicas de producción *in vitro* (7), pero los embriones las toleran probablemente debido a que éstas no se extienden ampliamente al ser bajo el número de células portadoras de dichas anomalías.

A pesar de las continuas mejorías de las técnicas de fecundación y cultivo *in vitro* de embriones, los fallos en el desarrollo embrionario son un fenómeno recurrente tanto en humanos como en animales (26). El análisis cromosómico de embriones producidos *in vitro*, la relación de dicho componente cromosómico, con la división temprana y la morfológica pudiera mejorar los conocimientos que se tienen sobre el desarrollo embrionario.

Conclusiones

Los resultados demuestran que el sistema de producción *in vitro* de embriones empleado puede proveer embriones bovinos saludables citogenéticamente. Se requeriría profundizar en el mejoramiento de las condiciones de cultivo *in vitro*, sabiendo que estas pueden influenciar significativamente el desarrollo embrionario.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (proyecto CC-0408-10).

Referencias bibliográficas

1. SUGIMURA S., AKAI T., HASHIYADA Y., SOMFAI T., INABA Y. Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. *Plos one*. 7(5): e36627. doi:10.1371/journal.pone.0036627. 2012.
2. KING, W. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.** 34: 229-250. 1990.
3. MUNNÉ S., ALIKANI M., TOMKIN G., GRIFO J., COHEN J. **Fertil Steril.** 64:382-391. 1995.
4. LECHNIAK D., PERS-KAMCZYC E., PAWLAK P. **Reprod Biol.** 8:23-42. 2008.
5. VIUFF D., RICKORDS L., OFFENBERG H., HYTTEL P., AVERY B., GREVE T., OLSAKER I., WILLIAMS J., CALLESEN H., THOMSEN P. **Biol. Reprod.** 60: 1273-1278. 1999.
6. KAWARSKY S., BASRUR P., STUBBINGS R., HANSEN P., KING W. **Biol. Reprod.** 54: 53-59. 1996.
7. VIUFF D., GREVE T., AVERY B., HYTTEL P., BROCKHOFF P., THOMSEN P. **Biol. Reprod.** 63: 1143-1148. 2000.
8. VIUFF D., PALSGAARD A., RICKORDS L., LAWSON L., GREVE T., SCHMIDT M., AVERY B., HYTTEL P., THOMSEN P. **Mol. Reprod. Dev.** 62: 483-488. 2002.
9. BIELANSKA M., TAN S., AO A. **Hum. Reprod.** 17: 413-419. 2002.
10. LECHNIAK D. **Genet. Sel. Evol.** 28: 321-328. 1996.
11. VILLAMEDIANA P., VIDAL F., PARAMIO MT. **Zygote**, 9: 193-199. 2001.
12. IWASAKI S., NAKAHARA T. **Theriogenol.** 33:669-675. 1990.
13. CHATZIMELETIOU K., MORRISON E., PRAPAS N., PRAPAS Y., HANDYSIDE A. **Hum. Reprod.** 30: 672-682. 2005.
14. BÁEZ F., LANDINEZ J., HERNÁNDEZ-FONSECA H., VILLAMEDIANA P. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 27: 460-478. 2010.
15. MARQUANT B., GERARD M., SOLARI A., THIBAUT C. **Reprod. Fert. Develop.** 29: 559-568. 1989.
16. PARRISH J., SUSKO-PARRISH J., LEIBFRIED-RUTLEDGE M., CRITSER F., EYESTONE W., FIRST N. **Theriogenol.** 25:591-600. 1986.
17. MARTINO A., SONGSASEN N., LEIBO S. **Biol. Reprod.** 54: 1059-1069. 1996.
18. HOLM P., BOOTH PJ., SCHMIDT MH., GREVE T., CALLESEN H. **Theriogenol.** 52: 683-700. 1999.
19. WANG Z., WANG W., YU S., XU Z. **Anim. Reprod. Sci.** 105: 292-301. 2008.
20. KITTYANANT Y., SAIKHUN J., SIRIAROONRAT B., PAVASUTHIPAISIT K. **ScienceAsia.** 26: 9-13. 2000.
21. LATTANZI M., SANTOS C., MUDRY M., BARANAO J. **Biol. Reprod.** 69: 1793-1800. 2003.
22. RUBESSA M., IANNUZZI A., PERETTIC V., PAUCIULLO A., COSENZA G., RAMUNNO L., IANNUZZI L., RUBES, J., DI BERARDINO D. Mitotic index and aneuploidy variation in growing day 2- to day 7- IVP bovine embryos of the Agerolese breed of cattle. 20th International Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping. Poster XXX Oral. Universidad de Córdoba. 2012.
23. DI BERARDINO D., HAYES H., FRIES R., LONG S. **Cytogenet Cell Genet.** 53:65-79. 1990.
24. POPESCU P. **Adv. Vet. Sci. Com. Med.** 34: 4171. 1990.
25. LATHAM K., AKUTSU H., PATEL B., YANAGIMACHI R. **Biol. Reprod.** 67, 386-392. 2002.
26. MAHMOUD K., SEIDEL G. **J. Genetic.** 1:05-12. 2011.