

Artículo de investigación

In vitro* embryo production from cumulus–oocyte complexes type II in *Bos indicus* cattleProducción in vitro de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus***Produção in vitro de embriões de cumulus oócito complexo de tipo II de bovinos *Bos indicus**Isabel Catalina Velez¹ ✉, MVZ, MSc, DACT, [CVLAC](#); Alfredo Chica², MVZ; Rodrigo Urrego², Zoot, MSc, PhD, [CVLAC](#); Viviana Torres³, Ing Biol, MSc; Claudia Jimenez-Escobar¹, MV, MSc, DVSc, DACT, [CVLAC](#); Jorge Zambrano-Varon^{1*}, MV, MPVM, PhD, DACT, [CVLAC](#)**Fecha correspondencia:**

Recibido: 6 de junio de 2017.

Aceptado: 25 de agosto de 2017.

Forma de citar:Vélez IC, Chica A, Urrego R, Torres V, Jimenez-Escobar C, Zambrano-Varon J. Producción *in vitro* de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. Rev. CES Med. Vet. Zoot. Vol 12 (2): 76-87.Open access© CopyrightCreative commonsEthics of publicationsPeer reviewOpen Journal SystemDOI: [http://dx.doi.org/10.21615/](http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.1)[cesmvz.12.2.1](#)

ISSN 1900-9607

Filiación:¹ Grupo de investigación Reproducción y Salud de Hato, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Comparte

**Abstract**

The morphological selection of cumulus-oocyte complexes (COCs) is an important step for *in vitro* embryo production. It has been suggested that COC showing signs of atresia have the ability to generate embryos. The objective of this work was to evaluate the effect of COC morphology from *Bos indicus* animals with signs of early atresia versus no signs of atresia on *in vitro* embryo production. COC were classified in: Type I (TI): homogeneous ooplasm with ≥ 4 layers of compact cumulus cells (CC) and Type II (TII): granular ooplasm and ≥ 4 layers of CC slightly expanded. The COC were matured *in vitro* for 24 hours in TCM199 medium and subsequently fertilized *in vitro* for 18 h. The suspected zygotes were cultured *in vitro* for seven days in modified SOFaa medium. Embryonic quality was determined by blastomeric count following staining with Hoechst 33342. Student test was used to determine statistical differences for cleavage, blastocyst rate and blastomeric counts between types of COC. The cleavage rate for TI ($n = 220$) and TII ($n = 161$) was $88 \pm 4\%$ and $89 \pm 8\%$ respectively ($p > 0.05$); embryo development rate was $36 \pm 7\%$ and $33 \pm 8\%$ ($p > 0.05$) respectively. The blastomeric count for both groups was 101 and 104 cells for TI and TII respectively ($n = 10$), ($p > 0.05$). These results demonstrate that there is no difference in the quantity and quality of embryos produced *in vitro* using COC type I or type II, suggesting that both types could be used for bovine *in vitro* embryo production in *Bos indicus* cows.

Keywords: *atresia, competence, cumulus-oocyte complex.***Resumen**

La selección morfológica de los complejos cúmulo-oocito (COC) es crucial para la producción de embriones *in vitro*. Se ha sugerido que COC que muestran signos de atresia poseen capacidad de generar embriones. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la morfología de los COC provenientes de animales *Bos indicus* con signos de atresia temprana y sin signos de atresia sobre la producción de embriones *in vitro*. Se clasificaron COC obtenidos de ovarios de faenado en dos grupos: Tipo I (TI): ooplasma homogéneo con ≥ 4 capas de células del cumulo (CC) compactas y Tipo II (TII): ooplasma

²Grupo INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colombia.

³Grupo de investigación Biogem, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

granular y ≥ 4 capas de CC ligeramente expandidas. Los COC fueron madurados por 24 horas en medio TCM199 y posteriormente fueron fertilizados *in vitro* durante 18 h. Los presuntos cigotos se cultivaron *in vitro* por siete días en medio SOF modificado. La calidad embrionaria se determinó por conteo de blastómeras posterior a tinción con Hoechst 33342. Se usó la prueba t para determinar diferencias estadísticas. La tasa de clivaje para los COC, TI (n=220) y TII (n=161), fue $88 \pm 4 \%$ y $89 \pm 8 \%$ respectivamente ($p > 0,05$); la tasa de desarrollo embrionario fue $36 \pm 7 \%$ y $33 \pm 8 \%$ ($p > 0,05$) respectivamente. El conteo de blastómeras para ambos grupos fue de (TI:101, TII:104) (n=10), ($p > 0,05$). Los resultados de este trabajo permiten concluir que no hay diferencia en la cantidad y calidad de embriones producidos *in vitro* utilizando COC tipo I o tipo II, sugiriendo que ambas calidades podrían ser usadas en la producción de embriones *in vitro* a partir de animales *Bos indicus*.

Palabras clave: atresia, competencia, complejo cumulo-oocito.

Resumo

A seleção morfológica dos complexos cumulus-oócito (COC) é crucial para a produção *in vitro* de embriões. Relata-se que COC que apresentam sinais de atresia têm a capacidade de gerar embriões. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito morfológico dos COC de animais *Bos indicus* com sinais de atresia precoce ou sem sinais de atresia sobre a produção *in vitro* de embriões. COC obtidos de ovários de animais abatidos foram classificados em dois grupos: tipo I (TI): ooplasma homogêneo com ≥ 4 camadas de células do cóculo (CC) compactos e Tipo II (TII): ooplasma granular e ≥ 4 camadas CC levemente expandidas. Os COC foram submetidos à maturação por 24 horas em meio TCM199 e depois fertilizados *in vitro* por 18 h. Os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* por sete dias em meio SOFaa modificado. A qualidade embrionária foi determinada pela contagem dos blastômeros após coloração com Hoechst 33342. O teste t foi utilizado para determinar diferenças estatísticas significativas. A taxa de clivagem para os COC TI (n = 220) e TII (n = 161) foi de $88 \pm 4 \%$ e $89 \pm 8 \%$, respectivamente ($p > 0,05$); a taxa de desenvolvimento embrionário foi de $36 \pm 7 \%$ e $33 \pm 8 \%$ ($p > 0,05$), respectivamente. E a contagem de blastômeros para ambos os grupos foi (TI: 101, TII: 104) (n = 10) ($p > 0,05$). Com base nos resultados deste trabalho conclui-se que não existe diferença na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, utilizando COC tipo I ou tipo II, sugerindo que ambas as qualidades podem ser utilizadas na produção *in vitro* de embriões em animais *Bos indicus*.

Palavras-chave: atresia, complexo cumulo-oocito, a concorrência.

Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una herramienta biotecnológica de uso comercial que permite aumentar la eficiencia reproductiva en las hembras. Los reportes indican que el uso de la PIVE ha venido creciendo de manera considerable en los últimos años, según la *International Embryo Technology Society* (IETS) en su informe anual de datos recogidos a nivel mundial, durante el año 2015 reportó 630.202 embriones producidos *in vitro* y transferidos, en contraste a los resultados del año 2001 en donde se transfirieron 109.205 embriones. Lo que representa un incremento alrededor del 500 %, evidenciando una mayor demanda de esta biotecnología¹⁻³.

A pesar de la gran acogida de esta técnica y a la optimización que se tiene hoy en día de la PIVE, solo alrededor del 20-30 % de los oocitos recuperados de hembras bovinas pueden llegar a convertirse en embriones transferibles, lo que podría deberse

en parte a la utilización de oocitos con una baja competencia⁴⁻⁸. Se ha descrito que la calidad de los oocitos se ve afectada principalmente por sus propiedades intrínsecas, como la capacidad de almacenamiento de biomoléculas que permiten su desarrollo posterior⁵⁻⁷, y parece además, que la evaluación de la morfología, la cuál ha sido comúnmente utilizada para la selección de los COC, no ha demostrado ser el método más exacto para predecir la capacidad de desarrollo. Por lo tanto, en la actualidad, es aún necesario el desarrollo de un método fiable y no invasivo que permita mejorar la selección de oocitos competentes, por ello sigue siendo un tema de gran importancia en las técnicas de reproducción asistida⁹.

Del mismo modo, en los sistemas de PIVE se han implementado diferentes protocolos y metodologías con el propósito de mejorar los resultados obtenidos, pero aún los resultados siguen siendo variables¹⁰. Por esto, una de las mayores dificultades para mejorar la eficiencia de los programas de fertilización *in vitro* ha sido la falta de un método objetivo que permita una mejor selección de los oocitos orientada a incrementar las tasas de producción de embriones transferibles¹¹.

La técnica utilizada rutinariamente para la selección de los oocitos está basada en la evaluación de la apariencia morfológica y posterior clasificación de los COC^{12,13}. La metodología clásica ha definido cuatro tipos de COC dependiendo del número de capas de células del cúmulo y la homogeneidad del ooplasma (Tipo I: > 4 capas y ooplasma homogéneo, Tipo II: 1-3 capas y/o ooplasma menos homogéneo, tipo III: desnudo y/o ooplasma no homogéneo, y Tipo IV: cúmulo expandido)¹². Los COC Tipo IV son considerados de baja competencia y en estado de degeneración ya que han mostrado no solo más baja capacidad de desarrollo¹² sino menor síntesis de RNAs y proteínas¹⁴. Los oocitos Tipo III carecen de células alrededor de la zona pelúcida lo cual impide una buena capacidad de desarrollo ya que se ha demostrado que las células del cúmulo proveen al oocito de metabolitos como mRNA, microRNAs y moléculas de bajo peso que permiten su desarrollo normal¹⁵.

Los oocitos con un cúmulo compacto compuesto de varias capas de células del cúmulo y un citoplasma homogéneo son considerados aptos; para la maduración y fertilización *in vitro*¹². Algunos autores han examinado la capacidad de desarrollo de los oocitos bovinos con base a su morfología y han revelado que los COC que muestran signos tempranos de atresia (por ejemplo, ligera expansión del cúmulo y ligera granulación del citoplasma) tienen mayor potencial de desarrollo embrionario *in vitro* que los considerados como morfológicamente aptos^{16,17}, con tasas de blastocistos superiores para los COC con células del cúmulo expandidas (19 %) comparado con aquellos completamente compactas (13.9 %) ¹⁶.

Como se puede observar aún existe ambigüedad con relación a cuáles son los COC morfológicamente ideales para ser utilizados en la producción *in vitro* de embriones bovinos. Por ende, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la morfología de los COC con signos de atresia temprana sobre las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos *Bos indicus*.

Materiales y métodos

Aval de ética

Para la realización de la presente investigación se cumplió con las normas nacionales e internacionales de bioética en la investigación con animales del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y las normas de

buenas prácticas en investigación con animales de laboratorio. Para el experimento se obtuvo el aval del comité de ética de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, acta número CB-044 del 17 de junio del 2015.

Colección y selección de los COC

Se realizó un estudio con diseño experimental. En el cual se colectaron ovarios de hembras de faenado *Bos indicus* los cuales fueron puestos en solución salina estéril a una temperatura de 30 °C, y transportados al laboratorio para la posterior obtención de oocitos para la PIVE¹⁸.

Aquellos folículos de 3-8 mm fueron aspirados utilizando una jeringa de 10ml acoplada a una aguja calibre 18g, el aspirado folicular fue recogido en tubos cónicos de 50 ml, este contenido se dejó decantar por 10 min. Posteriormente, Los COC fueron colocados en una caja de Petri con ayuda de una pipeta Pasteur para su posterior localización y selección. Los ovarios y los COC fueron mantenidos durante el proceso de colección a 30 grados centígrados utilizando un baño de María¹⁹.

Los COC fueron seleccionados utilizando un estéreo microscopio de disección (Nikon SMZ445) con magnificación 200X y clasificados como oocitos Tipo I (≥ 4 capas de células del cúmulo y ooplasma homogéneo) y Tipo II (≥ 4 capas de células del cúmulo con expansión en las células más externas y ooplasma menos homogéneo, lo cual representa signos de atresia temprana)²⁰ (Figura 1). Para asegurar repetitividad de la clasificación de los oocitos se hicieron tres subgrupos de 20 oocitos por cada grupo de clasificación con cuatro replicas biológicas.

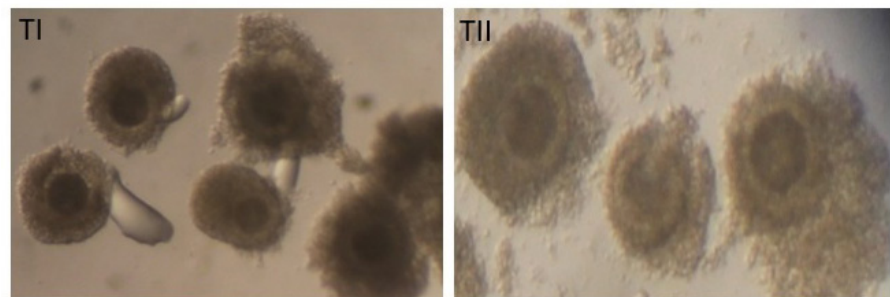


Figura 1. Tipos morfológicos de complejos cúmulo-oocitos seleccionados para el experimento. TI: COC tipo I: ≥ 4 capas de células del cúmulo y ooplasma homogéneo, TII: COC TII: ≥ 4 capas de células del cúmulo con expansión en las células más externas y ooplasma menos homogéneo.

Producción de embriones *in vitro*

La metodología utilizada para la producción *in vitro* de embriones ha sido previamente descrita¹⁸. Brevemente, los COC fueron lavados tres veces en medio TCM199/HEPES suplementado con gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los subgrupos de 20 COC de cada categoría fueron sometidos a maduración *in vitro* en medio TCM199 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 0,2 mM de piruvato de Na, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH cubierto con aceite mineral e incubados en 5 % CO_2 y 90 % de humedad y 38,2°C por 24 h. El medio de maduración fue gasificado en la incubadora (HERACell™ 150i) mínimo 2 h antes de su uso²¹.

Veinticuatro horas después de la maduración los COC fueron lavados en medio de fertilización Fert-TALP suplementado con 0,6 % de BSA (albúmina libre de ácidos grasos), 0,2 mM de piruvato de Na, 50 µg/ml de gentamicina, 30 µg/ml de heparina, PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM hipotaurina y 250 mM epinefrina) previamente gasificado durante 2 h y transferidos a gotas de 50 µl cubiertas con aceite mineral²². Para la fertilización, se utilizó semen congelado de un toro *B. indicus* con fertilidad probada para *in vitro*. Por sesión de fertilización, una pajilla fue descongelada en baño de maría a 37 °C, luego los espermatozoides fueron centrifugados (Eppendorf 5810) en un gradiente de Percoll (90-45 %) a 600 g por 15 min. El pellet fue reconstituido en medio de fertilización y centrifugado una vez más a 600 g por 5 min para retirar completamente el Percoll.

Después de la centrifugación de lavado, el pellet fue reconstituido nuevamente en medio Fert-TALP obteniendo una concentración de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides por ml para la fertilización. Las gotas conteniendo 20 COC y espermatozoides fueron incubados por 18 h en un ambiente controlado de 5 % CO₂ y 90 % de humedad y 38,2 °C²³. Posterior a las 18 h de coincubación, se retiraron los detritos celulares por medio de pipeteo manual dentro de la gota de fertilización y los presuntos cigotos fueron lavados tres veces en medio SOF modificado (mSOF) suplementado con 20 mM de HEPES y cultivados en gotas de 100 µl en medio mSOF suplementado con 50 µl de gentamicina y 5 % de SFB sin HEPES, por siete días en 5 % CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de humedad y 38,2 °C. La tasa de clivaje se determinó el tercer día del cultivo (fertilización considerado día 0) y el medio fue renovado en un 50 % cada segundo día a partir del día tres de cultivo. Al séptimo día se determinó la tasa de blastocitos producida para cada grupo²³.

Evaluación de la calidad embrionaria

Un total de diez blastocistos en el día 7 de cultivo de cada grupo de oocitos tanto Tipo I como Tipo II fueron sometidos a la tinción fluorescente (Hoechst 33342)²⁰. Al día siete los blastocistos se colocaron en la solución de tinción Hoechst a una concentración de 1:200. Los embriones se incubaron durante 10 minutos en la solución de tinción y fueron protegidos de la luz, luego fueron retirados de la solución de tinción y lavados en PBS tres veces²⁴. Los blastocistos teñidos se montaron en portaobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i) a una magnificación de 400X, de cada blastocisto se tomaron microfotografías para luego determinar el número de blastómeras utilizando el programa ImageJ v 1,45²⁵ para así determinar diferencias en la calidad embrionaria según el tipo de COC.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva, determinándose las desviaciones estándar para la media de la tasa de clivaje, la tasa de blastocistos y el número de blastómeras por tipo de COC. La comparación de medias de ambos grupos de COC se analizó por medio de una prueba t de dos muestras utilizando SYSTAT v 13.1. Los datos se presentan como porcentajes (media ± EEP) todo valor $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

Producción *in vitro* de embriones de COC Tipo I y Tipo II

Un total de $n = 381$ COC fueron utilizados para este estudio, los cuales según su morfología fueron divididos en dos grupos y clasificados como Tipo I y Tipo II. La tasa de clivaje fue de 88 ± 4 % y 89 ± 8 % y la tasa de blastocistos al día 7 de cultivo fue de 36 ± 7 % y 33 ± 8 % para los COC tipo I y tipo II respectivamente. En este estudio no se encontraron

diferencias estadísticas entre las tasas de clivaje ($p > 0,50$) y desarrollo embrionario en ambos grupos ($p > 0,5$), indicando que los tipos de COC seleccionados poseen una capacidad similar de desarrollo embrionario (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de clivaje y de blastocistos producidos *in vitro* de COC TI y TII.

Grupos	COC (n)	Tasa de clivaje (%) (Promedio \pm S.E.M.) ($p = 0,3$)	Tasa de blastocistos (%) (Promedio \pm S.E.M.) ($p = 0,4$)
Tipo I	220	88 \pm 4	36 \pm 7
Tipo II	161	89 \pm 8	33 \pm 8

No se encontraron diferencias significativas $p > 0,05$.

Calidad embrionaria

Los datos del conteo de las blastómeras para ambos grupos de embriones se pueden apreciar en la figura 2. Se contaron 101 blastómeras para los blastocistos provenientes de COC TI y 104 para los blastocistos de COC TII. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de blastómeras de los embriones provenientes de los dos tipos de COC seleccionados en el estudio, indicando que el tipo de COC (TI y TII) no afecta el número de las blastómeras encontradas en los blastocistos.

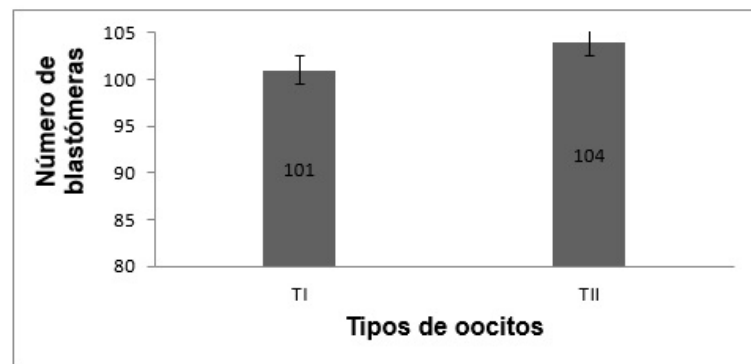


Figura 2. Conteo de blastómeras para embriones de COC TI y TII.

En la figura 3 se muestran los embriones de ambos tipos de COC teñidos con fluorocromo Hoechst 33342 utilizada para evaluar la calidad embrionaria basado en el conteo de blastómeras totales del embrión.

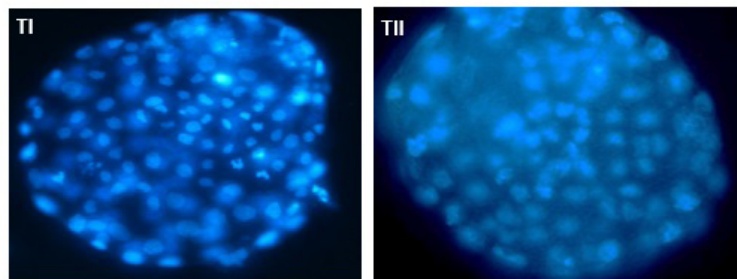


Figura 3. Microfotografía a 400X de blastocistos al día 7 de cultivo *in vitro* con tinción Hoechst 33342 de COC TI: tipo I y TII: tipo II. En azul se observa el DNA nuclear de las blastómeras de los embriones

Discusión

En los procesos de producción de embriones *in vitro* la competencia del oocito es generalmente definida como la capacidad que posee el gameto femenino de madurar, ser fertilizado, desarrollarse hasta el estado de blastocisto, para finalmente generar un descendiente normal y saludable²⁶. La morfología de los COC se ha utilizado como un parámetro de selección de calidad de los oocitos ya que parece existir una relación entre la morfología y el desarrollo competente²⁷.

Algunos estudios realizados en *B. taurus*, han mostrado que COC con signos de atresia temprana determinada por su aspecto morfológico (leve expansión de las células del cúmulo periféricas y ooplasma granulado) parecen tener la misma o mejor capacidad de desarrollo que los considerados morfológicamente normales^{13, 18, 28}, aunque actualmente el dogma y el proceder durante los procedimientos de PIVE consiste en incluir solamente los oocitos con cúmulo compacto y ooplasma homogéneo denominados como morfológicamente normales²⁹⁻³¹ dejando atrás posiblemente COC competentes que si fueran incluidos podrían aumentar el número de COC que entran a los programas de PIVE y por ende las posibilidades de mejorar las tasas de producción de blastocistos de dichos programas. El presente estudio permitió evaluar el efecto de la morfología de los COC con signos de atresia temprana sobre las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos *B. indicus*.

En este estudio se observó que los oocitos provenientes de los COC Tipo I (morfológicamente saludables) y Tipo II (con atresia temprana) no tuvieron diferencias estadísticas con relación a la tasa de clivaje, el desarrollo embrionario y el conteo de blastómeras determinado por medio de la tinción con Hoechst. Ambos tipos de COC poseen la misma capacidad de desarrollo para producir embriones. Estos hallazgos coinciden con otros reportes en donde se evidenció que los COC que muestran los signos de atresia temprana como una ligera expansión del cúmulo y una ligera granulación del citoplasma tienen mayor o igual potencial de desarrollo que los que se consideran morfológicamente idóneos^{9, 17, 21, 28}. Llegando a la conclusión de que existe una relación positiva entre la atresia temprana y la competencia del oocito ya que se ha evidenciado una mejor tasa de maduración y de blastocistos para COC con cúmulo con expansión temprana y ooplasma granular comparado con COC con cúmulo compacto y ooplasma homogéneo^{13, 32}.

Nuestros resultados permiten avanzar en el conocimiento sobre la relación existente entre la morfología de los COC y la capacidad de su desarrollo *in vitro*. Aziz y colaboradores reportaron que la apoptosis temprana en CC de oocitos inmaduros bovinos está asociada a competencia oocitaria, ya que no encontraron diferencias en la capacidad de maduración *in vitro* entre COC con diferentes grados de apoptosis en las células del cúmulo determinado por medio de tinción con connexina-V³². En cuanto a la capacidad de desarrollo embrionario, Li y colaboradores clasificaron los COC en cuatro grupos según características morfológicas; las tasas de clivaje y de blastocistos fueron superiores para COC con ooplasma granular, comparado con los COC con ooplasma homogéneo²¹. De manera similar, en otro estudio realizado por Bilodeau-Goeseels y Panich, también se reportaron mayores tasas de blastocistos para aquellos oocitos con signos de atresia temprana (granulación del ooplasma y expansión de las células del cúmulo) en comparación con aquellos compactos y con ooplasma homogéneo¹⁷, de igual manera que lo reportaron Blondin y Sirard . Los hallazgos reportados en el presente estudio concuerdan con lo reportado por otros autores, indicando que quizá los signos de atresia temprana no reflejan menor competencia oocitaria como se había reportado¹². Puede ser que los signos de atresia

temprana reflejan una expresión de genes y almacenamiento de biomoléculas necesarios para el posterior desarrollo embrionario que los hacen más competentes y por ende más idóneos para la PIVE; lo cual ratifica que los oocitos denominados Tipo II (con signos de atresia temprana) podrán ser utilizados para la producción *in vitro* de embriones ya que se obtienen resultados similares o quizá mejores que los obtenidos utilizando solamente los COC Tipo I (sin signos de atresia).

Como soporte de esta idea, Urrego y colaboradores, reportaron que los oocitos con signos de atresia temprana presentan una mayor competencia evidenciada en una tasa de producción de blastocitos mayor y una mayor expresión relativa del gen MATER, relacionado con competencia oocitaria¹⁸. De igual manera, en un estudio reciente en humanos, donde se reportó una clasificación de competencia oocitaria (gestación vs. no gestación) según un perfil de expresión génica en las CC de COC obtenidos posterior a la inducción de ovulación, se encontró que había un aumento en la expresión de genes que codifican para apoptosis en COC que produjeron gestaciones saludables comparado con aquellos que no desarrollaron una gestación³³. De igual manera, en bovinos también se ha asociado una mayor competencia oocitaria con un perfil de expresión génica relacionado con hipoxia temprana, estrés oxidativo, apoptosis e inflamación inducido por protocolos conocidos como "coasting" con los cuales se realiza una estimulación con FSH seguidos de un periodo de inanición de la hormona³⁴. De esta manera se puede relacionar la atresia temprana, identificada molecularmente con perfiles de expresión génica de apoptosis, con una mayor competencia oocitaria.

Los resultados encontrados en este trabajo donde se utilizaron COC provenientes de hembras *B. indicus*, en conjunto con los resultados reportados por otros investigadores en *Bos taurus* sugieren que los COC Tipo II puede tener igual potencial de desarrollo *in vitro* basados en tasa de clivaje y de blastocistos, que los COC Tipo I, aquellos con ooplasma homogéneo y CC compactas.

De otro lado, en la calidad embrionaria evaluada a través de conteo de blastómeras en los blastocistos obtenidos de cada tipo de COC se encontró que no hay una diferencia estadística significativa en embriones provenientes de COC tipo I o tipo II. El número de blastómeras a los 7 días de cultivo, obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los obtenidos por diferentes grupos de investigación que utilizaron el mismo tipo de tinción para evaluar calidad embrionaria. Bao y colaboradores, encontraron blastocistos con 116 blastómeras en su grupo control en cultivo *in vitro* con interferón tau³⁵, mientras que Santana y colaboradores reportaron 84.6 blastómeras para el grupo control de su experimento³⁶. En este experimento se reportaron blastocistos con 101 blastómeras para COC tipo I y 104 blastómeras para los tipo II los cuales son números de blastómeras reportados como normales para blastocitos bovinos³⁵.

Conclusión

En este estudio se evidenció que los COC con ligera expansión en las células del cúmulo y ooplasma menos homogéneo, con signos de atresia temprana (Tipo II), poseen la misma capacidad de desarrollo que los COC morfológicamente normales (Tipo I). Estos resultados pueden constituir una buena base para revisar los criterios para la selección de los oocitos *B. indicus* para la producción *in vitro* de embriones, permitiendo y fundamentando el uso de oocitos tipo II para producir embriones de similar calidad a los provenientes de oocitos tipo I.

Referencias

1. Perry G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Transfer Newsletter. 2014; 32: 14-26. http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf
2. Thibier M. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. IETS newsletter. 2002; 20 (4): 13-19.
3. Perry g. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. 2013. http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2013.pdf
4. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reproduction in Domestic Animals. 2003; 38 (4): 259-267. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887565>
5. Rizos D, Lonergan P, Boland MP, et al. Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality 1. Biology of reproduction. 2002; 66 (3): 589-595. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/66/3/589/2723791/Analysis>
6. 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. Molecular reproduction and development. 2002; 61 (2): 234-248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560>
7. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression 1. Biology of reproduction. 2003; 68 (1):236-243. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493719>
8. Havlicek V, Lopatarova M, Cech S, et al. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of *in vivo* vs. *in vitro* produced embryos. Vet Med–Czech. 2005; 50 (4):149-157. <http://vri.cz/docs/vetmed/50-4-149.pdf>
9. Warzych E, Pers-Kamczyc E, Krzywak A, Dudzińska S, Lechniak D. Apoptotic index within cumulus cells is a questionable marker of meiotic competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Reproductive biology. 2013; 13 (1):82-87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522075>
10. Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 2005; 24 (1):393. <http://vet.hcmuaf.edu.vn/data/file/application20review.pdf>
11. Iager AE, Kocabas AM, Otu HH, et al. A novel biomarker signature expressed in human cumulus cells predicts oocyte pregnancy potential during Art. Human Reproduction. 2012; 27: ii1-ii3. https://www.researchgate.net/publication/293568921_A_novel_biomarker_signature_expressed_in_human_cumulus_cells_predicts_oocyte_pregnancy_potential_during_ART?ev=prf_high

12. De Loos F, Van Vliet C, van Maurik Pv, Kruip TAM. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete research. 1989; 24 (2): 197-204. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793058>
13. de Wit AA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J Anim Sci. 2000; 78 (5): 1277-1283. <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/78/5/1277?access=0&view=pdf>
14. Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ, Kruip TAM. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. Molecular reproduction and development. 1990; 26 (3): 222-226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2375875>
15. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. Reprod Domest Anim. 2002; 37 (3): 144-151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12071888>
16. de Wit AAC, Kruip TAM. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for α -amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. Animal Reproduction Science. 2001; 65 (1-2): 51-65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182508>
17. Bilodeau-Goeseels S, Panich P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. Anim Reprod Sci. 2002; 71 (3-4): 143-155. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12047924>
18. Urrego R, Herrera-Puerta E, Chavarria NA, Camargo O, Wrenzycki C, Rodriguez-Osorio N. Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. Theriogenology. 2015; 83 (7): 1179-1187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662108>
19. Kussano NR, Leme LO, Guimarães ALS, Franco MM, Dode MAN. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. Theriogenology. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26792377>
20. Velez IC, Ramirez MM, Chica AI, et al. 150 proteome of bovine cumulus cells as related to oocyte morphology and *in vitro* embryo production. Reproduction, Fertility and Development. 2017; 29 (1): 183-183. https://www.researchgate.net/publication/312009043_150_PROTEOME_OF_BOVINE_CUMULUS_CELLS_AS_RELATED_TO_OOCYTE_MORPHOLOGY_AND_IN_VITRO_EMBRYO_PRODUCTION
21. Li HJ, Liu DJ, Cang M, et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. Anim Reprod Sci. 2009; 114 (1-3): 89-98. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008057>
22. Urrego R, Tarazona A, Olivera Ángel M, Camargo O. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2008; 21 (3): 398-405. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902008000300009&lng=es&nr-m=iso

23. Gordon I, Lu KH. Production of embryos *in vitro* and its-impact on livestock production. *Theriogenology*. 1990; 33 (1): 77-87. <http://www.theriojournal.com/article/0093>
24. Haraguchi T, Ding D-Q, Yamamoto A, Kaneda T, Koujin T, Hiraoka Y. Multiple-color fluorescence imaging of chromosomes and microtubules in living cells. *Cell structure and function*. 2001; 24 (5): 291-298. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15216885>
25. Bernal-Ulloa SM, Heinzmann J, Herrmann D, et al. Cyclic AMP affects oocyte maturation and embryo development in prepubertal and adult cattle. *PloS one*. 2016; 11 (2): e0150264. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone>
26. Duranthon V, Renard JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*. 2001; 55 (6): 1277-1289. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327684>
27. Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2000; 54 (5): 741-756. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101035>
28. Blondin P, Sirard M-A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 1995; 41 (1): 54-62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619506>
29. Urrego R, Bernal-Ulloa SM, Chavarria NA, et al. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in *Bos indicus* blastocysts produced *in vivo* and *in vitro*. *Zygote*. 2017: 1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28137339>
30. Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA. Individual bovine *in vitro* embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology*. 2015; 83 (2): 228-237. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25442391>
31. Baldoceda-Baldeon LM, Gagné D, Vigneault C, Blondin P, Robert C. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by vitamin K2 supplementation. *Reproduction*. 2014; 148 (5): 489-497. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161289>
32. Aziz NAA, Osman NA, Bidin H, Embong WK, Hashim NH. Influence of Early Apoptosis Incidence on *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes. *APCBEE Procedia*. 2014; 8: 272-276. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212670814001195>
33. Borup R, Thuesen LL, Andersen CY, et al. Competence classification of cumulus and granulosa Cell transcriptome in embryos matched by morphology and female age. *PloS one*. 2016; 11 (4): e0153562. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone>

Mayo - agosto 2017

34. Nivet A-L, Vigneault C, Blondin P, Sirard M-A. Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine. *Reproduction*. 2013; 145 (6): 555-565. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564726>
35. Bao Z-J, Zhao S, Haq IU, Zeng S-M. Recombinant bovine interferon- τ enhances *in vitro* development of bovine embryos by upregulating expression of connexin 43 and E-cadherin. *Journal of dairy science*. 2014; 97 (11): 6917-6925. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242422>
36. Santana PPB, Carvalho CMF, da Costa NN, et al. Effect of dexamethasone on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2014; 82 (1):10-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656431>