

## Variabilidad epigenética en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos clonados por bipartición embrionaria

### Epigenetic variability in the production of *in vitro* embryos from two boves cloned by embryo bipartition

Miguel Ángel Arista Ruiz<sup>1</sup>; Nilton Luis Murga Valderrama<sup>2</sup>

#### RESUMEN

En la presente investigación se determinó y comparó variabilidad epigenética en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos homocigotos de la raza Aberdeen Angus. Los ovocitos se obtuvieron de matadero y fueron madurados y fecundados por el método convencional. Posteriormente se cultivaron por 7 días en gotas de 90 µl de medio fluido oviductual sintético (SOF) cubiertos con aceite mineral. A los 7 días de cultivo se evaluó la producción total de embriones (blastocistos iniciales (Bi), blastocistos (Bl) y blastocistos expandidos (Bx)), presentando mayor porcentaje el ejemplar JTRM 27.86% a comparación del ejemplar VTRM 23.86% ( $p < 0.05$ ) y encontrando diferencia estadística significativa.

**Palabras clave:** epigenética, embriones, bovinos, clonación.

#### ABSTRACT

In the present investigation, epigenetic variability in the production of *in vitro* embryos of two homozygous cattle of the Aberdeen Angus breed was determined and compared. The oocytes were obtained from slaughterhouse and were matured and fertilized by the conventional method. Subsequently, they were grown for 7 days in 90 µl drops of synthetic oviductual fluid medium (SOF) covered with mineral oil. After 7 days of culture, the total production of embryos (initial blastocysts (Bi), blastocysts (Bl) and expanded blastocysts (Bx)) was evaluated, with a higher percentage of the JTRM specimen 27.86% compared to the VTRM specimen 23.86% ( $p < 0.05$ ) and finding significant statistical difference.

**Keywords:** epigenetics, embryos, cattle, cloning.

<sup>1</sup>Bachiller en Ingeniería Zootecnista de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

<sup>2</sup>Médico Veterinario. Investigador del Instituto de Ganadería y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. E-mail: nmurga.fizab@untrm.edu.pe

## I. INTRODUCCIÓN

En las ciencias médicas los gemelos homocigotos constituyen un grupo idóneo para abordar el estudio de las variabilidades epigenéticas, etc. La epigenética estudia las variaciones hereditarias que ocurren sin que cambie la secuencia del ADN, es decir, de los cambios en la función de los genes que no afectan la secuencia del ADN, si no por modificaciones que tienen lugar principalmente en las citosinas de éste y en las histonas de la cromatina. Se ha determinado que las modificaciones epigenéticas son mucho más frecuentes que aquellas que modifican la secuencia del ADN, por lo que constituyen uno de los fundamentos de la diversidad biológica. (Gonzales, Díaz y Díaz-Anzaldúa, 2008) El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es el principal objetivo en la producción de semen bovino (Quintero, Mayorga y Cardona, 2017).

La predicción de la capacidad fecundante del esperma es técnica y económicamente muy importante, en especial cuando se trabaja con reproductores que están en centros de inseminación. Los investigadores en el mundo han desarrollado varias pruebas relacionadas con la calidad de semen y su morfología (Barth, 1992), motilidad espermática (Kjaestad et al., 1993; Holt et al., 1997), componentes bioquímicos del semen (Hirao, 1975), presencia de cromosoma intacto (Correa et al., 1997), integridad de membrana plasmática (Perez et al., 1997), concentración de espermatozoides seleccionados por swim up (Zhang et al., 1998), reacción acrosómica (Januskauskas et al., 2000), etc. La producción de embriones in vitro se ha desarrollado y utilizado para la producción de crías

de alto valor genético de diferentes especies (Palmer et al., 1991). Esta técnica implica la maduración in vitro de ovocitos (MIV), fecundación in vitro de ovocitos (FIV) y el cultivo in vitro de ovocitos fecundados (CIV) hasta el estadio de blastocisto. A través de los años, muchos estudios, realizados principalmente en bovinos, han demostrado que el donante del semen influye en gran medida el resultado fecundación y cultivo de embriones (Shi et al., 1990; Shamsuddin y Larsson, 1993).

El mayor éxito del procedimiento de fecundación in vitro se demuestra al producir individuos vivos, utilizando tanto ovocitos madurados in vivo o in vitro, aunque la eficiencia de estos procesos de FIV disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados in vivo frente a los madurados in vitro (Lorenzo et al., 1994).

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

1Bachiller en Ingeniería Zootecnista de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

2Médico Veterinario. Investigador del Instituto de Ganadería y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

E - m a i l :

nmurga.fizab@untrm.edu.peLugar de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM).

Materiales

**Tabla 1:** Materiales y equipos usados para la producción de embriones in vitro

Materiales	Material biológico y reactivos	Equipos
Termo de transporte de ovarios	Ovarios recolectados de camal	Baño maría
Tijera	Solución salina al 0.9%	Estereoscopio
Termómetro	Medio de manipulación	Microscopio
Set de Tips de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl	Medio de maduración	Cabina de bioseguridad
Guantes quirúrgicos		
Set de Micropipetas de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl	Medio de fecundación	Incubadora de CO2 estacionaria
Papel toalla		
Botas de jebe	Medio de cultivo	Platina térmica
Overol	Semen bovino	Centrífuga
Vaso bicker	Percoll al 45%	Balón de gas CO2
Jeringa de 10 ml	Percoll al 90%	
Aguja hipodérmica 18 G	Alcohol al 70%	
Tubos falcon de 15 ml	Aceite mineral	
Pipetas Pasteur	Agua ultrapura	
Placas de 35, 70 y 100 mm	Agua destilada	
Tubos eppendorf		
Portaobjetos y cubreobjetos		

**Selección de los animales donantes de óvulos**

Las vacas Brown swiss cruzadas a donar los ovarios se seleccionaron del camal municipal de la ciudad de Chachapoyas, previo al beneficiado, se realizó una evaluación ante mortem como el estado sanitario, edad del animal por el número de sus incisivos, seleccionando a los que se encuentren entre 3 y 5 años indicativo que ya se encuentren en edad reproductiva y que por lo menos hayan tenido un parto (4 - 8 dientes) (Casas et al., 2001).

**Obtención de los ovarios y aspiración del complejo ovocito-cúmulos (COCs)**

Para la recolección de los ovarios se tuvo en cuenta que se encuentren todas las estructuras ováricas como folículo primario, folículo secundario, cuerpo hemorrágico, cuerpo lúteo, etc. Los óvulos se recuperaron de los folículos ováricos entre los 2 mm y 7 mm a través de la técnica de aspiración folicular con una jeringa hipodérmica de 10 ml y una aguja 18G. Finalmente se realizó la búsqueda y categorización (calidad A y B) (De Loos et al., 1992 y Sato et al., 1990) en un estereoscopio mediante la observación.

**Maduración in vitro de los complejos ovocito-cúmulos (COCs)**

Después de la recuperación y clasificación, los COCs de calidad A y B (viables) fueron lavados dos veces en medio de manipulación. Se colocaron 25 óvulos por microgota de 90 µl con medio de maduración, cubiertas con 4 ml de aceite mineral, en placas FIV de 35 mm, que previamente fue equilibrada como mínimo por 2 horas en condiciones de 5% CO<sub>2</sub>, 38,5 °C y humedad sobre 90% en la incubadora.

**Fertilización in vitro de los complejos ovocito-cúmulos (COCs)**

Para la fertilización se usó semen criopreservado de dos bovinos gemelos homocigotos clonados por bipartición embrionaria de raza Aberdeen Angus; JTRM y VTRM que fueron clonados por bipartición

embrionaria.

Es importante afirmar también que al momento de la colecta, el semen de estos toros; al evaluar las características seminales como volumen, pH, motilidad masal, motilidad individual, concentración y morfología, no presentaban diferencias estadísticas significativas entre ambos ejemplares. Después de las 24 horas de maduración en promedio, los ovocitos fueron fecundados por 18 horas, se adicionó 10 µl de espermatozoide por microgota, seleccionados por el método de Percoll y diluido en igual proporción con medio de fecundación.

**Cultivo in vitro de embriones**

Los embriones resultantes de la FIV, aproximadamente 18 horas post inseminación, se desnudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron en medio de cultivo antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo CIV de 90 µl, cubiertas de 4 ml de aceite mineral, donde los embriones continuaron su división celular a 8, 16 y 32 células hasta el día 7 de cultivo y llegar al estadio de blastocistos.

**Diseño de la investigación**

Se utilizó el diseño pre experimental con post pruebas en dos grupos y con muestras diferentes. Se realizaron en total 24 repeticiones por cada toro.

**III. RESULTADOS**

**Producción total de embriones**

La producción total de embriones es la sumatoria de los embriones que llegaron hasta los estadios de blastocisto inicial, blastocisto y blastocisto expandido, la figura 1 muestra el número de embriones por repetición de los dos toros. El porcentaje total de embriones para el toro JTRM fue de 27.86%, mientras que para el toro VTRM fue de 23.86% de un total de 244 óvulos fecundados.

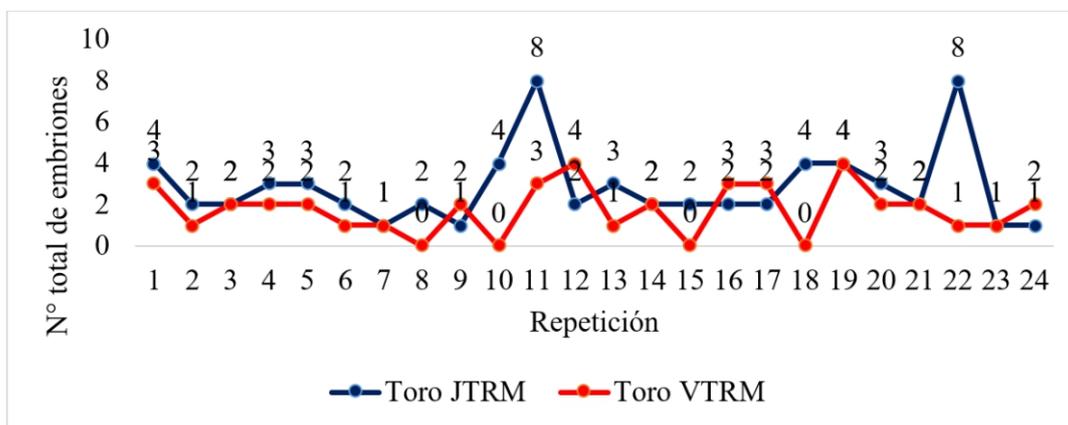


Figura 1. Evaluación de la producción total de embriones

**Producción de blastocistos iniciales**

La figura 2 muestra los números de embriones por repetición que llegaron hasta el estadio de blastocistos iniciales después de la fecundación de

244 óvulos, con promedios porcentuales de 21.31%a para el toro JTRM y 14.77%b para el toro VTRM. La diferencia porcentual para esta variable es 6.54%.

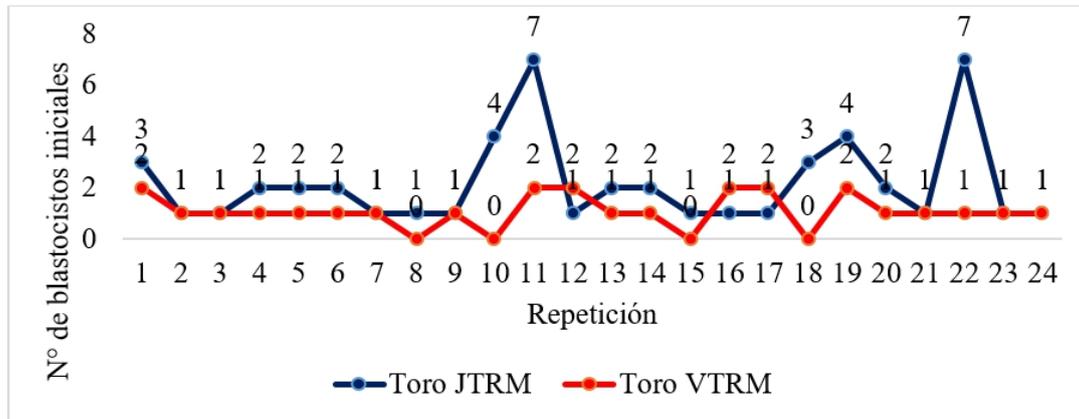


Figura 2. Evaluación de producción de blastocistos iniciales.

**Producción de blastocistos**

La media en porcentaje de blastocistos que lograron llegar hasta este estadio es de 5.73%a y 7.95%a del

total de óvulos fecundados (244) para los toros JTRM y VTRM respectivamente detallada en la figura 3 sin encontrar diferencia estadística para esta variable.

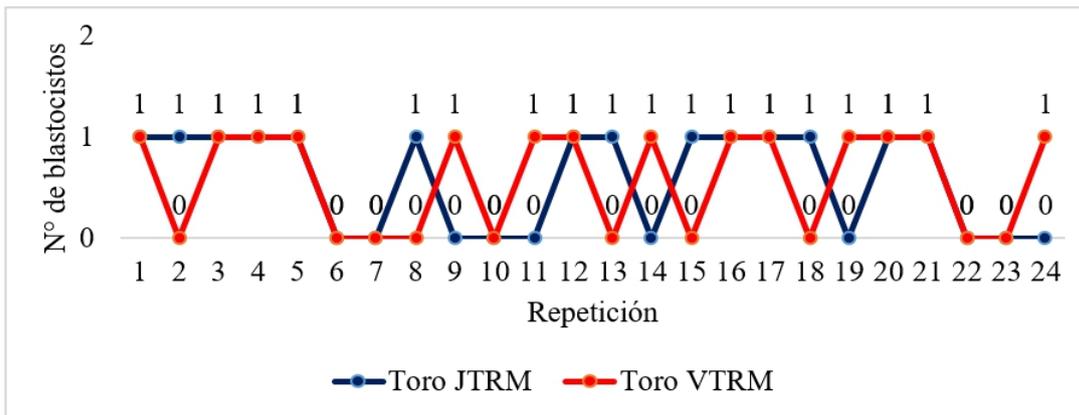


Figura 3. Evaluación de producción de blastocistos.

**Producción de blastocistos expandidos**

El valor promedio de la producción de blastocistos expandidos que arrojaron las 24 repeticiones fue de 0.82%a para el toro JTRM, mientras que para el toro

VTRM la media fue de 1.13%a, del total de óvulos que llegaron a ser fecundados, encontrando una diferencia porcentual del 0.31% y esto a la vez no demuestra una diferencia significativa.

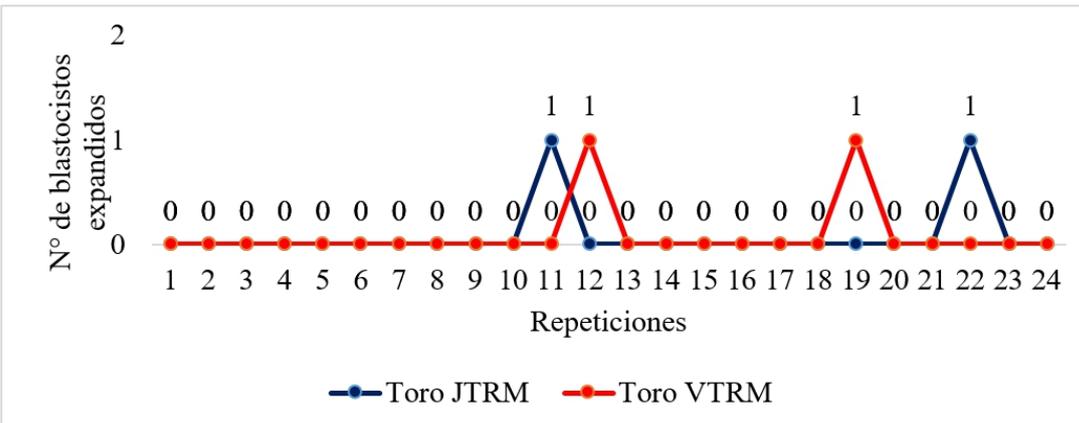


Figura 4. Evaluación de producción de blastocistos expandidos

Tabla 2: Resultados de significancia para todas las variables

Nombre del toro	Bi	Bl	Bx	TE
	%			
JTRM	21.31 <sup>a</sup>	5.73	0.82	27.86 <sup>a</sup>
VTRM	14.77 <sup>b</sup>	7.95	1.13	23.86 <sup>b</sup>

Bi: blastocistos iniciales. Bl: blastocistos. Bx: blastocistos expandidos. TE: total de embriones

<sup>a,b</sup> letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativa

## VI. DISCUSIÓN

El mejor indicador de eficiencia en producción de embriones in vitro es la cantidad y calidad de blastocistos producidos al día 7 post fecundación (Lonergan et al., 2006).

Según Rizos et al., (2002) solo el 30 a 40% de los ovocitos iniciales tienen la capacidad para llegar al estado de blastocistos. En esta investigación los porcentajes de producción embrionaria estuvieron por debajo de los promedios óptimos de producción (27.86% el toro JTRM y 23.86% el toro VTRM). Bonilla et al., (2018) también encontraron resultados de producción de embriones in vitro cercanos a los encontrados en esta investigación donde sus resultados fueron de 22.2% con semen de toros *Bos taurus*. Estos resultados también los presentan Medina et al., (2002) donde los valores de producción embrionaria fueron de 26,3% y 28,8% de dos toros diferentes, pero se contradicen a los resultados de la investigación de Palma et al., (2007) ellos encuentran un porcentaje de producción de blastocistos del 33,6%, Presicce et al., (2011) de 39.8% y Dayan (2001) 36.2%. Sin embargo, Urrego et al., (2008) muestra una tasa inferior de embriones que los resultados encontrados en esta investigación que van desde un 18 a 20%.

## V. CONCLUSIONES

La mayor producción total de embriones in vitro en los estadios de blastocistos iniciales (Bi), blastocistos (Bl) y blastocistos expandidos (Bx) se obtuvo con el uso del semen del ejemplar JTRM 27.86%, frente al uso del semen del ejemplar VTRM 23.86%. Finalmente la variación epigenética estadísticamente significativa en la producción de embriones in vitro difiere en 4%.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barth, A. (1992). *The relationship between sperm abnormalities and fertility*. In: Proceedings 14th Technical Conference on Artificial

Insemination and Reproduction, 47–63

Bonilla, L.; Mejía, A.; Gómez, R.; Torres, M.; Uribe, F. (2018). *Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos in vitro a partir de semen sexado comparado con semen convencional en Bos taurus y Bos indicus*. Rev Inv Vet Perú, (4) 1377- 1385

Casas, A.; Cianzio, D.; Rivera, A.; Cantisani, L.; Añeses, L. (2001). *Estimación de la edad del ganado vacuno por sus incisivos*. Estación Experimental Agrícola, (299) 1-6.

Correa, J.; Pace, M.; Zavos, P. (1997). *Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program*, Theriogenology (48) 721–731.

Dayan, A. (2001). *Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro*. Tese magistral.

De Loos, F.; Van Maurik, P.; Van Beneden, T.; Kruip, A.M. (1992). *Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro*. Mol. Reprod. Dev, (31) 208-214.

Gonzales, A.; Díaz, A. y Díaz-Anzaldúa, A. (2008). *La epigenética y los estudios en gemelos en el campo de la psiquiatría*. Salud Mental, (31) 230.

Hirao, K. (1975). *A multiple regression analysis on six measurements of bovine semen characteristics for*

- fertility. *Int. J. Fertil*, (20) 204–208.
- Holt, W.V.; Brienj, O.; Abaigar, T. (2007). *Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research*. *Reproduction, Fertility and Development*, (19) 709–718.
- Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Soderquist Y.L.; Rodríguez-Martínez, H. (2000). *Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull*. *Theriogenology*, (53) 859–875.
- Kjaestad, H.; Ropstad, E.; Andersen Berg, K. (1993). *Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen*. *Acta Vet. Scand*, (34) 299–303.
- Loneragan, P.; Fair, T.; Corcoran, D.; Evans, A. (2006). *Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos*. *Theriogenology*, (65) 137–152.
- Medina, M.; Cattaneo, L.; Caballero, J.; Cerrate, H.; Panarace, M.; Ferré, L.; Dalla, M. (2002). *Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro*. *Taurus*, (13) 4–8.
- Palmer, E.; Bezar, J.; Magistrini, M.; Duchamp, G. (1991). *in vitro in the horse. A retrospective study*. *J. Reprod. Fertil*, (44) 375–384.
- Perez, L.; Valcarcel, A.; De Las Heras, M.; Baldassarre, H. (1997). *Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples*, *Reprod. Domest. Anim* (32) 157–160.
- Presicce, G.A.; Jiang, S.; Sinkin, M.; Yang, X. (2011). *Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves*. *Biology of Reproduction*, (52) 127.
- Quintero, A.; Mayorga, J.; Cardona, W. (2017). *El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros*. *Journal of Veterinary Andrology*, ISSN 2542-3045, (2) 31.
- Rizos, D.; Lonergan, P.; Ward, F.; Duffy, P.; Bolland, M.P. (2002). *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*, (61) 234–248.
- Sato, E.; Matsuo, M.; Miyamoto, H. (1990). *Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate*. *J. Anin. Sci*, (68) 1872-1887.
- Shamsuddin, M.; Larsson, B. (1993). *in vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors*. *Reprod. Domest. Anim*, (28) 77–84.
- Shi, D.; Lu, K.; Gordon, I. (1990). *Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro*. *Theriogenology*, (33) 324.
- Urrego, R.; Tarazona, A.; Olivera, M.; Camargo, O. (2008). *Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos*. *Rev. Col. Cien. Pec.*, (3) 398-405.
- Zhang, B.; Larsson, B.; Lundeheim, N.; Rodríguez-Martínez, H. (1998). *Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls*. *Int. J. Androl*, (21) 207–216.