

Efecto de tres niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*

Effect of three oxygen levels in culture atmosphere and addition of commercial antioxidant in the development of bovine embryos produced *in vitro*

Recibido: 31 de enero del 2017
Aceptado: 4 de diciembre del 2017
Publicado: 11 de junio del 2018

Guadalupe Adilia Delgado Tiburcio*°.

Cómo citar:

Delgado Tiburcio, G. A. (2018). Efecto de tres niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Acta Universitaria*, 28(2), 53-57. doi: 10.15174/au.2018.1769

* Universidad Autónoma de Nayarit, km 9, carretera Tepic-Compostela: Xalisco, Nayarit. C.P. 63780.
Correo electrónico: gdelgado_83@hotmail.com.

° Autor de correspondencia.

Palabras Clave:

Producción de embriones bovinos *in vitro*, antioxidante, ROS.

Keywords:

In vitro production; bovine embryos; antioxidant; ROS.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres atmósferas de incubación y el empleo de un antioxidante comercial en medios de cultivo semidefinidos de un sistema secuencial, sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Después de la fertilización *in vitro*, los presuntos cigotos fueron asignados aleatoriamente a seis tratamientos en arreglo factorial: con y sin el complejo antioxidante (*Sigma antioxidant supplement*®) y tres concentraciones de oxígeno (2%, 5% y 20%) en la atmósfera de cultivo. Los resultados se analizaron mediante un Análisis de Varianza (Anova) factorial y se compararon por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La atmósfera reducida en oxígeno (2%) influyó positivamente en las variables: porcentaje de blastocistos, porcentaje de mórula y número de células ($p < 0.05$). La interacción de la atmósfera con el antioxidante resultó significativa para la variable número de células ($p < 0.05$). El presente trabajo concluye efectos positivos con el uso de 2% de O₂.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of three oxygen concentrations in the incubation environment and the use of a commercial antioxidant in semi-defined, sequential culture media on the *in vitro* production of bovine embryos. After *in vitro* fertilization, the presumptive zygotes were randomly assigned to six treatments under factorial arrangement: with and without the antioxidant compound (*Sigma antioxidant supplement*®), under three oxygen concentrations (2%, 5% and 20%) in the incubation atmosphere. The results were analyzed by *Análisis de Varianza* (Anova), using Tukey test ($p < 0.05$) to compare treatments. Reduced oxygen (2%), in the incubation environment, had a positive effect on blastocysts and morula production percentage, and cell number ($p < 0.05$). It is concluded that there are positive effects in the use of reduced oxygen (2%).

INTRODUCCIÓN

En bovinos la producción *in vitro* de embriones (PIV) es una herramienta comercial eficaz para incrementar la tasa reproductiva de hembras de alto mérito genético (Da Silva, Marques & Chaveiro, 2010). Sin embargo, *in vitro*, el desarrollo embrionario es afectado por factores intrínsecos y extrínsecos como: iones, buffers, factores de crecimiento, aminoácidos, sustratos de energía, la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), entre otros (Rieger, 1992). La producción de ROS es un proceso propio del metabolismo celular; se trata de moléculas derivadas de productos intermediarios del metabolismo celular que forman poderosos oxidantes, superan la capacidad antioxidante del sistema de defensa celular, oxidan y modifican cualquier molécula celular ocasionando alteraciones funcionales y estructurales de estas. Un incremento en ROS ocasiona una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante y un daño en las células u órganos, lo cual permite activar y/o acelerar los procesos degenerativos y morbosos (Combelles, Gupta & Agarwal, 2009; Da Silva et al., 2010; Sharma & Agarwal, 1996; Sies, 1985). Cualquier radical libre de oxígeno puede ser referido como un ROS. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un radical de corta duración, sin embargo, representa la variante más reactiva de las ROS, ya que necesita solamente un electrón desapareado para su formación, y el problema principal del H_2O_2 es que atraviesa fácilmente las membranas celulares durante la recepción del electrón (Ashok & Ali, 2003; Vieira, 2006). Los ovocitos y los embriones son células aerobias y en la mayoría de los casos responden igual a la acción de ROS ya que para ellas el uso del O_2 produce energía alrededor de la mitocondria durante la fosforilización oxidativa, generando un estrés oxidativo que es responsable de muchos tipos de daños en el embrión como alteraciones mitocondriales, bloqueo celular, depleción de los ATPs y apoptosis (Guérin, El Mouatassim & Menezo, 2001; Membrillo et al., 2003), daño en la membrana celular (Aitken et al., 1989), fragmentación de DNA (Halliwell & Arouma, 1991), disfunción mitocondrial e inhibición de la fusión esperma-ovocito. En contraste, los antioxidantes son sustancias que previenen la oxidación, disminuyen los niveles de oxígeno y protegen a la célula de los daños que estos producen. En condiciones adecuadas las ROS y los antioxidantes interactúan para mantener una estabilidad celular (Da Silva et al., 2010; Guérin et al., 2001; Membrillo et al., 2003). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres niveles de O_2 en la atmósfera de incubación y la adición de un antioxidante comercial en los medios de cultivo semi-definidos de un sistema secuencial de cultivo sobre la producción de embriones bovinos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Recursos Genéticos y en el Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (en Tepatitlán de Morelos, Jalisco). Para la producción *in vitro* de embriones se prepararon medios semidefinidos de un sistema secuencial de cultivo embrionario CDM1/CDM2 (De la Torre-Sanchez, Preis & Seidel, 2006). Los ovarios fueron colectados en el rastro Municipal de Guadalajara (Jalisco) y transportados en Solución Salina Fisiológica (SSF) adicionada con 10 000 UI de penicilina y 10 mg/ml estreptomycin (Sigma P-0781), con una temperatura de 21 °C. En laboratorio fueron lavados en etanol al 70%, en SSF a 38 °C. Posteriormente se aspiraron los folículos con un diámetro de 2 mm a 8 mm con ayuda de jeringas de 10 ml y agujas calibre 20.

Los ovocitos recuperados se colocaron en un medio de maduración de acuerdo a la metodología descrita por De la Torre-Sanchez et al. (2006) e incubados por 23 h \pm 1 h. en una incubadora marca BINDER de dos gases (5% de CO_2 en aire), a una temperatura de 38.5 °C y 100% de humedad relativa.

Para la fertilización *in vitro*, los ovocitos fueron transferidos a un medio de fertilización en cantidad de 10 ovocitos por gota de medio ajustando el volumen a 100 μ L incluyendo el semen, dando una concentración espermática final de 5×10^5 espermatozoides/ml, previamente para capacitar el semen se sometió a un proceso de separación de gradientes de Percoll (90/45%). Las gotas de cultivo se cubrieron con aceite mineral (Sigma; M-8410) y se co-incubaron espermatozoides y ovocitos por 18 h en condiciones similares a la de maduración. Posteriormente, se removieron las células cumulares y los espermatozoides presentes mediante un proceso de agitación durante 90 s utilizando para ello un vortex.

Los cigotos obtenidos se distribuyeron en un factorial 3×2 con cinco repeticiones, asignado 60 cigotos por tratamiento: tratamiento Control (5%), 5% de CO_2 , 5% de O_2 y 90% de N_2 ; tratamiento de baja concentración de O_2 (2%), 5% de CO_2 , 2% de O_2 y 93% de N_2 ; tratamiento de alta concentración de O_2 (20%), 5% de CO_2 , 20% de O_2 y 75% de N_2 . En cada una de las diferentes atmosferas (de tratamiento) se asignaron dos variantes; con (C) y sin (S) complejo antioxidante (Sigma Antioxidant® A-1345 + Polyamine Supplement® P-8483). La adición del complejo antioxidante se realizó con una proporción de 1 en 1000.

En todos los tratamientos se colocaron los embriones en 6 gotas de 100 μ L, y cubiertas con aceite mineral, incubándose a 38.5 °C y alta humedad (100%), bajo la mezcla de gases que correspondía según el tratamiento en cajas de Petri.

Después de 56 h de cultivo se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados mediante el número de embriones que exhibieron al menos una división celular durante el cultivo. Asimismo, se evaluó el número de células de la división celular embrionaria. Seleccionando los embriones con seis o más células y se transfirieron a medio CDM-2;

10 embriones por gota de 100 µL de medio adicionado con o sin el complejo antioxidante en la misma proporción. Se incubaron en cada una de las correspondientes mezclas de gases, temperatura y humedad descritas para CDM1 según su tratamiento. Finalmente, a los siete días post-fertilización se evaluó el porcentaje de producción de blastocitos.

El número de células presentes en cada embrión, se realizó mediante la tinción de Giemsa, descrita por De la Torre-Sánchez et al. (2006). Se emplearon 5 blastocitos por tratamiento, éstos se lavaron en varias gotas con medio HCDM-2 para quitar los restos de aceite mineral, posteriormente se colocaron en una solución de citrato de sodio al 9% atemperada a 38.5 °C durante 15 min, luego fueron transferidos a una gota de solución de fijación preparada con metanol absoluto, ácido acético glacial y agua en una proporción 3:2:1, hasta que se desapareció la zona pelúcida aproximadamente un minuto. Por último, se colocaron en una laminilla, una vez evaporado el fijador, las laminillas se cubrieron con Giemsa al 5% (Sigma GS-500) en PBSm durante 15 minutos. Las laminillas luego de lavarlas, se observaron en un microscopio a 200X de amplificación y se contaron los núcleos.

Las ROS se cuantificaron mediante el componente fluorogénico 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA Sigma; D-6883) como lo describe Hashimoto, Minami, Yamada & Imai (2000). Se utilizaron 10 blastocitos producidos en los medios de cultivo CDM1/CDM2 con o sin el complejo antioxidante en las diferentes atmósferas (2%, 5% y 20% de O₂). La presencia de H₂O₂ en los embriones se examinó mediante DCHFDA. La emisión de fluorescencia fue capturada en archivos *Joint Photographic Experts Group* (JPG) por el programa *CAM Viewer* versión 1.9.0020 y con ayuda del programa *Leica LAS EZ V2.0.0*, se les agregó una línea de 100 pixeles necesaria para el funcionamiento del programa *ImageJ* con el cual se realizó la cuantificación de la presencia de H₂O₂ en los embriones.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA, bajo un diseño factorial 3 × 2 (atmósfera, antioxidante); para las variables de respuesta, porcentaje de embriones con más de seis células (DS); porcentaje de embriones con al menos una división (DT); porcentaje de mórula compacta (PM) y porcentaje de blastocisto (PBL); calidad de blastocistos (CBL) y calidad de mórulas (CM). Los datos obtenidos para las variables número de células (tinción de Giemsa) y presencia de H₂O₂ (DCHFDA) se realizó un ANOVA bajo un diseño factorial 3 × 2 (atmósferas y antioxidante). Las variables PBL y PM se transformaron a arcoseno para llevar los datos a la normalidad. Las diferencias de medias entre tratamientos para los factores: antioxidante y atmósfera, se compararon mediante una prueba Tukey ($p < 0.05$) en el programa estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de P obtenidos en el análisis de varianza aplicado DS, DT, PM, PBL, CBL, CM, número de células y DCHFDA se muestran en la tabla 1, resaltando un efecto significativo sobre la atmósfera es significativo estadísticamente ($p < 0.05$) las variables PM, PBL y número de células; asimismo, la interacción entre las atmósferas y antioxidante en el número de células en el embrión fue estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La adición del antioxidante en las diferentes atmósferas no se observó efecto significativo sobre ninguna variable de respuesta ($p > 0.05$) de la misma manera, en la variable DCHFDA no se observa diferencia significativa entre ninguna variable ($p > 0.05$).

El porcentaje de blastocistos, fue mayor en el tratamiento con atmósfera de 2% ($p > 0.05$, tabla 2), favoreciendo la producción de blastocistos a la más baja concentración de O₂ comparado con atmósferas de O₂ al 5% y 20%.

Tabla 1 Análisis de varianza (P^h) en diseño completamente al azar para las variables respuesta en tres atmósferas con y sin antioxidante

Variable	C.V	Atms	Pr > F Aox	Atms*Aox
D.S.	13.4417	0.1093	0.8239	0.6488
D.T.	8.7210	0.0985	0.6552	0.7122
PM	51.5561	*0.0199	0.7548	0.6645
PBL	42.5614	*0.0045	0.8156	0.6746
CBL	25.3175	0.6920	0.8230	0.0901
CM	23.4860	0.0960	0.3104	0.5617
Giemsa	22.0677	*0.0007	0.6863	*0.0275
DCHFDA	19.8094	0.2217	0.3127	0.5502

Dónde: C.V.: Coeficiente de variación; Atms: Atmósferas; Aox: Antioxidante; D.S.: Divisiones de más de seis células; D.T.: divisiones totales; PM; porcentaje de mórula; BL: porcentaje de blastocistos; CM: calidad mórula; CBL: calidad blastocistos; Giemsa: número de células.* indica diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2 Promedio del efecto de la atmósfera para las variables respuesta número de células, evaluadas mediante la tinción de Giemsa, porcentaje de blastocitos (PBL) y mórulas (PM) de acuerdo a las diferentes atmósferas como fuente de variación

Atms	PBL	PM	Giemsa
2%	20.86a	28.34a	86.36a
5%	11.16b	14.04b	72.17ab
20%	12.61b	19.38ab	54.93b

Dónde: Atms: Atmósferas; PM; porcentaje de mórula; BL: porcentaje de blastocistos; CM: calidad mórula; Giemsa: número de células. (a,b) indica diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

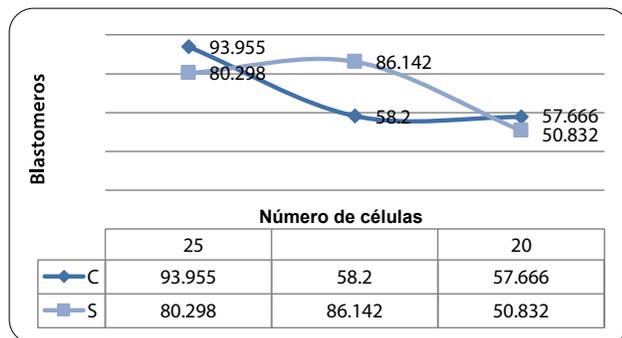


Figura 1

Interacción de las diferentes atmósferas con o sin la adición del antioxidante como fuentes de variación para la variable número de células, evaluadas por medio de la tinción de Giemsa. 2: 2% O₂; 5: 5% O₂; 20: 20% O₂; C: con antioxidante; S: sin antioxidante. Fuente: Elaboración propia.

El porcentaje en número de células fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en la atmósfera de cultivo con 2% de O₂ (tabla 2, $p < 0.05$), embriones cultivados en medio adicionado con antioxidante tienen una mayor proliferación en atmósfera de 2% de O₂, en contraste con una atmósfera de 5% y 20% de O₂ (figura 1).

Estos resultados obtenidos indican, que con una atmósfera de 2% de O₂, se mejora la calidad y cantidad de blastocistos obtenidos (mayor número de células), ello puede atribuirse a la sinergia de la adición del antioxidante en dicha atmósfera como protector para el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos son mejores a los reportados por Olson & Seidel (2000a; 2000b), quienes emplearon el mismo sistema de medios que se empleó en el presente trabajo; obteniendo en una concentración de 5% de O₂, 15 células por embrión y en una atmósfera de ~20% de O₂, 12 células por embrión. Asimismo, Harvey et al. (2006), obtiene en promedio 50 ± 2.5 células embrionarias en atmósferas de 2% O₂. En contraste, estudios con el mismo sistema de cultivo con una atmósfera de 5% de O₂, pero adicionado con glucosa obtiene un mayor número de células embrionarias que en el presente estudio, mientras que De la Torre-Sánchez et al. (2006) obtiene 104 ± 4.2 , Thompson et al. (1996), obtiene 117 ± 10 células, Hashimoto et al. (2000), obtuvieron 131.75 ± 9.75 células embrionarias. Por su parte, Balasubramanian et al. (2007) demuestran que el cultivo de embriones bovinos bajo condiciones bajas de O₂ (5%) provee un medio ideal para la formación de blastocistos diferentes en el total de número celular y la expresión genética.

CONCLUSIÓN

La adición de antioxidante en un medio de cultivo embrionario con una atmósfera baja de 2% de O₂ incrementa

el porcentaje de embriones *in vitro*, asimismo mejora la calidad del embrión obteniendo un mayor número de blastómeros en el embrión. Sin embargo, el efecto protector de la adición de antioxidantes se reduce en cultivos de mayor atmósfera 5% a 20% de O₂, ello permite indicar que una mayor concentración de O₂ reduce el desarrollo de embriones bovinos obtenidos *in vitro*.

REFERENCIAS

- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1), 183-97.
- Ashok, B. T. & Ali, R. (2003). Aging research in India. *Experimental Gerontology*, 38(6), 597-603.
- Balasubramanian, S., Son, W. J., Kumar, B. M., Ock, S. A., Yoo, J. G., Im, G. S., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2007). Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 68(2), 265-275.
- Combelles, C., Gupta, S., & Agarwal, A. (2009). Could oxidative stress influence the *in-vitro* maturation of oocytes?. *Reproductive Bio-medicine Online*, 18(6), 864-880.
- Da Silva, F. M., Marques, A., & Chaveiro, A. (2010). Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*, 9(4), 127-133. doi: 10.2174/1874318801004010127
- De la Torre-Sánchez, J. F., Preis, K., & Seidel, G. E. Jr. (2006). Metabolic regulation of *in-vitro*-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen different bulls. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(5), 585-596.
- Guérin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175-189.
- Halliwell, B., & Arouma, O. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, (281), 9-19.
- Harvey, A. J., Navarrate, A., Kirstein, M., Kind, K. L. & Fischer, B. & Thompson, J. G. (2006). Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, (74), 290-299. DOI: 10.1002/mrd.20617
- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2000). Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: Relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*, (56), 520-526.
- Membrillo, O. A., Córdova, I. A., Hicks, G. J. J., Olivares, C. I. M., Martínez, T. V. M., & Valencia, M. J. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia*, 28(12), 699-704.

- Olson, S. E., & Seidel, G.E. Jr. (2000a). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology Reproduction*, 62(2), 248-52.
- Olson, S. E., & Seidel, G. E. Jr. (2000b). Reduced oxygen tension and EDTA improved bovine zygote development in chemically defined medium. *Journal of Animal Science*, 78(1), 152-157.
- Rieger, D. (1992). Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, 37(1), 75-93.
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6), 835-50.
- Sies, H. (1985). Introductory remarks. In: Sies, H. (ed.). *Oxidative stress* (pp. 1-8). London: Academic Press.
- Thompson, J. G. E., Partridge, R. J., Houghton, F. D., Kennedy, C. J., Pullar, D., & Leese, H. J. (1996). Oxygen consumption by day 7 bovine blastocysts determination of ATP production. *Animal Reproduction Science*, 43(1996), 241-247.
- Vieira, A. J. S. C. (2006). Radicais oxidantes: da química à biologia. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 100, 66-71.