

SISTEMA DE CULTIVO PARA MEJORAR LA VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

En la última década, la producción de embriones bovinos *in vitro* se ha incrementado notablemente, convirtiéndose en la principal tecnología de embriones a escala mundial. En bovino, la producción de embriones *in vitro* incluye el diseño y preparación de medios de cultivo, los cuales son esenciales para dar soporte al desarrollo de ovocitos y embriones. Sin embargo, la producción de embriones *in vitro* aún continúa limitada por varios factores. El cultivo *in vitro* después de la fecundación es un período crítico para producir embriones de buena calidad y viabilidad. Además, el correcto desarrollo y mantenimiento de la gestación hasta el parto y la adecuada salud perinatal de los terneros están altamente correlacionados con los medios y sistemas de cultivo *in vitro*. En bovinos, el cultivo individual *in vitro* en condiciones definidas después de día 6 favorece el desarrollo embrionario y permite realizar diferentes análisis no invasivos del medio de cultivo. Por el contrario, los suplementos no definidos presentes en los medios de cultivo convencionales pueden reducir la repetibilidad de los análisis. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue optimizar un sistema de cultivo para mejorar la calidad y la viabilidad de embriones bovinos *in vitro*. Con este propósito se desarrollaron cuatro grupos de experimentos.

En primer lugar, evaluamos los efectos de la eliminación de proteína sobre el desarrollo de blastocitos durante un período corto de cultivo individual. La viabilidad del embrión a diferentes plazos fue analizada mediante supervivencia a la criopreservación y recuento diferencial de células embrionarias; porcentajes de gestación; y duración de la gestación, peso y morfometría de los terneros nacidos. Además, se realizó un análisis de expresión génica en blastocistos expandidos de día 7 tanto antes como después de la criopreservación. De este capítulo se puede concluir que el cultivo de embriones individuales durante 24 h en un medio libre de proteína produce menos blastocistos pero aumenta los porcentajes de nacimiento después de la vitrificación y la transferencia a receptoras.

A continuación se abordó la evaluación de la viabilidad de los blastocistos expandidos producidos en función de la cinética del embrión y la restricción de proteína durante un periodo corto en cultivo individual. Así, las mórulas y los blastocistos tempranos de día 6 se cultivaron individualmente con y sin proteína durante 24 h. El desarrollo y el contenido de lípidos se analizaron en blastocistos expandidos derivados de mórulas (M-XB) y de blastocistos tempranos (EB-XB). La expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, las respuestas al estrés y la apoptosis se analizaron en M-XB frescos y vitrificados, producidos con y sin proteína. Los índices de gestación, los porcentajes de nacimientos y el peso al nacimiento se registraron después de la transferencia de embriones. Los resultados indican que la cinética embrionaria y la vitrificación impactan en los fenotipos al nacimiento, al menos en el subconjunto de las terneras. Las alteraciones pueden involucrar la proteína exógena y la movilización de las reservas de lípidos.

Posteriormente, se investigó si una concentración muy baja de FCS (0.1%) en cultivo desde el día 1 hasta el día 6 podría mejorar los porcentajes de blastocisto temprano (EB) y, a continuación, aumentar los porcentajes de blastocisto expandido (XB) en día 7 después de un cultivo individual sin proteína. La calidad de los embriones producidos se evaluó en términos de supervivencia a la criopreservación, porcentaje de apoptosis, acumulación de lípidos y transferencia a receptoras. Se concluye en este capítulo que la concentración mínima de FCS mejora los porcentajes de EB en el día 6, permitiendo obtener más XB después de 24h de cultivo individual sin proteína. La calidad de los XB producidos con FCS es similar a los XB producidos con BSA en términos de apoptosis, acumulación de lípidos e índice de gestación.

Finalmente, el objetivo en el cuarto capítulo fue cuantificar la proteína total HDGF en el fluido uterino (FU) mediante *multiple reaction monitoring* (MRM), técnica que permite reconocer la proteína total. Además, analizamos los efectos de rHDGF en etapas embrionarias específicas con embriones bovinos de día 6 cultivados *in vitro* con y sin proteína (BSA); y sobre la viabilidad de la preñez y los fenotipos de los terneros después de la transferencia de embriones a receptoras. Además, se cuantificó el ARNm de *HDGF* en células endometriales cocultivadas con un embrión macho o un embrión hembra. De este capítulo se puede concluir que el HDGF total cuantificado por MRM tendió a aumentar en el FU sin embriones, mientras que el sexo del embrión podría regular la expresión endometrial de HDGF. Sin embargo, se debe ser cauteloso con el uso de suplementos macromoleculares específicos en cultivo, ya que pueden contener el GF en estudio, como ocurre con la presencia de HDGF en la BSA comercial, lo que puede alterar los resultados de los experimentos. En última instancia, el uso de rHDGF es compatible con la gestación y el nacimiento de terneros normales.