

Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas

Evaluation of embryonic development of bovine oocytes *in vitro* matured and fertilized obtained from crossbred females

F.J. Báez Contreras¹, J.A. Landinez Aponte¹, H.J. Hernández Fonseca² y P.C. Villamediana Monreal^{*1}.

¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Fecundación *In Vitro*, Unidad de Investigación de Biotecnología Animal (UNIBIO), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo, calidad y condiciones de cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro* (PIV). Para ello, se recuperaron los ovarios de hembras mestizas sacrificadas en un matadero comercial. Fueron seleccionados los ovocitos con al menos una capa de células del cumulus y citoplasma homogéneo, para luego ser madurados, fecundados y cultivados *in vitro*. Tras 48 horas post-inseminación (hpi) se determinó la tasa de división embrionaria y a los 7 días de cultivo se valoró el porcentaje de blastocistos. Un grupo de embriones continuaron en cultivo hasta el día 8 para evaluar las condiciones de cultivo sobre el número y calidad de blastómeras. Todos los embriones fueron sometidos a una doble tinción diferencial con Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + yoduro de propidio (IP) (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para determinar el total de blastómeras (azules), consideradas intactas, e identificar las que mostraron membrana alterada (rojas). El porcentaje de división embrionaria a las 48 hpi fue de 62,61%. A los 7 d de cultivo (8d pi), el número de blastocistos fue de 76, equivalente al 18,18%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el número total de células con membrana normal (103,6 \pm 9; 112,2 \pm 13,5) y positivas a IP (4,05 \pm 2,3; 9,8 \pm 6,2) a los 7 y 8 d de cultivo, respecti-

Recibido el 18-7-2009 • Aceptado el 9-3-2010

*¹Autor de correspondencia e-mail: patriciavillamediana@cantv.net

vamente. La calidad de los embriones PIV valorada mediante la tinción diferencial demostró que la mayoría de las blastómeras no mostró alteración de membrana. Es el primer reporte que se realiza sobre PIV de embriones bovinos para la región zuliana.

Palabras clave: blastocisto, bovinos, *in vitro*, calidad embrionaria.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the development, quality and culture conditions of IVP bovine embryos. Ovaries of crossbred females collected in a commercial slaughterhouse were transported to the laboratory. Oocytes with at least one layer of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected, and then matured, fertilized and cultured *in vitro*. After 48 h post-insemination (pih) the cleavage rate and blastocysts rate at day 7 after pi was determined. A group of embryos remained in culture until day 8 to evaluate the culture conditions on the number and quality of blastomeres. All embryos were subjected to a double differential staining with Hoechst 33342 (10 mg.mL^{-1}) + propidium iodide (PI) (10 mg.mL^{-1}) to determine the total number of blastomeres (blue), intact or with altered cell membrane (red). The cleavage rate after 48 pih was 62.61%. Whereas after day 7 of cultivation (8d pi), the number of blastocyst was 76, equivalent to 18.18%. Differences were statistically significant ($P < 0.05$) in the total number of cells with normal membrane (103.6 ± 9 ; 112.2 ± 13.5) and positive IP (4.05 ± 2.3 ; 9.8 ± 6.2) for 7d and 8d of culture, respectively. The quality of IVP embryos measured by double staining demonstrate that most of the blastomeres no alteration cell membrane. This is the first report that for done *in vitro* production (IVP) of bovine embryos from the Zulian region.

Key words: blastocyst, bovine, *in vitro*, embryo quality.

Introducción

En las últimas décadas se han realizado considerables esfuerzos en poner a punto los procedimientos de maduración (De Wit y Kruip, 2001), fecundación (Sagirkaya *et al.*, 2007) y cultivo *in vitro* (MIV-FIV-CIV) para la PIV de embriones bovinos (Pereira *et al.*, 2005). La aplicación a gran escala de estas biotecnologías reproductivas puede representar una mejora notable de los recursos ganaderos al permitir obtener animales con mejores características de impor-

Introduction

Remarkable efforts have been carried out last decades with the purpose of improving the maturation (De Wit and Kruip, 2001), fecundation (Sagirkaya *et al.*, 2007) and *in vitro* culture procedures (MIV-FIV-CIV) for the IVP of bovine embryos (Pereira *et al.*, 2005). The high scale application of these reproductive biotechnologies can represent an improvement of livestock resources because they permit to obtain animals with better characteristics of economic

tancia económica, resolviendo de manera importante el problema de la disponibilidad de alimentos, la conservación y salvaguarda de la variabilidad genética.

Cada vez es más evidente la importancia del componente racial sobre los eventos fisiológicos del embrión y los gametos que le dan origen, y dada la importancia de la ganadería mestiza en el país, a causa de las limitaciones del tipo ambiental y en busca de animales más productivos y rentables en estos ambientes tropicales; se hace prioritario caracterizar la influencia de dicho componente sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos provenientes de hembras mestizas.

Los ovocitos recuperados de ovarios recogidos en matadero se han convertido en una fuente ampliamente usada para las biotecnologías reproductivas entre las que se incluyen además de la producción *in vitro* de embriones, el clonaje y la transgenia. El establecimiento de programas de PIV de embriones bovinos tiene un gran potencial como método para obtener un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo, tanto para su utilización comercial como para estudios básicos (Lonergan y Fair, 2008).

A pesar de haber superado muchas de las dificultades que se presentaron en sus inicios, y de que muchos laboratorios han sido capaces de producir eficientemente embriones *in vitro* (Meirelles *et al.*, 2004), estos presentan un desarrollo y calidad más bajos que los obtenidos *in vivo*. Existen muchos factores que pueden interferir en el desarrollo normal del

importance, solving the feeding availability problem, the conservation and safeguard of genetic variability.

Any time is more evident the importance of race component on physiological events of embryo and gametes gives origin to them, and due to the importance of crossbreed livestock in country, because environmental limitations and also looking for more productive and profitable animals in these tropical environments; it is very important to characterize the influence of this component on capacity of bovine oocytes development coming from crossbreeds females.

Ovocytes taken from ovaries collected in slaughterhouse has become on a widely used source for reproductive biotechnologies that includes besides of *in vitro* production of embryos, cloning and transgenics. The establishment of IVP programs of bovine embryos has a high potential as a method to obtain a high number of embryos in the same development stage, as well commercial use as basic studies (Lonergan and Fair, 2008).

Despite to exceed many of difficulties showed at the beginning, and many laboratories have been capable of producing *in vitro* embryos in an efficient way (Meirelles *et al.*, 2004), these shows a lower development and quality than those obtained *in vivo*. There are many factors that interfere on normal development of embryo, just like cultivation conditions that becomes in detention of cleavage and blocking of four or fifth cellular cycle (Warzych *et al.*, 2007) or in the appearance of blastocysts with altered membranes

embrión, como lo son las condiciones de cultivo, que se traduce en la detención de la división embrionaria y el bloqueo del cuarto o quinto ciclo celular (Warzych *et al.*, 2007) o en la aparición de blastómeras con membranas alteadas (Pomar *et al.*, 2005). Esta falla está directamente relacionada con la competencia para el desarrollo de los embriones en estadio de blastocisto, y no está limitada a los bovinos sino que también persiste en humanos (Chenoweth, 2007).

El desarrollo *in vitro* de embriones ha supuesto una fuente constante de dificultad, particularmente en los embriones producidos por MIV/FIV. Es difícil determinar si el desarrollo deficiente de los embriones es debido directamente a las condiciones de cultivo subóptimas o si es el resultado de una reducción de la competencia para el desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, ya que parece ser que existen factores moleculares, celulares y/o genéticos, intrínsecos al ovocito y/o embrión, que poseerían un papel mucho más significativo en la determinación del potencial de desarrollo que las condiciones de cultivo (Wang *et al.*, 2005; Lonergan, 2006). En muchas situaciones, una reducción en la competencia para el desarrollo y/o condiciones subóptimas de cultivo se combinan para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad (Lonergan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

Los factores críticos para la sobrevivencia de los embriones bovinos son varios y entre ellos se encuentran: la temperatura, luminosidad y

(Pomar *et al.*, 2005). This failure is directly related to the competence for embryos development in blastocyst stage, and it is not limited to bovine but also it is possible to be found in humans (Chenoweth, 2007).

The *in vitro* embryos development supposes a constant difficulty source, particularly in embryos produced by MIV/FIV. It is difficult to determine if deficient embryos development is due to the sub-optimum cultivation conditions or it is the result of a reduction of competence for ovocytes development of mature and *in vitro* fertilized since molecular and/or genetics could be involved, intrinsic to ovocyte and/or to the embryo, that shows a significant role in determination of development potential in comparison to cultivation conditions (Wang *et al.*, 2005; Lonergan, 2006). In many situations, a reduction in competence for development and/or cultivation sub-optimum conditions are combined in order to produce a delay on embryos, abnormalities in development and a reduction of viability (Lonergan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

The critical factors for survival of bovine embryos are several and among them it is possible to find: temperature, luminosity and gaseous atmosphere (Corrêa *et al.*, 2008). Last two decades, substantial improvements about embryo cultivation medium has been registered, based on formulation of ideal concentration of ions, cations and metabolic substrates need for development of pre-implanted embryos (Gilchrist and Thompson,

atmósfera gaseosa (Corrêa *et al.*, 2008). Se han registrado mejoras substanciales de los medios de cultivo de embriones en las dos últimas décadas, basándose en la formulación de la concentración idónea de iones, cationes y sustratos metabólicos necesarios para el desarrollo de embriones preimplantacionales (Gilchrist y Thompson, 2007). La capacidad de los embriones para desarrollarse en un medio en particular no es necesariamente un indicativo de la preferencia del ambiente, en cambio, puede ser simplemente el reflejo de su capacidad para tolerar condiciones artificiales (Duque *et al.*, 2003). Aunque los embriones bovinos pueden ser cultivados *in vitro* en un medio simple bajo condiciones definidas, la suplementación con suero o albúmina sérica bovina (BSA) han demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario.

La literatura concerniente a la calidad de los embriones bovinos cada vez es más abundante (Sirard *et al.*, 2006). Típicamente, los embriones PIV poseen un citoplasma más oscuro y menor densidad como consecuencia de un alto contenido de lípidos, una zona pelúcida más frágil, diferencias en el metabolismo y una alta incidencia en las alteraciones cromosómicas, así como diferencias a nivel ultraestructural que explicarían las características anteriormente nombradas (Lonergan, 2006). Frecuentemente el éxito del sistema de cultivo suele ser medido en función de la tasa de división embrionaria (Shoukir *et al.*, 1997), del número de embriones que alcanzan el estadio de blastocistos (Mucci *et al.*, 2006), ya que esta fase

2007). The embryos capacity to be developed in particular medium is not necessarily a sample of environmental preference, in contrast, could be simply reflect of its capacity to tolerate artificial conditions (Duque *et al.*, 2003). Even though bovine embryos can be *in vitro* cultivated in a simple medium under defined conditions, the supplementation with serum or serum bovine albumin (BSA) has proved a beneficial effect on cleavage development.

The literature related to the quality of bovine embryos is more abundant any time (Sirard *et al.*, 2006). Typically, the IVP embryos have a darker cytoplasm and lower density as a consequence a high lipids content, a more fragile pellucida area, differences in metabolism and a high incidence on chromosomal alterations, likewise differences at ultra-structural level that would explain those previously named characteristics (Lonergan, 2006). Frequently, the successful of cultivation system is usually measured respect to the embryo cleavage rate (Shoukir *et al.*, 1997), of embryo number reaching blastocysts stage (Mucci *et al.*, 2006), since phase represent the first visible indicator of divergence development of two different cellular lines, the trophectoderm (TE) and the internal cellular mass (ICM) (Cesari *et al.*, 2006).

The IVP embryos shown a reduced viability, the pregnancy rates followed by transference are generally low, there is high fetal losses, many congenital abnormalities, the phenomenon called syndrome of giant

representa el primer indicador visible de la divergencia en el desarrollo de dos líneas celulares distintas, el trofoectodermo (TE) y la masa celular interna (MCI) (Cesari *et al.*, 2006).

Los embriones PIV presentan una viabilidad reducida, las tasas de preñez seguida de la transferencia son generalmente bajas, existen altas pérdidas fetales, muchas anomalías congénitas, el fenómeno llamado síndrome del becerro gigante, entre otros (Lonergan y Fair, 2008). Las causas de estos trastornos aún permanecen sin descifrarse, pero entre las diferencias más estudiadas están una alta frecuencia de mixoploidías, células poliploides entre las células diploides de los blastocistos producidos *in vitro* (72-96%) comparado con los blastocistos producidos *in vivo* (25%), anomalías detectadas mediante análisis con hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Jakobsen *et al.*, 2006).

Cada vez es más frecuente el uso de tinciones diferenciales para determinar la calidad de los blastocistos, con la tinción y cuantificación del número de blastómeros: TE y MCI (Lim *et al.*, 2007). La prueba de apoptosis es la de mayor frecuencia, en la que destacan: la fragmentación del DNA (TUNEL, Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP Nick and labeling), seguida del análisis de condensación de la cromatina, y ploidía (tinción con Giemsa 4%), en busca de embriones haploides (n), diploides ($2n$), poliploides ($>3n$) (Wang *et al.*, 2008). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo empleadas para la PIV de embriones bovinos obtenidos a partir de hembras mestizas sobre el porcentaje de

calf, among others (Lonergan and Fair, 2008). Cells of this disorders are still not decipher, but between the more studied differences are a high frequency of mixoploid, polyploid cells among diploid cells of blastocysts produced *in vitro* (72-96%) compared to blastocysts produced *in vivo* (25%), anomalies detected through analysis with *in situ* fluorescent hybridization (FISH) (Jakobsen *et al.*, 2006).

Nowadays, the use of differential dyes is more frequent in order to determine blastocysts quality, with dye and quantification of number of blastomeres: TE and ICM (Lim *et al.*, 2007). Apoptosis test is the more frequent: DNA fragmentation (TUNEL, Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP Nick and labeling), followed by analysis of chromatin condensation, and ploidy (Giemsa dyeing 4%), looking for haploid (n), diploid ($2n$), and polyploid embryos ($>3n$) (Wang *et al.*, 2008). The purpose of this research was to evaluate the effect of cultivation conditions used for IVP of bovine embryos obtained from crossbreed females on blastocysts percentage and the number and quality of blastomeres through the use of double differential dye.

Materials and methods

Obtaining and selection of oocytes: Slaughtered cow ovaries were collected and moved to the laboratory in PBS + gentamicin (50 mg.L⁻¹) at 35-37°C on isothermic recipient. Once in laboratory, the ovaries were three times washed using PBS + gentamicin (50 mg.L⁻¹) at 35-37°C. The cumulus-ovocyte

blastocistos y el número y calidad de blastómeras mediante el empleo de la doble tinción diferencial.

Materiales y métodos

Obtención y selección de los ovocitos: se recogieron ovarios de vacas sacrificadas en matadero comercial y transportados al laboratorio en PBS + gentamicina (50 mg.L^{-1}) a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ en recipientes isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con PBS + gentamicina (50 mg.L^{-1}) a $35\text{-}37^\circ\text{C}$. Los complejos cumulus-ovocito (COC's) fueron recuperados mediante la técnica de *slicing*, que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de petri conteniendo medio TCM-199 (M2520, Sigma) suplementado con $2.2 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, 50 mg.L^{-1} gentamicina (G1397, Sigma) y 11.1 mg.L^{-1} de heparina (H9399, Sigma), liberándose así ovocitos provenientes de folículos de cualquier tamaño. Fueron seleccionados, bajo un microscopio estereoscópico aquellos COC's con mayor tamaño, al menos una capa completa de células del cumulus compacto y citoplasma homogéneo.

Maduración *in vitro* de ovocitos: el medio de maduración fue el TCM-199 (31.100-027, Gibco) suplementado con 275 mg.L^{-1} de piruvato sódico (815990, Fluka), 50 mg.L^{-1} de gentamicina (G1397, Sigma), 146 mg.L^{-1} de L-glutamina (G-5763, Sigma), $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de LH (Profasi®), $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de 17b-estradiol (E-2758, Sigma) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Los COC's fueron cultivados

(COC's) complejos were recovered through *slicing* technique, that consist on the successive count of the ovary surface with a scalpel blade in a Petri dish having TCM-199 medium (M2520, Sigma) supplemented with $2.2 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, 50 mg.L^{-1} gentamicin (G1397, Sigma) and 11.1 mg.L^{-1} heparin (H9399, Sigma), releasing this way ovocytes coming from any size follicles. Those COC's weight higher size were selected by using electroscopic microscope, at least a total layer of cells from the total cumulus and homogeneous cytoplasm.

***In vitro* maturation of oocytes:** the medium was TCM-199 (31.100-027, Gibco) supplemented with 275 mg.L^{-1} of sodium pyruvate (815990, Fluka), 50 mg.L^{-1} gentamicin (G1397, Sigma), 146 mg.L^{-1} of L-glutamine (G-5763, Sigma), $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ of LH (Profasi®), $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ of 17b-estradiol (E-2758, Sigma) and 10% of bovine fetal serum (FBS). COC's were cultivated in groups of 12 in micro drops of $50 \text{ } \mu\text{L}$ medium covered with mineral oil (M8410, Sigma) during 24 hours to 38.5°C in an atmosphere with 5% CO_2 in humidity air saturated (Marquant *et al.*, 1989). A sample was taken to value the meiotic progression. The ovocytes were denudated from cumulus cells by mechanical agitation and after fixed on methanol: acetic acid (3:1) during 48 h at least. They were died with aceto-orceína at 1.1%, being evaluated under optical microscope (Olympus CX31, Japón) (400X), and later, they were classified according to the meiotic stage reached: matures (MII+CP, TeloI) and immature

en grupos de 12 en microgotas de 50 μ l de medio cubiertas con aceite mineral (M8410, Sigma) durante 24 horas a 38.5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire saturado de humedad (Marquant *et al.*, 1989). Se tomó una muestra para valorar la progresión meiótica. Los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus por agitación mecánica y fijados en una mezcla de metanol: ácido-acético (3:1) durante al menos 48 h. se tiñeron con aceto-orceína al 1.1% evaluando bajo microscopio óptico (Olympus CX31, Japón) (400X), clasificándolos según el estadio meiótico alcanzado: maduros (MII+CP, TeloI) e inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica y en VG). Aquellos que no pudieron ser incluidos en los grupos anteriores fueron considerados como degenerados.

Fecundación *in vitro*: los COC's madurados fueron lavados dos veces en el medio TL-Semen, para luego ser trasladados en grupos de 25 a placas con gotas de 100 mL de medio TL-IVF (suplementado con 6 mg.mL⁻¹ de BSA, libre de ácidos grasos, Sigma A6003, 30 μ g.mL⁻¹ de heparina (H3149, Sigma) y penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE), cubiertas con aceite mineral. Para la selección de los espermatozoides se utilizó semen congelado de toros de probada fertilidad. Una vez descongeladas las pajuelas (a 37°C x 30 segundos) se centrifugaron a 300 xg durante 5 minutos en medio TL-Semen, se descartó el sobrenadante y el pellet de espermatozoides fué lavado nuevamente centrifugado en medio TL-Semen a 300 xg por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se deter-

(anaphase I, metaphase I, chromosomal condensation and in VG). Those cannot be included on previous groups were considered as degenerated.

***In vitro* fertilization:** COC's mature were twice in TL-Semen medium, for after be moved in groups of 25 toward dishes with drops of 100 mL of TL-IVF medium (supplemented with 6 mg.mL⁻¹ of BSA, fatty acids free, Sigma A6003, 30 μ g.mL⁻¹ of heparin (H3149, Sigma) and penicilamine, hypotaurine and epinephrine (PHE), covered with mineral oil. Frozen sperm from fertile bulls was used to select spermatozoids. Frozen-thawed semen straw (at 37°C x 30 seconds) were centrifuged to 300 xg during 5 min on TL-Semen medium, the supernatant was discarded and the spermatozoids pellet was again washed centrifuged on TL-Semen medium to 300 xg during 5 min. The supernatant was discarded and sperm concentration was determined with a Neubauer camera for after be diluted on TL-IVF medium until reaching a concentration of 10×10^4 spermatozoids by micro-drop of TL-IVF. Gametes were cultivated during 18h at 38.5°C on atmosphere with 5% of CO₂ in moisture saturated air. A sample of assumed zygotes was taken at 18 pih and it was processed just like ovocytes, to value the FIV rate following the classification described by Martino *et al.* (1996).

***In vitro* embryos culture:** Separation of cells from cumulus was done 18h after fecundation and spermatozoids adhered to the surface of assumed zygotes through

minó la concentración espermática con una cámara de Neubauer para luego ser diluidos en medio TL-IVF hasta alcanzar una concentración de 10×10^4 espermatozoides por microgota de TL-IVF. Los gametos fueron cultivados durante 18h, a 38.5°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad. A las 18 hpi se tomó una muestra de los presuntos cigotos y fueron procesados al igual que los ovocitos, para valorar la tasa de FIV, siguiendo la clasificación descrita por Martino *et al.* (1996).

Cultivo *in vitro* de embriones: a 18h después la fecundación se procedió a la separación de las células del cumulus y los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos mediante agitación mecánica en medio TL-Semen. Una vez libres o con al menos una capa de células del cumulus, los presuntos cigotos fueron lavados dos veces en el mismo medio y fueron depositados, en grupo de 25, en gotas de 100 mL medio SOF (suplementado con 5 mg.mL⁻¹ de BSA, EFAF, A6003, Sigma, 20ml de EAA, 10 mL de NEAA, 10 mL de L-Glutamina y 2,5% de SFB), cubiertas con aceite mineral e incubados 38.5°C, 5% de CO₂ y aire saturado de humedad durante 7 días (8d pi) y recambio de medio SOF fresco al tercer y quinto día de cultivo.

Evaluación de la división y desarrollo embrionario: la tasa de división embrionaria se evaluó a las 48h pi, tomándose en cuenta para ello el total de embriones de 2 o más células obtenidos en relación al total de ovocitos puestos a fecundar. Tras 7 y 8d de cultivo (8 y 9d pi, respectivamente), todos los embriones fueron

mechanical agitation on TL-Semen medium. Once free or at least a cells layer from cumulus, the assumed zygotes were twice washed in the same medium were deposited on a group of 25, in drops of 100 mL SOF medium (supplemented with 5 mg.mL⁻¹ of BSA, EFAF, A6003, Sigma, 20 mL of EAA, 10 mL of NEAA, 10 mL of L-Glutamine and 2.5% of SFB), covered with mineral oil and incubated at 38.5°C, 5% of CO₂ and moisture saturated air during 7 days (8d pi) and recharge of fresh SOF medium on third and fifth cultivation day.

Evaluation of division and embryo development: the cleavage rate was evaluated at 48h pi, taking into account the total of embryos of 2 or more cells obtained in relation to the total of ovocytes were fertilized, after 7 and 8 cultivation days (8 and 9d pi, respectively). All the embryos were observed under stereoscopic microscope (Olympus, SZX12, Japan) and blastocysts were put apart from the rest of embryos, to avoid confusion during valuation of cleavage development. A double fluorescent dyeing was used (Hoechst 33342 + iodine propidium) with the purpose of determining the total number of cleavage cells with altered cell membrane. Methodology described by Mucci *et al.* (2006) was used. Embryos were incubated at 38.5°C during 15 min on SOF medium supplemented with 10 mg.mL⁻¹ iodine propidium fixed to 70% during 5 min, and then moved on absolute ethanol + 10 mg.mL⁻¹ bisbenzimidazole (Hoechst 33342, Sigma) during 5 min more at environmental temperature. They

observados bajo microscopio estereoscópico (Olympus, SZX12, Japón) y los blastocistos se separaron del resto de los embriones, para evitar confusión durante la valoración del desarrollo embrionario. Se utilizó una doble tinción fluorescente (Hoechst 33342 + yoduro de propidio) con el propósito de determinar el número total de células embrionarias y el número de células con membrana celular alterada. La metodología utilizada fue la descrita por Mucci *et al.* (2006). Los embriones fueron incubados a 38.5°C por 15 minutos en medio SOF suplementado con 10 mg.mL⁻¹ yoduro de propidio, fijados en etanol al 70% por 5 minutos, y luego transferidos en etanol absoluto + 10 mg.mL⁻¹ bisbenzimid (Hoechst 33342, Sigma) por otros 5 minutos a temperatura ambiente. Se pasaron a una gota de aceite de inmersión (Olympus, Japón) sobre un portaobjeto y cubiertos con cubreobjeto para ser sellados con esmalte de uñas. Las láminas fueron valoradas bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus, BX41, Japón) con filtros para visualizar ambas tinciones. Las células teñidas con IP (color rojo) fueron consideradas con membrana alterada, mientras que las teñidas con Hoechst 33342 (color azul) fueron consideradas intactas.

Análisis Estadístico: fueron realizadas cinco repeticiones. El conteo de células embrionarias alteradas y normales se analizaron con un ANOVA del paquete estadístico SAS® y las medias fueron comparadas usando el test de Tukey. Las diferencias entre las frecuencias se consideraron significativas para valores de *P* menores a 0,05.

were moved into a drop of immersion oil (Olympus, Japan) over a slide and they were sealed with nail varnish. Layers were valued under a fluorescent microscope (Olympus, BX41, Japan) with filters to visualize both dyes. The cells dyed with IP (red color) were considered with altered membrane, whereas those dyed with Hoechst 33342 (blue color) were considered as untouched.

Statistical analysis: Five replications were accomplished. The altered and normal cleavage cells count was analyzed with ANOVA of statistical program SAS® and means were compared using the Tukey test. Differences between frequencies were considered significant for *P* values lower than 0.05.

Results and discussion

A total of 802 oocytes were evaluated in this research. The maturing percentage obtained was 68.85% (table 1), a superior result in comparison to those obtained by Rodríguez *et al.* (2004) and Báez *et al.* (2008) on similar conditions and using ovaries from slaughtered crossbreds female. A rate of 7.1% of oocytes normally fertilized was observed at 18 pi, with a percentage of 12.2% abnormal penetrations (table 2). After 48 pi the embryo division rate was 62.61%. 44.93% corresponded to embryos of 4 cells, followed by 17.39% of 2 cells and 0.3% for the stage of 8 cells. At 7 days cultivation (8 d pi), the number of embryos obtained was 160, distributed as follows, 37 embryos of 2-4 cells representing 8.85%, 12 of 8-16 cells with 2.87%, 34

Resultados y discusión

Un total de 802 ovocitos fueron evaluados en este trabajo. El porcentaje de maduración obtenido fue de 68,85% (cuadro 1), resultado superior a los obtenidos por Rodríguez *et al.* (2004) y Báez *et al.* (2008) bajo condiciones similares y empleando los ovarios de hembras mestizas sacrificadas en matadero. A las 18 hpi se observó un una tasa de 57,1% de ovocitos normalmente fecundados, con un porcentaje de 12,2% de penetraciones anormales (cuadro 2). Tras 48 hpi la tasa de división embrionaria fue de 62,61%. El 44,93% correspondieron a embriones de 4 células, seguido de un 17,39% de 2 células y de 0,3% para el estadio de 8 células. A los 7 días de cultivo (8 d pi), el número de embriones obtenidos fue de 160, distribuidos como sigue, 37 embriones de 2-4 células representando un 8,85%, 12 de 8-16 células con un 2,87%, 34 mórulas alcanzando un 8,13%, 76 blastocistos equivalente al 18,18% (figura 1) y 1 blastocisto eclosionado, representando un 0,24%. De los 77 blastocistos producidos, setenta y seis fueron fijados y teñidos con la doble tinción diferencial para evaluar el número y calidad de las blastómeras. Sólo 34 embriones lograron valorarse, 17 correspondieron al día siete de cultivo (8 d pi) y 17 al día 8 de cultivo (9 d pi). En el cuadro 3 se muestra la distribución del número y calidad de blastómeras, después del análisis con la tinción diferencial, tras 7 y 8 días de cultivo. En los embriones cultivados por 8 días el número de células normales y con membrana alterada resultó más alto ($P < 0,05$) que el conteo

morula reaching 8.13%, 76 blastocysts equivalent to 18,18% (figure 1) and 1 hatched blastocyst, representing 0.24%. From 77 blastocysts produced, 76 were fixed and dyed with double differential dyeing to evaluate the number and quality of blastomeres. Only 34 embryos were valued, 17 corresponded to day 7 (8 d pi) and 17 to day 8 of cultivation (9 d pi). Distribution of number and quality of blastomeres is shown in table 3, after analysis with differential dyeing, after 7 and 8 days of cultivation. In those embryos cultivated during 8 days the number of normal cells and with altered membrane was higher ($P < 0.05$) than count for embryos with 7 days of cultivation. The percentage of blastocysts just like the total number of blastomeres at 7 days of cultivation, obtained in this research were similar to those obtained by Asada *et al.* (2002), Sugiyama *et al.* (2003), Pomar *et al.* (2005), Morató *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), with average of 23% of blastocysts and 105 from total of blastomeres at 7 days of cultivation.

There are several authors that use IP dyeing to value the effects of equines (Tharasanit *et al.*, 2006) and bovines (Pomar *et al.*, 2005; Mucci *et al.*, 2006; Cesari *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007) embryos vitrifying, increasing this way those researches valuating the cleavage self preservation, measured by the integrity of membrane through vital dyeing, using only one or the combination of several fluorochromes in fresh or cryo preserved bovine embryos *in vitro* and *in vivo* produced. In this research, in relation to the

Cuadro 1. Progresión meiótica de ovocitos bovinos.**Table 1. Meiotic progression of bovine oocytes.**

Nº Total de Ovocitos	Nº Ovocitos Madurados			Nº Ovocitos Inmaduros				Nº Ovocitos Degenerados (%)	
	MII + CP	Telo I	Total Ovoc. mad.(%)	Ana I	MI	CCII	VG		Total Ovoc. inmd.(%)
228	126	31	157 (68,85)	6	41	2	3	52 (22,8)	19 (8,3)

MII+CP: metafase II + corpúsculo polar, TeloI: telofase I, Ovoc. mad.: ovocitos madurados, MI: metafase I, CCII: condensación cromosómica II, VG: vesícula germinal, Ovoc. inm.: ovocitos inmaduros.

Cuadro 2. Tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos.**Table 2. *In vitro* fecundation rate of bovine oocytes.**

Total Ovoc. Eval.	Ovocitos Penetrados					Total Ovoc. P. (%)	Ovocitos No Penetrados (%)
	2PN+C(%)	>2PN(%)	AS (%)	Telo II(%)			
156	89 (57,1)	7 (4,5)	11 (7,1)	1 (0,6)	108 (69,02)	48 (30,76)	

Total Ovoc. Eval.: Total de ovocitos evaluados, 2PN+C: 2 pronúcleos más cola, >2PN: más de 2 pronúcleos, AS: asincrónicos, TeloII: telofase II, Total Ovoc. P.: Total de ovocitos penetrados.

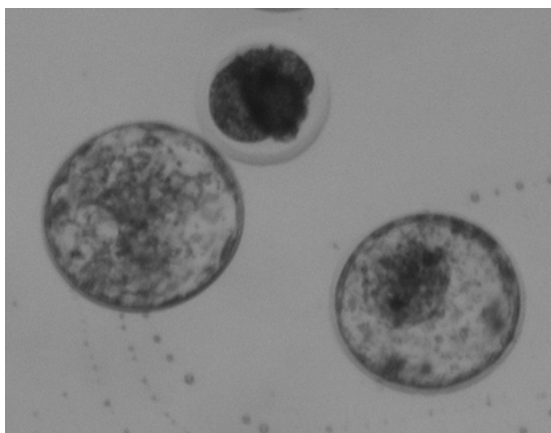


Figura 1. Blastocistos bovinos PIV de 7d de cultivo.

Figure 1. Bovine blastocystes IVP of 7d cultivation.

para los embriones con 7 días de cultivo. El porcentaje de blastocistos al igual que el número total de blastómeras a los 7 días de cultivo, obtenidas en el presente trabajo fueron similares a los obtenidos por Asada *et al.* (2002), Sugiyama *et al.* (2003), Pomar *et al.* (2005), Morató *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), con promedio de 23% de blastocistos y de 105 de total de blastómeras a los 7 días de cultivo.

number of blastomeres positive to IP, a mean of 4.04 ± 2.3 was found for embryos of 7 days of cultivation which was significant higher ($P < 0.05$) when compared to embryos keep on cultivation until day 8 (9.88 ± 6.2) (figure 2). In Kaidi *et al.* (1999) research, they report that embryos of control, subject of double dying (IP + Hoechst 33342), shown a proportion of cells dyed with IP of 0.1 ± 1.8 , and in the group of embryos treated with

Cuadro 3. Número y calidad de blastómeras de embriones PIV.

Table 3. Number and quality of PIV embryo blastomers.

Días de cultivo	No. Embriones teñidos	Total No. Células	No. de células con membrana normal	No. células con membrana alterada
7	17	107,7 \pm 8,8	103,6 \pm 9,0 ^b	4,05 \pm 2,3 ^b
8	17	122,1 \pm 12,2	112,2 \pm 13,5 ^a	9,8 \pm 6,2 ^a

(%) ^{a,b}: valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($P < 0,05$).

Son varios los autores que emplean la tinción con IP para valorar los efectos de la vitrificación en embriones equinos (Tharasanit *et al.*, 2006) y bovinos (Pomar *et al.*, 2005; Mucci *et al.*, 2006; Cesari *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007), siendo cada vez más, los trabajos que valoran la sobrevivencia embrionaria, medida por la integridad de la membrana a través de la tinción vital, empleando uno o la combinación de varios fluorocromos en embriones bovinos frescos o criopreservados producidos *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo, en cuanto al número de blastómeras positivas a IP, se encontró una media de $4,04 \pm 2,3$ para los embriones de 7 días de cultivo, la cual resultó significativamente mayor ($P < 0,05$) al compararla con los embriones que siguieron en cultivo hasta el día 8 ($9,88 \pm 6,2$) (figura 2). En el trabajo rea-

different cryo protectors the proportions oscillate between 1.5 ± 1.8 and 31.7 ± 1.7 , when they were subject of different concentrations of galactose, concluding that the alteration of membrane appears when embryos are exposed to an osmotic shock caused by high concentrations of cryo protector, in a 1200 mOsm solution. Mucci *et al.* (2006), shown a mean of 2 ± 0.5 (1.8%) cells with altered membrane for the control, whereas for vitrified embryos appears values until 42.7 ± 1.9 (42.8%), showing that only is caused by the damage from N_2L frozen and to the toxic effect of cryo protector solutions.

Mori *et al.* (2006), noticed that 5% of blastomeres, from group of untreated embryos, showed membrane alteration, using IP + Hoechst 33342, that represent an average of 6 cells, indicating that this type of alteration can be consequence

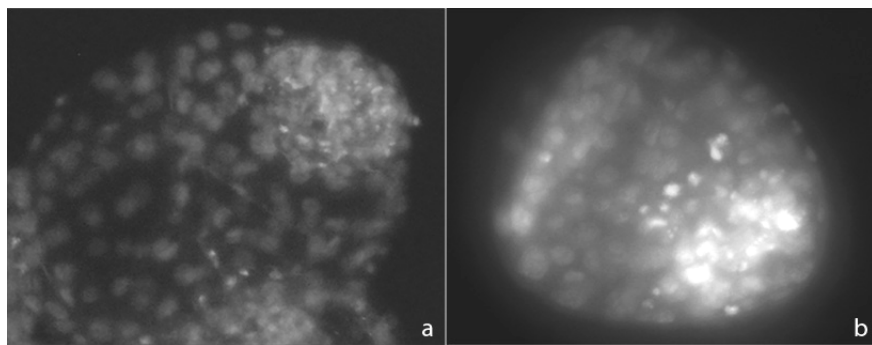


Figura 2. Evaluación de la calidad embrionaria (7 días de cultivo) (1000X). Grupo control: (a) Blastocisto de 96 células, b) blastocisto con células normales (azules) y células alteradas (rojas).

Figure 2. Evaluation of embryonaria quality (7 cultivation days) (1000X). Control group: (a) Blastocyst of 96 cells, b) blastocyst with normal cells (blues) and altered cells (reds).

lizado por Kaidi et al. (1999), reportan que los embriones del grupo control, sometidos a la doble tinción (IP + Hoechst 33342), muestran una proporción de células teñidas con IP de $0,1 \pm 1,8$, y en el grupo de embriones tratados con diferentes crioprotectores las proporciones oscilan entre $1,5 \pm 1,8$ y $31,7 \pm 1,7$, cuando fueron sometidos a diferentes concentraciones de galactosa, concluyendo que la alteración de las membrana aparecía cuando los embriones son expuestos a un shock osmótico propiciado por las altas concentraciones del crioprotector, en una solución de 1200 mOsm. Mucci et al. (2006), muestran una media de $2 \pm 0,5$ (1,8%) células con membrana alterada para el grupo control, mientras que para los embriones vitrificados aparecen valores de hasta $42,7 \pm 1,9$ (42,8%), indicando que esto se debe al daño causado por la congelación en N_2L y al efecto tóxico de las soluciones crioprotectoras.

En el trabajo realizado por Mori et al. (2006), observaron que en el 5% de las blastómeras, del grupo de embriones que no fueron sometidos a ningún tratamiento, mostraron alteración de membrana, utilizando IP + Hoechst 33342, lo que se traduce en un promedio de 6 células, manifestando que este tipo de alteración puede ser consecuencia de un daño o trauma celular, característico del desorden en la estructura celular, que inicia con un hinchamiento como resultado de los cambios de permeabilidad y que culmina con la ruptura de la membrana.

En la valoración realizada por Pomar et al. (2005), donde compararon la integridad de la membrana de

of a cell damage, characteristic of disorder in cell structure, beginning with a blowing as a result of permeability changes and finish with breaking of membrane.

In the valuation carried out by Pomar et al. (2005), where they compared the integrity of bovine embryos membrane *in vivo* and *in vitro* produced and in fresh valued, they found a proportion of: 1.2 ± 7.5 and 4.5 ± 7.5 , respectively. This result was similar to that obtained in this research. Authors says that cell damage percentage caused by blastocyst (based on results of membrane integrity and DNA fragmentation) was lower in embryos *in vivo* produced, compared with those *in Vitro* produced, being concluded that differences due to the source of blastocysts obtaining are low, showing the IVP technique of bovine embryos and taking into account that the appearance of cells with altered membrane reflect cultivation conditions, therefore, this double dying can be used like criterion for the analysis of cultivation conditions, blastocysts quality test, because includes total of blastomeres count and also reveal cryo preservation effects.

Conclusions

The bovine ovocytes taken from crossbred female can be used for IVP of bovine embryos. Double differential dying revealed most of blastomeres of IVP bovine embryos did not show membrane alteration and the subsequent cultivation could increase the number of blastomeres positive to IP. The incorporation of this type of

embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro* valorados en fresco, arrojaron una proporción de: $1,2 \pm 7,5$ y $4,5 \pm 7,5$, respectivamente. Este resultado fue similar a los obtenidos en este estudio. Los autores indican que el porcentaje de daño celular por blastocisto (basándose en los resultados de integridad de membrana y fragmentación del DNA) fue más baja en los embriones producidos *in vivo*, comparados con los producidos *in vitro*, concluyendo que las diferencias debidas a la fuente de obtención de los blastocistos es baja, evidenciando la puesta a punto de la técnica de PIV de embriones bovinos y como la aparición de células con membrana celular alterada es indicativo de las condiciones de cultivo, por lo que esta doble tinción puede ser utilizada como criterio para el análisis de las condiciones de cultivo, prueba de calidad de blastocistos, ya que incluye el conteo del total de blastómeras y además revelar los efectos de la criopreservación.

Conclusiones

Los ovocitos bovinos provenientes de hembras mestizas pueden ser utilizados para la PIV de embriones bovinos. La doble tinción diferencial reveló que la mayoría de las blastómeras de los embriones bovinos PIV no mostraron alteración de membrana y que el cultivo subsecuente podría aumentar el número de blastómeras positivas a IP. Se recomienda la incorporación de este tipo de tinción en los protocolos empleados en los laboratorios de FIV para evaluar las condiciones de cultivo sobre la calidad embrionaria.

dyng is recommended in protocols used in FIV laboratories to evaluate cultivation conditions about cleavage quality.

Acknowledgement

Authors are grateful for the support of the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), Universidad del Zulia, by the financing of this research.

End of english version

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Literatura citada

- Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S., Fukui, Y. 2002. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenol.* 58: 1199-1208.
- Báez, F., Hernández, L., Villamediana, P. 2008. Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Rev. Científica, FCV-LUZ* 18 (3): 253-261.
- Cesari, A., Kaiser, G., Mucci, N., Mutto, A., Vincenti, A., Fornés, M., Alberio, R. 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenol.* 66: 1185-1193.
- Corrêa, G., Rumpf, R., Mundim, T., Franco, M., Dode, M. 2008. Oxygen

- tension during in vitro culture of bovine embryos effect in production and expression of gene related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 132-142.
- Chenoweth, P. 2007. Influence of male on embryo quality. *Theriogenol.* 68: 308-315.
- De Wit, A., Kruip, T. 2001. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for a-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.* 65: 51-56.
- Duque, P., Gómez, E., Díaz, E., Facal, N., Hidalgo, C., Díez, C. 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryos culture in vitro. *Theriogenol.* 59: 889-899.
- Jakobsen, A., Thomsen, P., Avery., B. 2006. Few polyploidy blastómeras in morphologically superior bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenol.* 65: 870-881.
- Kaidi, S., Langendonck, V., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. 1999. Cellular alteration after dilution of cryopreservative solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenol.* 52: 515-525.
- Lim, K., Jang, G., Ko, K., Lee, W., Park, H., Kim, J., Lee, S., Hwang, W., Lee, B., Kang, S. 2007. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenol.* 67: 293-302.
- Lonergan, P. 2006. Influence of oocyte origin and embryo culture condition on gene expression and development outcome in cattle. *J. Reprod Dev.* 52 (Suppl): S45-53.
- Lonergan, P., Fair, T. 2008. In vitro-produced bovine embryos – Dealing with the warts. *Theriogenol.* 9: 17-22.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, MP. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 259-267.
- Marquant, B., Gerard, M., Solari, A., Thibault, C. 1989. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. *Reprod Fert Develop.* 29: 559-568.
- Martino, A., Pollard, J., Leibo, S. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. and Devel.* 45: 503-512.
- Martino, A., Songsasen N., Leibo, S. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. of Reprod.* 54: 1059-1069.
- Meirelles, F., Caetano, A., Watanabe, Y., Ripamonte, P., Carambula, S., Merighe, G., García, S. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 13-20.
- Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, MT., Mogas, T. 2008. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carries of the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiol.* 57: 137-141.
- Mori, M., Otoi, T., Wongsrikeao, P., Agung, B., Nagai, T. 2006. Effects of α -mercatoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4 °C for 72 h. *Theriogenol.* 65: 1322-1332.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R. 2006. Effect of strous cow serum during bovine embryos culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenol.* 65: 1551-1562.
- Pereira, D., Dove, M., Rumpf, R. 2005. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenol.* 63: 1131-1141.

- Pomar, F., Teerds, K., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharanit, T., Aguilar, B., Roelen, B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenol.* 63: 2254-2268.
- Rodríguez, B., Molina, J., Villamediana, P. 2004. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Cien.* 12 (2): 125-136.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N., Parrish, J., Memili, E. 2007. Development potencial of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T., Sakkas, D. 1997. Early cleavage of *in vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.* 12 (7): 1531-1536.
- Sirard, M., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenol.* 65: 126-136.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). *SAS/STAT User's Guide.* 8.2. Cary, NC. 2001.
- Sugimaya, S., McGowan, M., Kafi, M., Phillips, N., Young, M. 2003. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenol.* 60: 1039-1047.
- Tharasanit, T., Colleoni, S., Lazzari, G., Colebrander, B., Galli, C., Stout, T. 2006. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. *Reprod.* 132: 759-769.
- Wang, S., Cowan, C., Chipperfield, H., Powers, D. 2005. Gene expression in the preimplantation embryo: *in vitro* developmental changes. *Reprod. Biomed. Online.* 10: 607-616.
- Wang, Z., Wang, W., Yu, S., Xu, Z. 2008. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 292-301.
- Warzych, E., Peippo, J., Szydlowski, M., Lechniak, D. 2007. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 97: 334-343.
- Zhang, L., Wang, S., Dai, Y., Li, N. 2009. Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 182-189.