

## TIEMPO A PRIMERA DIVISIÓN EMBRIONARIA IN VITRO PUEDE PREDECIR LA CAPACIDAD DE DESARROLLO A BLASTOCISTO EN BOVINOS

### Timing of the first cleavage of in vitro fertilized embryos can predict the ability of blastocyst development in bovine

Edwin Mellisho<sup>1</sup>; Fidel O. Castro<sup>1</sup>; Lleretny Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Ciencias Pecuarias, Universidad de Concepción, Chillan, VIII Región, Chile.

\* Corresponding author  
Av. Vicente Méndez 595, Casilla 537 Chillán – Chile;  
Telf: 0056.42.2208899

E-mail: emellisho@udec.cl

#### ABSTRACT

Bovine embryos that rapidly reach the two-cell stage have higher probabilities of becoming viable blastocysts. Our objective was to evaluate the effect of time of the first embryonic division on the development rate of bovine blastocysts produced in vitro and also to determine embryo viability by differential staining of living and dead blastomeres. In vitro embryos divided at 36h (early) and 48h (late) post fertilization were separated and in vitro cultured for the remaining time (up to 7 days). Blastocyst rates from the groups of embryos divided in two-cells at 36h and 48h, corresponding to three repetitions, were 38.7% and 23.2%, respectively, showing statistically significant differences ( $p=0.0168$ ). However, the proportion of living cells assessed by differential staining of the 36h and 48h groups were 93.7% and 88.2%, respectively, showing no significant differences. Although the results indicate that an early embryo splitting favors a high rate of blastocysts, separation management of the embryos causes stress reducing the total number of blastocysts compared to our control group without separation of embryos two-cell.

**Keywords:** in vitro embryos, blastocysts, bovine, differential staining.

#### RESUMEN

Los embriones bovinos que se dividen rápidamente tienen una probabilidad mayor de desarrollar a blastocisto. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del tiempo a la primera división embrionaria en la tasa desarrollo a blastocistos producidos in vitro en bovinos y determinar su viabilidad embrionaria por tinción diferencial (vivos/muertos). Los embriones in vitro divididos a 36h (temprano) y 48h (tardía) post fecundación fue separados y cultivados in vitro por el tiempo restante a (7 días de cultivo) Las tasas de blastocistos a partir de los grupos de 2 células separados a las 36h y 48h (tres repeticiones) fueron 38.7% y 23.2%, respectivamente; diferencias estadísticas significativas ( $p=0.0168$ ). Sin embargo, la proporción de células vivas evaluada por tinción diferencial de los grupos de 36h y 48h fue 93.7% y 88.2%, respectivamente, no representando diferencias significativas. A pesar de que los resultados indican que una temprana división embrionaria favorece la alta tasa de blastocistos, el manejo de separación de los embriones causa estrés, reduciendo el número de blastocistos totales comparado a nuestro grupo control sin separación de embriones divididos.

**Palabras clave:** embriones in vitro, blastocistos, bovino, tinción diferencial.

## INTRODUCCION

El tiempo de la primera división embrionaria post inseminación tiene un efecto muy importante en la capacidad de desarrollo a blastocisto y puede ser un buen indicador de la viabilidad de embriones destinados a transferencia a receptoras (Dinnyes et al., 1999; Lechniak et al., 2008; Orozco-Lucero et al., 2014).

En humanos, varios estudios han demostrado que los embriones divididos (2 células) tempranamente tienen significativamente mayor número de células y una mejor viabilidad en comparación con los divididos tardíamente (Salumets et al., 2001; Fenwick et al., 2002). Sin embargo, en ninguna especie, se ha definido si la primera división es un predictiva de la tasa de preñez o si está correlacionado con otras variables como la morfología del blastocisto y el número de células.

En el presente estudio, nuestro objetivo fue; a) Evaluar el efecto del tiempo a la primera división embrionaria en la tasa de desarrollo a blastocistos producidos in vitro en bovinos y b) Determinar la viabilidad embrionaria por tinción diferencial de blastocistos divididos tempranamente (36 h) o tardíamente (48h) post inseminación.

## MATERIALES Y METODOS

### Producción in vitro de embriones bovinos

La recuperación de ovocitos de ovarios de matadero, seguido por maduración, fecundación y cultivo in vitro fue realizado de acuerdo a estandarización técnica de nuestro Laboratorio de Biotecnología Animal, UDeC (Velasquez et al. (2013).

Los procedimientos se realizaron en placas de cultivo de 4 pozos con una densidad de 40 ovocitos por pozo en 500ul de medio y cubiertos con 300 ul de aceite mineral y cultivados en 5% CO<sub>2</sub> en aire, 38,5 °C y humedad > 90%. Se utilizaron espermatozoides en una concentración final de 2.7 x 10<sup>6</sup> motiles/ml seleccionados con sistema Percoll 45/90.

### Capacidad de desarrollo a blastocisto de embriones separados al alcanzar el estado de 2 células.

Durante los 7 días de cultivo, los embriones de 2 células fueron distinguidos en base al momento de la primera división embrionaria. Se observaron en dos momentos, en cada punto se separaron los embriones divididos tempranamente (36 horas post fecundación) y tardíamente (48h) en pozos de 500ul de medio de cultivo independiente, utilizando pipetas de vidrio estiradas con un mínimo volumen. Continuando el tiempo de cultivo de 7 días restante a los dos grupos, independiente al tiempo de separación de los embriones divididos

### Determinación de viabilidad embrionaria por tinción diferencial.

Los blastocistos fueron incubados a 37 °C por 1 a 3 minutos en microgota de 50 µl de 0.1mg/ml de solución Pronasa en medio PBS con 1mg/ml de PVP para remover la zona pelúcida

parcialmente. Inmediatamente después los blastocistos fueron transferidos a solución de tinción [1ml PBS + 1 mg/ml polivinilpirrolidona (PVP) y 4 µl de propidio iodado (PI, 2.5mg/ml) y 1 µl Hoechst 33342 (40 µl/ml)] por 15 min a 37 °C en oscuridad. Los blastocistos fueron lavados previo a ser fijados para evaluar la tinción diferencial en un microscopio de fluorescencia. El protocolo se desarrolló de acuerdo recomendaciones de Yavin et al. (2009).

### Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos fueron evaluadas estadísticamente con análisis de chi-cuadrado con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## RESULTADOS

### Capacidad de desarrollo a blastocisto, separando embriones dividido a 2 células.

La tasa de división embrionaria antes de 48h post inseminación fue de 53.9% (231/429). Las tasas de blastocistos a partir de los grupos de embriones de 2 células separados a 36h y 48h post inseminación fue 38.7 (36/93) y 23.2% (32/138), respectivamente, presentando diferencias estadísticas significativas ( $p=0.0168$ ), correspondiente a tres repeticiones. Se observó que la tasa de blastocistos total en este trabajo fue menor en 10% a otras repeticiones de procedimiento in vitro sin manipulación que implica la separación de embriones a 36 y 48h.

### Determinación de viabilidad embrionaria por tinción diferencial.

La proporción de células vivas evaluada por tinción diferencial de grupos de 36h y 48h post inseminación fue 93.7 y 88.2%, respectivamente, no presentando diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

## DISCUSION

La primera división del cigoto involucra una previa fecundación exitosa que incluye varios procesos como penetración espermática, activación del ovocito, formación del pronúcleo y reorganización de la cromatina del nuevo individuo (Lechniak et al., 2008).

En nuestro trabajo los resultados muestran que los embriones que se dividen tempranamente (36h) tienen una alta probabilidad (38.7 vs 23,2%) de desarrollar a blastocisto, similares resultados son reportados por Dinnyes et al. (1999; Lechniak et al. (2008) y Orozco-Lucero et al. (2014). Sin embargo, el momento preciso que involucra reconocer la primera división embrionaria es difícil de establecer, sin causar estrés térmico/presión de gases/pH, etc. Por lo que, el uso de sistema de video continuo en cultivo individual de embriones podría permitir conocer la cinética del desarrollo embrionario temprano en bovinos.

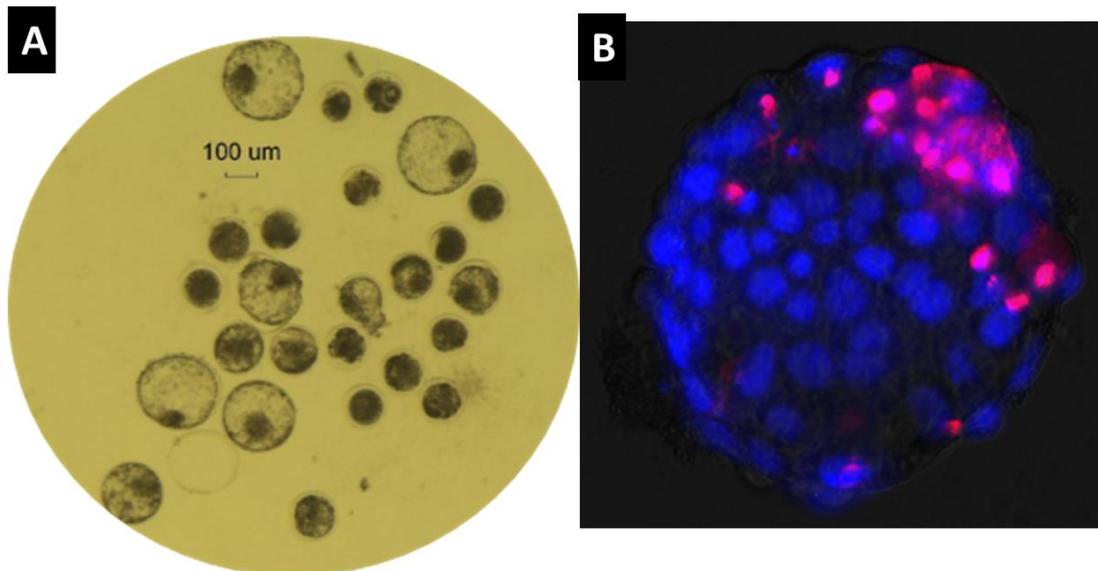


Figura 1: a) Blastocistos de 7 días de cultivo in vitro, grupo divididos tempranamente a 36 hpi y b) Blastocisto expandido con tinción diferencial vivos/muertos, grupo divididos tardíamente a 48hpi.

## CONCLUSION

Una temprana división embrionaria (2 células) favorece al desarrollo de alta tasa de blastocistos, 7 días en cultivo in vitro en bovinos.

## CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflictos de intereses.

## CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Concepción y diseño del estudio (EM), desarrollo de la metodología (EM), escribe, y revisa el artículo (EM, LLR, FOC) y supervisión del estudio (FOC.).

## REFERENCIAS

- Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X. Timing of the First Cleavage Post-Insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*. 1999; 53:318–324.
- Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproductive Biology*. 2008; 88(1):23-41.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*. 2001; 16:2652–2657.
- Orozco-Lucero E, Dufort I, Robert C, Sirard MA. Rapidly Cleaving Bovine Two-Cell Embryos Have Better Developmental Potential and a Distinctive mRNA Pattern *Molecular Reproduction & Development*. 2014; 81:31–41.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod*. 2001; 16:2177–2181.
- Velásquez AE, Manríquez JR, Castro FO, Rodríguez LL. Effect of zona pellucida removal on early development of in vitro produced bovine embryos. *Arch. med. vet*. 2013; 45(1): 7-15.
- Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human reproduction*. 2009;24(4):797-804.