

## EFFECTO DE DOS CONDICIONES DE TRANSPORTE DURANTE 6 HORAS DE COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO SOBRE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE BLASTOCISTOS EN BOVINO

### Effect of two transport conditions for 6 hours of cumulus-oocyte complexes on in vitro production of bovine blastocyst

Josselin Rivas<sup>1\*</sup>, Carmen Huayhua<sup>1</sup>, Edwin Mellisho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Tecnología de Embriones (CIETE), Programa de Mejoramiento Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina, Lima, Perú.

\* Corresponding author: [jrivasflores.98@gmail.com](mailto:jrivasflores.98@gmail.com) (Josselin Rivas)

Recibido: 17/07/2020

Aceptado 10/08/2020

Publicado: 21/08/2020

#### ABSTRACT

The transport conditions of the cumulus-oocyte complex (COC's) for embryo production can affect the embryo competence. Therefore, the development of a portable system could allow the transport of recovered COC's efficiently, consequently, achieving the successful conservation of their quality. The objective of the work was to evaluate the effect of two transport conditions of cumulus-oocyte complex for 6h on the in vitro production of blastocysts in cattle. Treatment 1 was directly matured in M-IVM in a conventional incubator. Treatment 2 and 3 were transported in M-Wash in an oocyte transporter and M-IVM in a portable incubator, respectively for 6 hours and then, were transferred in M-IVM to complete 24 hours of maturation. They were evaluated; cleavage (IVC day 2), morulae (IVC day 4) and blastocysts rate (IVC day 7), development speed and embryonic quality (IVC day 7). The blastocyst rate from three treatments, are no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the two transport conditions (27.2 and 28.1%). Furthermore, the quality and development speed were not affected by the transport conditions. In conclusion, the two conditions, transport of the cumulus-oocyte complex during 6h did not affect the viability of the oocyte observed in the cleavage rate and blastocyst rate.

**Keywords:** cumulus-oocyte complex, embryo, transport, bovine

#### RESUMEN

Las condiciones de transporte de los Complejo cúmulo-ovocito (COC's) para la producción de Embriones pueden afectar la competencia de los embriones. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema portátil, podría permitir el transporte de estos COC's recuperados de manera eficiente, logrando así la conservación exitosa de su calidad. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de dos condiciones transporte de complejo cúmulos-ovocito durante 6h sobre la producción in vitro de blastocistos en bovinos. El tratamiento 1 se maduró directamente en M-IVM en incubadora convencional. El tratamiento 2 y 3 se transportaron en M-Wash en transportador de ovocito y M-IVM en incubadora portátil respectivamente por 6 horas y luego fueron transferidos en M-IVM para completar las 24 horas de maduración. La evaluación fue; porcentaje de clivaje (día 2 de IVC), mórulas (día 4 de IVC) y blastocistos (día 7 de IVC), velocidad de desarrollo y la calidad embrionaria (día 7 de IVC). La tasa de blastocistos a partir de tres tratamientos, los cuales mostraron que no existe diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las dos condiciones de transporte (27.2 y 28.1%). Además, la calidad y estado de desarrollo avanzado no fue afectado por las condiciones de transporte. Las dos condiciones transporte de complejo cúmulos-ovocito durante 6h no afectó en la viabilidad del ovocito observada en la tasa de clivaje y tasa de blastocistos.

**Palabras clave:** Complejo cúmulo-ovocito, embrión, transporte, bovino

## INTRODUCCION

En los últimos 20 años, la producción de embriones in vitro a diferencia de su homólogo in vivo ha tenido un crecimiento exponencial de un 400% aproximadamente, llegando a registrar en el 2018 más de un millón de embriones bovinos producidos in vitro (IETS, 2019). Esto a pesar de que los embriones producidos in vitro tienen una menor calidad, menor tasa de supervivencia (Lonergan et al., 2006; Lonergan, 2007) y de preñez (Sirard, 2018) que los embriones producidos in vivo.

El proceso de producción de embriones in vitro inicia con la aspiración y maduración in vitro (IVM) de los complejos cumulus-ovocito (COCs) (Dall'Acqua et al., 2017). La calidad de estos COCs recuperados al iniciar el proceso in vitro es uno de los factores determinantes para el rendimiento de blastocistos (Rizos et al., 2002) reflejando el potencial de desarrollo al adquirir la competencia y capacidad de reanudar y completar la meiosis, someterse al proceso de fecundación e iniciar y mantener el desarrollo embrionario (Rizos et al., 2002). En condiciones in vivo, la maduración del ovocito es crítica para adquirir la competencia de desarrollo por interacciones entre las células somáticas del folículo y el ovocito y produce cambios en la composición del líquido folicular y vascularización del ambiente folicular. Mientras que las condiciones in vitro no reflejan lo que ocurre en el entorno folicular y se trata de compensar utilizando suplementos de macromoléculas de naturaleza indefinida (Ispada et al., 2018) y menor presión del oxígeno (Corrêa et al., 2008).

Las condiciones de transporte de los COC's entre el lugar de obtención a los laboratorios de producción de embriones pueden afectar la competencia de los embriones (Dall'Acqua et al., 2017). Por lo tanto, el desarrollo de un sistema portátil adecuado podría permitir el transporte de estos COC's recuperados de manera eficiente, logrando así la conservación exitosa de su calidad (Hashimoto, 2003; Foss, 2013). Existen varios reportes que se han evaluado diferentes condiciones de transporte de ovocitos en equinos (Choi et al., 2006; Foss et al., 2013; Hinrichs et al., 2018), humanos (Roest et al., 1995; Takanashi et al., 2004; Raffo et al., 2018) y bovinos (Hashimoto et al., 2003; Dall'Acqua et al., 2017) con el uso de diferentes medios (Choi et al., 2006; Foss et al., 2013), tiempos (Takanashi et al., 2004) y temperaturas (Hashimoto et al., 2003; Hinrichs et al., 2018), no habiendo un efecto en la viabilidad del ovocito, tasa de clivaje y tasa de blastocistos, salvo con algunas diferencias. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de dos condiciones de transporte de complejo cúmulo-ovocito durante 6h sobre la producción in vitro de blastocistos en bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Los COC's recuperados y seleccionados de calidad I y II (n=482) fueron distribuidos al azar en tres grupos con un total de 6 repeticiones por cada tratamiento (ver Figura 1). (T1) Control 24h (M-IVM, 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C). (T2) Transporte 6h (M-was; 5%CO<sub>2</sub>, 38.5°C) y 18h (M-IVM, 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C). (T3) Transporte 6h (M-IVM; 5%CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 38.5°C) y 18h (M-IVM, 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C). La evaluación de la

producción in vitro de embriones fue; porcentaje clivaje (día 2 de IVC), mórulas (día 4 de IVC) y blastocisto (día 7 de IVC). Además, la velocidad de desarrollo y la calidad embrionaria fueron determinados por la proporción de blastocistos expandidos y por la proporción de blastocistos de calidad 1 (Excelente) respectivamente.

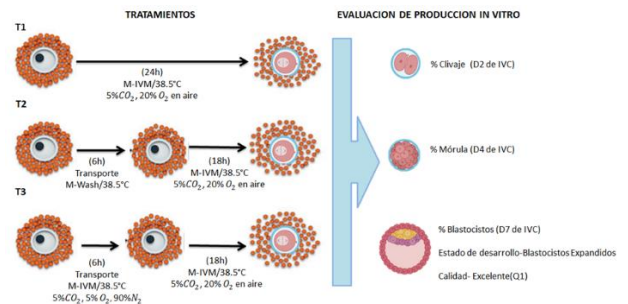


Figura 1. Diseño experimental de dos condiciones de transporte de COCs durante las primeras 6h de maduración in vitro. M-IVM: Medio de maduración in vitro; M-Wash: Medio de manipulación y lavado; IVC: Cultivo in vitro.

### Producción in vitro de embriones

Los ovarios fueron recolectados y transportados en condiciones isotérmicas al laboratorio en 2 a 3 horas. El líquido folicular aspirado de folículos entre 3 a 8 mm se colocaron en un tubo de 15ml para la sedimentación de los COC's. Después de la sedimentación, se recolectó y transfirió a una placa de 90x60mm conteniendo M-Wash, para su búsqueda, selección y clasificación morfológica en 4 categorías: (1) completamente rodeados por  $\geq 3$  capas células del cúmulo con citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente por células del cúmulo y citoplasma irregular, (3) ovocitos desnudos y (4) ovocitos rodeado por fibrina, con aspecto de tela de araña. Después de la recuperación y clasificación de los COC's de calidad 1 y 2 (viables) fueron distribuidos aleatoriamente en los tratamientos.

Los COC's fueron madurados en microgotas (70  $\mu$ L) de Medio de maduración (M-IVM, Vitrogen, Brasil) por 24 h (Grupo control) y 18h (grupo T2 y T3) en una incubadora convencional de 5%CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> en aire y 90% de humedad a 38.5°C. Después de las 24 h, los COCs fueron lavados y colocados en microgotas (70  $\mu$ L) de medio de fecundación (M-IVF, Vitrogen, Brasil) en placas petri de 35x10 mm, cubiertas con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5%CO<sub>2</sub> por 2 horas. Posteriormente, se adicionó una dosis de suspensión de espermatozoides seleccionados y capacitados en M-IVF e incubados por 18h a 38.5°C y 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire. Los espermatozoides se prepararon, descongelando las pajillas de semen congelado convencional-comercial a 37 °C por 20 segundos y se usó el método de Percoll 45/90 para la selección y capacitación, con centrifugaciones de 4000 RPM por 6 minutos y 4000 RPM por 3 minutos. La concentración final de espermatozoides utilizados en la inseminación fue de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Los presuntos cigotos fueron desnudos casi completamente por pipeteo sucesivos, para ser lavados y colocados en microgotas (70  $\mu$ L) de medio de cultivo (M-IVC, Vitrogen, Brasil) en placas petri de 35x10 mm, cubiertas con aceite

mineral e incubados a 38.5°C y 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire por 7 días. A los 2 y 4 días de cultivo se realizó la renovación del 60% de medio de cultivo M-IVC y la determinación de la tasa de clivaje y mórulas, respectivamente. El porcentaje de blastocisto, estado de desarrollo y calidad de blastocisto se evaluó al día 7 de cultivo.

#### Tratamientos

(T1) Control; Los COCs seleccionados fueron madurados directamente en incubadora convencional (5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C) durante 24 horas.

(T2) Condición de transporte 1; Los COCs seleccionados fueron puestos en un Transportador de ovocitos portátil a 38.5°C (WTA, Brasil) en 400 µL de M-Wash cubiertos con 300 µL de aceite mineral durante 6 horas y 18 horas en M-IVM en Incubadora Convencional (5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C)

(T3) Condición de transporte 2; Los COCs seleccionados fueron puestos en un Incubador portátil a 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>, 38.5°C (LabMix, WTA, Brasil) en 400 µL M-IVM cubiertos con 300 µL de aceite mineral durante 6 horas y 18 horas en gotas de M-IVM en incubadora convencional (5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> en aire y 38.5°C).

Tabla 1: Tasa de clivaje, mórulas y blastocistos obtenidos en dos condiciones de transporte de COCs durante las primeras 6h de maduración in vitro.

Tratamiento	Rep.	# COCs	Clivaje [día 2; n (%)]	Mórulas [día 4; n (%)]	Blastocistos [día 7; n (%)]
T1 Control (M-IVM 24h)	6	102	84 (82.4 ± 8.9) <sub>a</sub>	32 (31.4 ± 8.5) <sub>a</sub>	19 (18.6 ± 4.3) <sub>a</sub>
T2 Transporte 6h M-wash + M-IVM 18h	6	195	154 (79.0 ± 5.9) <sub>a</sub>	59 (30.3 ± 7.7) <sub>a</sub>	53 (27.2 ± 7.0) <sub>b</sub>
T3 Transporte 6h M-IVM + M-IVM 18h	6	185	141 (76.2 ± 9.5) <sub>a</sub>	53 (28,6 ± 4.2) <sub>a</sub>	52 (28.1 ± 6.1) <sub>b</sub>

Las columnas con superíndices diferentes (a,b) difieren (p>0.05).

Tabla 2: Velocidad de desarrollo y calidad embrionaria de blastocistos bovinos producidos in vitro obtenido por 2 condiciones de transporte de COCs en la primeras 6h de maduración in vitro.

Tratamiento	# Blastocistos	% Blastocistos expandido (E7)	% Calidad Excelente (Q1)
T1 Control (IVM 24h)	19	36.84 <sup>a</sup>	36.84 <sup>a</sup>
T2 Transporte 6h MM + IVM 18h	53	30.19 <sup>a</sup>	44.00 <sup>a</sup>
T3 Transporte 6h Gas mix + IVM 18h	52	40.38 <sup>a</sup>	55.78 <sup>a</sup>

Las columnas con superíndices diferentes (a,b) difieren (p>0.05)

La producción de embriones in vitro en bovinos en buenas condiciones, aproximadamente el 90% de COC's recuperados alcanzan la maduración nuclear, el 80% la fecundación (Lonergan y Fair, 2016) y alcanza a ser blastocistos el 20% a 40% (Lequarre et al., 2003; Rizos et al., 2008; Luciano et al.,

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la producción de embriones in vitro fueron analizados por test homogeneidad de varianzas (Shapiro wilks) y test normalidad (Test Levene). Posteriormente, a los resultados que no eran datos normales y tenía homogeneidad de varianzas, se procedió a analizar con prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de muestras independientes, P<0.05) utilizando el software IBM SPSS STATISTICS 2.0 para Windows.

#### RESULTADO Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los resultados de tasa de blastocistos a partir de tres tratamientos, los cuales mostraron que no existe diferencias significativas (p>0.05) entre las dos condiciones de transporte (27.2 y 28.1%). En la Tabla 2, se muestra que la calidad y estado de desarrollo avanzado no fue afectado por las condiciones de transporte.

2018. El porcentaje de clivaje y blastocistos obtenido en este estudio se encuentra dentro de los parámetros recomendados por los autores anteriormente citados.

Los ovocitos recuperados de los folículos reanudan el proceso de meiosis al liberarse de la influencia inhibitoria de los folículos (Edwards, 1965) y al ser cultivados en condiciones adecuadas pasa por cambios tanto nucleares como citoplasmáticos (Gasparrini, 2002). Según Hyttel et al. (1989) en la maduración in vitro los ovocitos adquieran maquinaria biológica celular necesaria para la fecundación y posterior desarrollo embrionario. A pesar de ello, el 60 a 70% de los ovocitos se pierden por la incapacidad del embrión para someterse al clivaje y el desarrollo adecuado hasta la etapa de blastocisto.

Memili y First (1999) afirman que existen varios factores que pueden interferir en el desarrollo del embrión bovino, lo que hace que cese el clivaje y siendo, la mayor parte del bloqueo embrionario ocurre durante el cuarto o entre el cuarto y quinto ciclo de transición celular. Este bloque de desarrollo en bovinos es concurrente con la transición materno-embriónica, la etapa de desarrollo en la que los embriones concluyen la activación principal del genoma y debe depender de los ARNm

transcritos de su propio genoma para continuar el desarrollo (De Sousa et al., 1998). Según, Betts y King (2001) afirman que existen dos posibles mecanismos que causan el bloqueo del desarrollo embrionario con la incapacidad de superar la represión de la cromatina: i) activar la transcripción de genes importantes del desarrollo y ii) reaccionar a las lesiones causadas por el medio ambiente.

Las condiciones de transporte de los COC's pueden ser uno de los factores que afecta la calidad de los ovocitos durante la fase de maduración. Sin embargo, tal como muestra nuestros resultados en la Tabla 2, diferentes condiciones de transporte de ovocitos en bovinos (Hashimoto et al., 2003; Dall'Acqua et al., 2017) con el uso de diferentes medios, tiempos (Takanashi et al., 2004) y temperaturas (Hashimoto et al., 2003; Hinrichs et al., 2018), no afectó en la viabilidad del ovocito observada en la tasa de clivaje y tasa de blastocistos.

## CONCLUSION

Las dos condiciones transporte de complejo cúmulos-ovocito durante 6h no afectó en la viabilidad del ovocito observada en la tasa de clivaje y tasa de blastocistos.

## CODIGO DE ETICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

## CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: JR, CH, Desarrollo de la metodología: JR, CH; Concepción y diseño: EM; Edición del artículo: JR, CH, EM Supervisión del estudio: EM

## REFERENCIAS

- Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 2001;55(1):171-191. doi:10.1016/s0093-691x(00)00453-2
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2006;66(4):955-963. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.064
- Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*. 2008;104(2-4):132-142. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.02.002
- Dall'Acqua PC, Leão BCda S, Rocha-Frigoni NAde S, Gottardi FP, Mingoti GZ. Delaying meiotic resumption during transportation of bovine cumulus-oocyte complexes: effects on development, apoptosis and caspases activity of in vitro-produced embryos. *Zygote*. 2017;25(6):740-750. doi:10.1017/S0967199417000636
- De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*. 1998;49(1):115-128. doi:10.1016/s0093-691x(97)00406-8
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 1965;208(5008):349-351. doi:10.1038/208349a0
- Foss R, Ortis H, Hinrichs K. Transporte de ovocitos equinos para ICSI. *Equine Vet J*. 2013; 45: 39-43. doi: 10.1111 / evj.12159
- Gasparrini B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*. 2002;57(1):237-256. doi:10.1016/s0093-691x(01)00669-0
- Hashimoto S, Kimura K, Iwata H, Takakura R. Oocyte transport: Developmental competence of bovine oocytes arrested at germinal vesicle stage by cycloheximide under air. *J Reprod Dev*. 2003;49(1):61-66. doi:10.1262/jrd.49.61
- Hinrichs K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reprod Domest Anim*. 2018;53 Suppl 2:4-13. doi:10.1111/rda.13259
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl*. 1989;38:35-47.
- IETS. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo technology newsletter*, 2019. 37 (4): 7-25.
- Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2018;30(9):1169-1179. doi:10.1071/RD17271
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod*. 2003;69(5):1707-1713. doi:10.1095/biolreprod.103.017178
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 2006;65(1):137-152. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.028
- Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016;4:255-268. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110822
- Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;64:315-325. doi:10.5661/rdr-vi-315
- Luciano AM, Franciosi F, Barros RG, Dieci C, Lodde V. The variable success of in vitro maturation: can we do better?.

- Anim Reprod. 2018; 15: 727–736. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0021>.
- Memili E, First NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod.* 1999;61(5):1198-1207. doi:10.1095/biolreprod61.5.1198
  - Raffo F, Blaquier J. Transport IVF-ICSI: Results of a 25 years experience. *JBRA assisted reproduction.* 2018; 22(2):123-127 doi: 10.5935/1518-0557.20180026
  - Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 4:44-50. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x
  - Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(2):234-248. doi:10.1002/mrd.1153
  - Roest J, Verhoeff A, van Lent M, Huisman GJ, Zeilmaker GH. Results of decentralized in-vitro fertilization treatment with transport and satellite clinics. *Hum Reprod.* 1995;10(3):563-567. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135989
  - Sirard MA. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction.* 2018;156(1):R1-R7. doi:10.1530/REP-18-0008
  - Takanashi Y, Abe Y, Shibui Y, Hanaoka K, Takeshita N, Masaki K, Kubo H. Effect of oocyte transportation time on the clinical results of transport in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer. *Reprod Med Biol.* 2004; 3, 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2004.00060.x>