



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Desarrollo de cultivos primarios de biopsias
embrionarias bovinas para genotipado masivo

Tesis de Master
Valencia, Julio de 2011
Rommel Moros Mora

Directores:
Miguel Ángel Ramírez de Paz
Dimitrios Rizos
Alfonso Gutiérrez Adán



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, por permitirme llegar hasta este punto tan importante de mi vida y lograr otra meta más de mi carrera. De igual manera, agradezco a mi madre Braulia Moros, por su cariño, comprensión y apoyo sin condición ni medida. A mi Tía Sergia, y mis primos Natalie y Eduardo, quienes me brindaron todo su apoyo y entusiasmo para iniciar este proyecto.

Agradezco a mis directores de tesis, los Doctores. Alfonso Gutiérrez Adán, Miguel Ángel Ramírez de Paz y Dimitrios Rizos, por la paciencia, colaboración y acertadas correcciones de este trabajo; sus opiniones y consejos me sirvieron para dar mis primeros pasos en la carrera de investigación.

Agradezco a todas las entidades y personas implicadas en la organización del Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto que parecía inalcanzable, y permitirme conocer este gran país. Un agradecimiento especial al director del CIHEAM, Dr. Luis Esteruelas, por todo el apoyo brindado para solucionar los trámites consulares de último momento

Gracias a cada uno de los maestros que participaron en el desarrollo de este máster, en especial al Dr. Agustín Blasco, por su gran voluntad y empeño en la planificación y realización de las actividades del máster, y a la Dra. María Antonia Santacreu, por su cordialidad, apoyo y confianza.

Gracias a mis amigos del máster, Anthony, Álan, Carlos, Dianelys, Estrella, Iván, Ronald y Virginia, quienes en algún momento hicieron que esta etapa de mi vida fuera amena y con quienes compartimos tantas experiencias. Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Embriología Preimplantacional, en especial a Ricardo y Ricaurte, de quienes aprendí muchas cosas y quienes me colaboraron incondicionalmente durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias España por darme la oportunidad de conocerme, por permitirme conocer personas maravillosas y lugares maravillosos. Para todos los que no nombro aquí, pero están en mi mente, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	13
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. ESQUEMAS DE SELECCIÓN ANIMAL BASADOS EN CARACTERES GENÉTICOS DE INTERÉS ECONÓMICO: LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	21
1.2. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN ESQUEMAS DE MEJORA GENÉTICA BOVINA	23
1.3. PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES	24
1.4. BIOPSIA Y GENOTIPADO DE EMBRIONES BOVINOS	25
1.4.1. VENTAJAS DEL GENOTIPADO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS	26
1.4.2. METODOLOGÍAS DE BIOPSIA EMBRIONARIA	27
1.4.2.1. MÉTODO DE ASPIRACIÓN	27
1.4.2.2. MÉTODO DE MICROSECCIÓN	28
1.4.3. SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA Y TASA DE GESTACIÓN DE EMBRIONES BIOPSIADOS	29
1.4.4. MULTIPLICACIÓN DEL ADN DE LA BIOPSIA EMBRIONARIA	30
1.4.4.1. WGA	31
1.4.4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONARIAS	32
1.5. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL TROFECTODERMO (TE) EMBRIONARIO	32
1.5.1. TROFECTODERMO EMBRIONARIO EN MAMÍFEROS	32
1.5.2. LÍNEAS CELULARES DE TROFECTODERMO BOVINO	33
1.5.3. SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TROFECTODERMO BOVINO	33
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE BLASTOCISTOS BOVINOS	43
3.1.1. RECOLECCIÓN DE OVOCITOS	43
3.1.2. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV)	44
3.1.3. FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV)	44
3.1.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	45
3.1.5. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA	45
3.2. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES DE	46

TROFECTODERMO BOVINO EN CULTIVO PURO	
3.2.1.DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO ÓPTIMO PARA LA ADHESIÓN DE LA BIOPSIA	46
3.2.2.DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO QUE OPTIMICE EL RÁPIDO CRECIMIENTO CELULAR A PARTIR DE LA BIOPSIA	47
3.2.2.1. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS	48
3.2.2.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO, SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS	49
3.2.3.EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR EN LOS DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO	49
3.2.4.PROCEDIMIENTO DE BIOPSIA Y SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA	50
3.2.5.RECUENTO CELULAR DE LAS BIOPSIAS	51
4. RESULTADOS	55
4.1. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA DE LAS RÉPLICAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA	55
4.2. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TROFECTODERMO EN BLASTOCISTOS ENTEROS	56
4.3. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS	57
4.4. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA DE LAS RÉPLICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA Y RECUENTO CELULAR	59
4.5. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA POST BIOPSIA	60
4.6. RECUENTO CELULAR DE LAS BIOPSIAS.	61
5. DISCUSIÓN	65
6. CONCLUSIONES	71
7. BIBLIOGRAFÍA	75

RESUMEN

RESUMEN

La implantación de las nuevas tecnologías de genotipado de embriones bovinos, usando la última generación de paneles de marcadores de alta densidad o mediante la evaluación del genoma completo, representa una alternativa que ayudaría a reducir el intervalo generacional, y a limitar además en los programas de selección multicarácter los elevados costes que implican la producción de un elevado número de crías.

Teniendo en cuenta las limitaciones técnicas existentes en lo referente al empleo de ADN amplificado en los paneles de marcadores de alta densidad, nos planteamos como objetivo el establecimiento de un cultivo celular a partir de una biopsia embrionaria, que nos permitiera obtener la suficiente cantidad de DNA de buena calidad de cada embrión, sin necesidad de amplificarlo, para de este modo garantizar un genotipado individual óptimo.

Con el objeto de seleccionar un medio de cultivo óptimo que garantizara una rápida adhesión de la biopsia embrionaria al soporte de cultivo y su sucesiva multiplicación, comparamos los siguientes medios: a) Medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos (MCFM), b) Medio condicionado por fibroblastos embrionarios de vaca (MCFV), c) Medio condicionado por cultivo primario de células oviductales bovinas (MCCO), d) SOF y e) DMEM. Además evaluamos la supervivencia embrionaria a las 24h de la biopsia y realizamos un recuento celular de los embriones antes y después de la biopsia, así como de la biopsia. El cultivo de las biopsias lo llevamos a cabo en un sistema de microgotas bajo aceite mineral, en placas de cultivo tratadas con gelatina.

La tasa de adherencia y multiplicación celular de las biopsias fue significativamente mayor en el MCFM (73,9%) que en el resto de los medios analizados. La supervivencia embrionaria tras la biopsia fue del 82% y el recuento celular de las biopsias tenía un promedio de 72 células, que supone un 42% del embrión. Tras la expansión celular, nuestro sistema de biopsia y cultivo permite obtener más de 300 mil células.

Por todo ellos podemos concluir que el sistema de cultivo en microgotas de medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos, sin necesidad de un cocultivo con un sustrato celular de otra especie, permite el establecimiento de cultivos celulares de trofectodermo bovino a partir de biopsias de blastocisto y abre la posibilidad del uso de paneles de marcadores de alta densidad en la selección embrionaria.

SUMMARY

SUMMARY

The application of new technologies of genotyping bovine embryos using last generation of high density markers chips or by evaluating the complete genome, represents an alternative procedure that would help to reduce the generational interval, and also to limit in the multi-character genetic selection programs the high cost of producing large number of off-springs.

Baring in mind the existing technical limitations related with the DNA amplification of high density markers chips, our objective was to establish a cellular culture system from an embryonic biopsy, which will allow a sufficient quantity of good quality DNA from each embryo, without amplification, guarantying an ideal individual genotype.

In order to select an ideal culture medium guarantying a rapid adherence of an embryonic biopsy and furthermore support the culture and the successive cell multiplication, we compare the following media: a) conditioned medium from mice embryonic fibroblast (MCFM), b) conditioned medium from bovine embryonic fibroblasts (MCFV), c) conditioned medium from primary culture of bovine oviductal cells (MCCO), d) synthetic oviduct fluid medium (SOF) and e) DMEM. We evaluated the embryonic survival after biopsy at 24 hours and we realized a cell count in embryos before and after biopsy, as well as in the biopsy. The culture of biopsies was carried out in a microdroplet system under mineral oil using culture dishes previously treated with gelatine.

The rate of adhesion and cellular multiplication of the biopsies was significantly higher in the MCFM group (73,9 %) that in the rest of media used. The embryonic survival after biopsy was 82 % and the mean number of cells of the biopsies used was 72, which represents a 42 % of the entire embryo used. After the cellular expansion, our system of biopsy culture allows to obtain more than 300.000 cells.

Based on the above we can conclude that the culture system in microdroplets using conditioned medium from mice embryonic fibroblasts,

without a need of co-culture with cells of another species, allows the establishment of trophoblast cellular culture of biopsies from bovine blastocysts and opens the possibility of using the high density markers chips in the embryonic selection.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESQUEMAS DE SELECCIÓN ANIMAL BASADOS EN CARACTERES GENÉTICOS DE INTERÉS ECONÓMICO: LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

En las últimas décadas los programas de mejora genética se han basado en el empleo de marcadores de ADN. Los recientes avances obtenidos en el desarrollo de tecnologías de análisis y mapeo del genoma bovino han permitido la disgregación de los caracteres cuantitativos de interés económico en sus principales componentes genéticos (locus de caracteres cuantitativos, QTLs) [1]. La identificación de marcadores ligados a características de interés productivo se ha convertido en una herramienta útil para la selección asistida por marcadores genéticos (SAM). Mediante la SAM se analizan un número limitado de microsatélites para unos pocos QTLs, combinando esta primera generación de información genómica con índices convencionales generados de análisis genéticos cuantitativos [2]. La adopción de SAM por la industria ganadera ha sido limitada, salvo pocas excepciones [3], debido a la escasa mejora genética que se logra obtener usando un número limitado de marcadores genéticos, al alto costo que implica genotipar dichos marcadores, y a la complejidad del cálculo de los valores genéticos [4].

Meuwissen et al desarrollaron una variante de SAM, que llamaron selección genómica [5]. Esta metodología consiste en el análisis de una gran cantidad de marcadores genéticos distribuidos en la totalidad del genoma. Dicha información se ingresa en una ecuación de predicción y se generan los valores genéticos moleculares (GEBV). Esta metodología es posible gracias al gran número de polimorfismos de un nucleótido (SNP) descubiertos mediante secuenciación genómica, y a las nuevas tecnologías desarrolladas para genotipar eficientemente grandes cantidades de SNPs [6].

Los avances en el conocimiento del genoma bovino y en el análisis del ADN, junto con el refinamiento de la posición en el genoma de los marcadores relacionados con genes de interés económico, han permitido a las compañías

dedicadas a la mejora genética el uso de chips de miles de marcadores genéticos para realizar la selección de sus animales [7, 8] Las ventajas potenciales que ofrecen los programas de selección genómica en esquemas de selección han sido demostradas mediante simulaciones Monte-Carlo [9]. Hasta el momento se han logrado grandes progresos en la raza Holstein, en la cual ahora se pueden realizar evaluaciones con información genómica para todos los caracteres que anteriormente eran evaluados mediante genética cuantitativa [2].

Uno de los principales retos planteados para lograr optimizar los nuevos esquemas de selección es aumentar considerablemente el número de animales candidatos incluidos en el proceso de selección genómica. De esta manera se incrementan las posibilidades de obtener animales evaluados positivamente para varios caracteres productivos de interés económico, y la presión de selección sobre los mismos; igualmente se lograría disminuir el intervalo generacional al poder usar toros de menor edad para destinarlos a inseminación artificial (IA) [2].

El factor limitante a la hora de incrementar la “n” en los programas de selección genética es meramente económico: por un lado se encuentran los altos costes económicos asociados a la transferencia a hembras receptoras, de un elevado número de embriones. Por otro lado están los costes asociados al mantenimiento de dichos animales gestantes hasta el momento del parto. Y a todo ello se suma el escaso valor económico potencial que poseen las crías no seleccionadas. Por todo ello, se está imprimiendo un gran esfuerzo para el establecimiento de un sistema de genotipado y selección del embrión antes de ser transferido a la hembra receptora. De este modo se acortaría el intervalo generacional y se limitarían los altos costes asociados a la producción de un gran número de crías, y al mantenimiento de las pruebas de progenie aún existentes, para realizar la selección de múltiples caracteres productivos de interés económico [2].

1.2. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN ESQUEMAS DE MEJORA GENÉTICA BOVINA

La historia de la transferencia embrionaria se remonta al año 1891, cuando Heape realizó por primera vez esta metodología en conejos [10]. Desde entonces se ha reportado el empleo de esta tecnología en todas las especies domésticas de interés económico.

En un programa de mejora genética, la transferencia de embriones provenientes de hembras donantes genéticamente superiores permite hacer una rigurosa selección desde el punto de vista materno, logrando un progreso genético acelerado. El empleo de esta biotecnología reproductiva impacta positivamente sobre la tasa anual de mejora genética, medida a través de la evaluación de algunos parámetros tales como: a) intensidad de selección, b) precisión de la predicción del mérito genético, c) variabilidad del carácter y d) intervalo generacional [11]. Una de las ventajas de los programas de múltiple ovulación y transferencia embrionaria (MOET), es el incremento tanto de la intensidad de selección, como de la precisión de la selección debido a la mayor disponibilidad de información de hermanos y medios hermanos.

Entre las principales biotecnologías embrionarias utilizadas actualmente en los programas de mejora genética, figuran los programas MOET, la producción de embriones *in vitro* y el uso de la técnica de aspiración folicular *in vivo* (Ovum Pick-Up (OPU); y más reciente la clonación y la transgénesis [12-17]. La comercialización de la tecnología de transferencia de embriones se inició en el año 1970 [10]; han pasado 30 años desde entonces, y la transferencia embrionaria se ha convertido en un gran negocio a nivel internacional. En el año 2009, la transferencia embrionaria a nivel mundial fue aproximadamente de 920.000 embriones bovinos (540.000 producidos *in vivo* y 380.000 producidos *in vitro*) [18].

Mediante el uso intensivo de técnicas reproductivas embrionarias, es factible obtener la cantidad de animales necesaria para realizar selección genómica, ya sea incrementando el número de lavados en los programas MOET o usando OPU de forma intensiva. El número de embriones producidos mediante el uso repetido de sesiones de OPU-fecundación *in vitro* (FIV) es 2 o

3 veces superior al obtenido mediante los programas MOET, alcanzándose cifras en torno a 70 crías/donante/año [19, 20].

1.3. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos se ha utilizado durante más de dos décadas, ya que supone un sistema de económico que permite obtener un número elevado de embriones a bajo coste, para su empleo en: a) líneas de investigación de desarrollo embrionario preimplantacional, b) para su empleo en tecnologías de reproducción asistida (ART) como la transferencia nuclear (clonación) y la producción de animales transgénicos [21].

El complejo proceso de PIV de embriones bovinos se inicia con la recuperación de ovocitos inmaduros a partir de ovarios. A continuación se realiza la maduración *in vitro* (MIV), durante la cual, en el ovocito se suceden cambios nucleares y citoplasmáticos para convertirse en un ovocito maduro [22]. Posteriormente, se lleva a cabo la FIV de estos ovocitos maduros y los cigotos resultantes se mantienen en cultivo *in vitro* (CIV) durante su desarrollo hasta el estadio de mórula o blastocisto. Los embriones PIV en estadio de blastocisto pueden ser utilizados para: a) su transferencia a hembras receptoras sincronizadas [23-26] b) criopreservación y almacenamiento [27, 28], o bien c) pueden ser objeto de estudio para la evaluación de la calidad embrionaria [29, 30] y la presencia de marcadores genéticos asociados a caracteres genéticos de importancia económica [1].

La PIV de embriones bovinos se lleva a cabo en condiciones subóptimas que provocan una alteración en el patrón de expresión génica del embrión respecto a su desarrollo *in vivo* [31-33]. Además es un proceso poco eficiente. El 90% de los ovocitos alcanzan la metafase II de madurez, y el 80% de los ovocitos maduros tienen éxito en la fecundación *in vitro* y continúan con la subsiguiente división embrionaria a estadio de 2 blastómeras 24-48h después de la fecundación. Sin embargo, 7 días post-fecundación, sólo el 30-40% de los ovocitos inmaduros alcanzan el estadio de blastocisto [30]; y de estos embriones, sólo el 40-50% son gestados tras su transferencia a una hembra

receptora [34, 35]. Por tanto, la etapa más ineficiente del proceso de PIV de embriones bovinos tiene lugar desde el estadio de 2 blastómeras hasta el embrión en estadio de blastocisto [25].

Los puntos críticos durante el proceso de PIV son: a) existe una gran variabilidad en el conjunto de ovocitos utilizados ya que provienen de ovarios de distintas vacas con distinta fase de ciclo estral y distinta fase de onda folicular [36], b) existe variabilidad en cuanto a la capacidad fecundante de los eyaculados, ya provengan de un mismo toro o bien de toros distintos [37], y c) los cambios en las condiciones de CIV pueden alterar dramáticamente la calidad del embrión [29-31]. Por otra parte, los embriones PIV son considerablemente de peor calidad que los embriones obtenidos in vivo y con frecuencia los primeros se han asociado con anomalías fetales tras su transferencia a receptoras sincronizadas [38]. Hay numerosos trabajos en la bibliografía que apoyan esta afirmación, basándose en caracteres morfológicos del embrión, su criotolerancia, así como sus patrones de expresión génica y las tasas de gestación después de su transferencia [39].

1.4. BIOPSIA Y GENOTIPADO DE EMBRIONES BOVINOS

Actualmente en los programas de transferencia embrionaria, la selección de los embriones aptos para ser transferidos está basada en la morfología y el valor genético esperado [40]. Sin embargo, la eficiencia de los programas de mejora genética podría incrementarse si la selección del embrión se realiza basándose en características deseables relacionadas con: sexo, presencia de genes de importancia económica (p.e. producción de leche, crecimiento, fertilidad, etc.), calidad embrionaria, y ausencia de enfermedades. Teóricamente, es posible realizar la evaluación del ADN embrionario para estos caracteres, mediante el análisis genético a partir de biopsias de embriones en estadio preimplantacional [41].

El interés por el genotipado de embriones ha existido incluso antes de la emergencia de los nuevos procedimientos de selección genómica, que hoy permiten el análisis de miles de marcadores genéticos [19]. Los resultados

reportados en la literatura hasta la fecha, [1, 42] se han basado en el genotipado de un número limitado de marcadores. Peippo et al. demostraron que es posible genotipar biopsias embrionarias para un número limitado de micro satélites, sin afectar con ello a la viabilidad embrionaria y a su capacidad de implantación y normal gestación tras su transferencia a una hembra receptora [1]. Igualmente, Guignot et al., reportaron el genotipado de biopsias para unos pocos marcadores, para evaluar la sensibilidad al scrapie [42]. El resultado más reciente, es el publicado por el programa “TYPAGENAE”, en el cual se prueba la eficiencia del genotipado de biopsias embrionarias para un kit de 45 microsatélites correspondientes a la primera generación de SAM [43-45].

1.4.1. VENTAJAS DEL GENOTIPADO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS

Se han realizado cálculos para estimar las ventajas genéticas y económicas de usar el genotipado embrionario asociado a programas MOET, comparado con el uso único de la transferencia embrionaria convencional. Las simulaciones basadas en el uso de la primera generación de marcadores SAM utilizando datos reales obtenidos del empleo de hembras y progenies incluidas en programas genéticos [46] demuestran que el uso del genotipado embrionario presenta grandes ventajas para las primeras evaluaciones genéticas realizadas a crías de hasta 1 año de edad.

El uso de la primera generación de marcadores SAM presenta algunas limitaciones que afectan negativamente el escenario del genotipado. Estas limitaciones son debidas a la falta de precisión correspondiente a: a) la información genética de las hembras donantes jóvenes, y b) la evaluación genotípica usada para seleccionar los embriones. Estos problemas hoy en día carecen de importancia y prácticamente han desaparecido debido a: i) mejoras en el conocimiento de los padres jóvenes, obtenido mediante el análisis de información generada a través de consecutivas generaciones, y ii) el aumento de ganancia en precisión obtenida mediante el uso de chips de 54 k SNPs, o del uso de las futuras evaluaciones del genoma completo [2].

1.4.2. METODOLOGÍAS DE BIOPSIA EMBRIONARIA

Existen varias metodologías disponibles para tomar biopsias embrionarias preimplantacionales. Los dos métodos más usados son: la aspiración y la microsección; ambos son útiles para aplicarlo en embriones producidos *in vivo* e *in vitro*.

1.4.2.1. MÉTODO DE ASPIRACIÓN

Este procedimiento, consiste en la extracción de células (blastómeros) del embrión en estadio de mórula. El embrión se inmoviliza mediante pipeta (holding), mientras se aspiran las blastómeras con otra pipeta [47]. Un requisito necesario para obtener óptimos resultados con este procedimiento, es la ausencia de interacciones célula- célula; esto significa que los estadios embrionarios óptimos para obtener biopsias mediante aspiración son los previos al estadio de mórula compactada. Se pueden coleccionar de 2 a 4 células de una mórula de 12-32 células, haciendo un daño mínimo a la zona pelúcida y al embrión [1]. Usando este método, un técnico de laboratorio entrenado puede realizar 10 biopsias por hora aproximadamente [41].

La ventaja de este método es la permanencia del embrión dentro de la zona pelúcida; esto es un factor determinante para la supervivencia embrionaria tras su criopreservación [48]. Los autores coinciden en que esta pequeña agresión contra el embrión posee un efecto muy reducido sobre la tasa de preñez tras su transferencia a una hembra receptora. La principal desventaja de esta metodología, es la cantidad limitada de células que se pueden coleccionar [48-50]. Otra desventaja radica en que, existe la posibilidad de que el genotipo de las células aspiradas no sea representativo del potencial de desarrollo adulto del embrión; además, existe la posibilidad de que la biopsia incluya a un corpúsculo polar, lo cual justificaría la alta incidencia de anomalías cromosómicas en embriones bovinos [51]. Otra desventaja de este método es la necesidad de contar con equipamiento específico y con personal suficientemente capacitado y con experiencia para realizar las biopsias [52]. El método de aspiración puede ser usado también para blastocistos, en este caso

se implica el uso de un tercer micromanipulador, provisto de una pipeta diseñada para separar las células colectadas mediante aspiración [53].

1.4.2.2. MÉTODO DE MICROSECCIÓN

Mediante este método, una pequeña sección del embrión es cortada con una hoja de bisturí mediante un movimiento vertical. La inmovilización del embrión en la superficie de corte, se induce mediante el uso de medios libres de proteínas [54], o trabajando sobre una superficie irregular [55]. En la mayoría de los casos, la micro hoja se acopla a la extensión de un micromanipulador; no obstante, el procedimiento se puede realizar de forma completamente manual [1, 56].

Lebourhis et al. realizaron exitosamente, genotipados a partir de biopsias de 4 a 10 células procedentes de un blastocistos de día 6-7 [43]. El recuento celular promedio reportado por Peippo et al. para biopsias tomadas manualmente, en embriones de 7-8 días post inseminación, fue de 14,4 (rango de 3-36) y 25,4 (rango de 13-47), para biopsias de tamaño < 20% y >20% del blastocisto, respectivamente [1]. El recuento celular del embrión resultante tras la biopsia fue de 79,7 (rango de 23-117) y 66,3 (rango de 30-105), para cortes <20% y >20% del tamaño total del embrión, respectivamente. La principal desventaja de este método es la eclosión de la zona pelúcida inducida por el corte, además del daño celular que ocurre en los bordes de la zona de corte.

Este método es usado comúnmente en blastocistos en cuyo estadio de desarrollo se han diferenciado las células de la masa celular interna y el trofotodermo; por lo tanto, es posible realizar una biopsia del trofotodermo sin producir daños en la ICM. Obviamente si se toma una biopsia de la masa celular interna, se interrumpiría el desarrollo normal del embrión. Este método puede usarse igualmente en mórulas, pero es necesario que el tamaño de la biopsia sea reducido, por lo cual existe la posibilidad de que la muestra se extravíe durante su procesamiento [49, 52]. Usando este método, un técnico de laboratorio con experiencia puede realizar cortes con un rendimiento de 15 biopsias por hora [56].

Tomando en consideración que el método de aspiración requiere mayor destreza en la técnica, e incrementa el riesgo de “allele drop out”, la técnica de microsección parece ser la más conveniente [1].

1.4.3. SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA Y TASA DE GESTACIÓN DE EMBRIONES BIOPSIADOS

Al realizar biopsias del trofotodermo embrionario bovino, es muy importante que el método utilizado no repercuta negativamente sobre la viabilidad embrionaria. En este punto existe un conflicto de intereses, dado que, para realizar evaluaciones genéticas en una biopsia embrionaria, esta debe tener el mayor número posible de células, mientras que para conservar la viabilidad del embrión, el tamaño de la biopsia debe ser lo más reducido posible [41].

Humblot et al. determinaron que el efecto de la aplicación de la biopsia en la posterior supervivencia embrionaria es bastante limitado [2]; el autor reporta una tasa de supervivencia de 90% en embriones PIV biopsiados. Peippo et al. reportaron igualmente una elevada tasa de supervivencia 24 h post biopsia, en embriones de 7 dpi (94,6 y 90,6%; para cortes <20% y >20% del tamaño total del embrión, respectivamente) [1]. Además, en la supervivencia embrionaria tras la biopsia no influye que el embrión proceda de PIV o bien haya sido producido *in vivo*. La tasa de desarrollo embrionario *in vitro* posterior a la biopsia de embriones producidos *in vivo* y PIV, es similar (89% vs 93,2%, respectivamente) [2].

La tasa de preñez obtenida tras la transferencia de embriones producidos *in vivo*, de calidad 1 y 2 (clasificación IETS), inmediatamente después de su biopsia mediante microsección, es igual o superior a 60 % [57, 58]. Ponsart et al. reportaron tasas de preñez iguales o superiores a 50 %, al transferir embriones PIV en condiciones de granja, criopreservados tras su biopsia mediante microsección [58]; la misma alcanzó 60 % cuando las transferencias se realizaron en estación. Se ha demostrado que la transferencia de embriones de calidad 3 biopsiados por microsección, no

difieren en cuanto a su tasa de preñez al compararlos con embriones de grado 1 y 2 [59]. Peippo et al. reportaron una tasa de preñez de 44,2% en transferencias de embriones producidos *in vivo*, biopsiados manualmente, con 24 h de recuperación *in vitro* post biopsia [1].

Los anteriores resultados indican que la tasa de desarrollo embrionario y de preñez obtenida al transferir embriones *in vivo* biopsiados y criopreservados, no se ven afectadas directamente por la aplicación de la biopsia.

A pesar de que hay autores que han reportado buenos porcentajes de preñez utilizando embriones PIV y criopreservados [20], se requieren aun mejoras que optimicen el sistema, y el número de partos correspondientes a transferencias de embriones PIV, biopsiados y criopreservados es todavía muy reducido [2].

El potencial de establecimiento de preñez del embrión biopsiado, tras su transferencia, puede ser estimado mediante el análisis genético de la biopsia embrionaria para varios genes candidatos específicos [60]. El citado autor reportó la existencia de una relación entre el perfil transcripcional del embrión y el éxito de la preñez. Los embriones que gestan exitosamente tras su transferencia, presentan altos niveles de expresión en genes relacionados con la implantación (COX2 y CDX2), con el metabolismo de los carbohidratos (ALOX15), factores de crecimiento (BMP15), transducción (PLAU) y genes específicos de la placenta (PLAC8).

1.4.4. MULTIPLICACIÓN DEL ADN DE LA BIOPSIA EMBRIONARIA

El creciente descubrimiento de genes y QTLs codificantes para caracteres y enfermedades de importancia económica [61], ha propiciado el interés en desarrollar técnicas y procedimientos que permitan la realización de múltiples análisis genéticos a partir una biopsia embrionaria. Se estima que una biopsia contiene 1-20 células aproximadamente, las cuales contienen ADN suficiente para realizar un número limitado de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). El número reducido de células obtenidas a partir de la biopsia, es el mayor obstáculo para poder realizar análisis genéticos y/o

genómicos a mayor escala. Con la cantidad de ADN disponible en una biopsia, es posible analizar varios loci mediante PCR múltiplex (p.e, sexaje del embrión, prueba de BLAD), pero con limitaciones (PCR múltiplex para más de 3-4 genes no son robustas) [41].

La solución consiste en incrementar la cantidad de ADN inicial, previo a la realización de la PCR. Esto puede realizarse de dos maneras: bioquímicamente mediante la amplificación del genoma completo (WGA) o biológicamente mediante el cultivo celular de las biopsias para obtener un número elevado de células y en consecuencia de DNA.

1.4.4.1. WGA

Mediante este procedimiento bioquímico se amplifica el genoma completo varias veces, generando una cantidad de ADN suficiente para realizar múltiples análisis genéticos. Se han desarrollado distintos protocolos, con resultados variables [62]. En general, el proceso de amplificación se produce de forma aleatoria; esto tiene el inconveniente de que algunas regiones del genoma se sobre-amplifican mientras que otras regiones se sub-amplifican. El problema se presenta cuando los genes de interés se encuentran en una región del genoma amplificada de manera deficiente, o que no fue amplificada (locus drop-out). Además, ocurre con frecuencia que la calidad de la amplificación de una de las 2 copias cromosómicas sea menor que la otra. Esto puede generar problemas de discriminación alélica (allele drop-out), en donde un alelo localizado en el cromosoma mal amplificado desaparece al momento de realizar las pruebas. La consecuencia directa de este hecho, es que una muestra originalmente heterocigota sea incorrectamente diagnosticada como homocigota [63].

Un problema adicional de la amplificación del genoma completo, es el riesgo de contaminación de la muestra. Al amplificar cantidades diminutas de ADN provenientes de la biopsia, existe el riesgo de amplificar igualmente cualquier pequeña contaminación existente. Esta manera de amplificar el genoma completo es muy útil para casos donde se necesite analizar regiones

puntuales del genoma, pero presenta serias limitaciones cuando se requiere analizar el genoma completo para miles de SNPs, debido a la gran cantidad de errores que se producen durante la amplificación e interpretación de los SNPs.

1.4.4.2. CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONARIAS

Otro método existente para lograr incrementar la cantidad inicial de ADN es la multiplicación de las células de la biopsia mediante técnicas de cultivo celular. Utilizando las mejores condiciones y medios de cultivo, es posible obtener miles o millones de células, lo cual representa una cantidad de ADN suficiente para realizar todas las pruebas necesarias. El mayor obstáculo de esta técnica es la dificultad existente para que la biopsia se adhiera a la superficie de la placa de cultivo y se divida correctamente.

1.5. CULTIVO IN VITRO DE TROFECTODERMO EMBRIONARIO

1.5.1. TROFECTODERMO EMBRIONARIO EN MAMÍFEROS

En los mamíferos, el embrión en estadio de blastocisto está compuesto por dos tipos celulares: la masa celular interna (ICM) y las células del trofotodermo (TE) o trofoblasto. La ICM es la responsable de la formación del embrión y sus membranas, mientras que las células del trofotodermo forman la placenta [64]. Las células del trofoblasto son las primeras que se diferencian durante la embriogénesis [65-67].

El trofotodermo es un tejido extraembrionario que cumple varias funciones de gran importancia en el proceso de desarrollo pre y post implantacional. En el embrión bovino, se encuentra morfológicamente definido a los 6-7 días post fertilización del ovocito, en la etapa de formación de la mórula y posterior blastocisto [68, 69]. Durante el periodo de peri implantación, las células del trofoblasto producen varias moléculas específicas vitales para el mantenimiento y desarrollo exitoso de la preñez [70, 71]: a) el interferón- τ [72, 73], producido por las células trofoblásticas mononucleadas [74], que actúa

como la principal señal de reconocimiento de gestación y estimula el mantenimiento del cuerpo lúteo durante la gestación; y b) el lactógeno placentario [75], una hormona polipeptídica de estructura similar a la prolactina que es secretada por las células binucleadas del trofotodermo, que aparece tanto en circulación materna como fetal [76].

1.5.2. LÍNEAS CELULARES DE TROFECTODERMO BOVINO

Las líneas celulares de trofotodermo embrionario han sido desarrolladas en distintas especies: cerdo [77], ratón [78] y vaca [79-82]. En la especie bovina se han utilizado mayormente como modelo para el estudio del desarrollo embrionario temprano y placentación. Estas líneas reproducen el crecimiento celular, la morfología y el funcionamiento del trofotodermo bovino *in vivo* en fase de elongación [82].

Entre las principales investigaciones realizadas, partiendo del desarrollo de un modelo *in vitro* del trofotodermo embrionario bovino, se encuentran: la determinación de marcadores *in vitro* para la identificación de los tipos celulares embrionarios [80]; el desarrollo de sistemas que no requieran cocultivo con otras líneas celulares [79]; y la caracterizaron de líneas celulares de origen partenogénico, como modelo comparativo para el estudio de los fallos que se producen en la placentación [81] y en la reprogramación nuclear de los embriones producidos por transferencia nuclear [82].

1.5.3. SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO DE TROFECTODERMO BOVINO

Se han desarrollado líneas celulares trofoblásticas utilizando sistemas de cultivo celular *in vitro* basados en un substrato de células de fibroblastos embrionarios de ratón (mEF) [80]. El cultivo celular se inicia con la siembra de blastocistos bovinos eclosionados sobre una monocapa de mEF inactivados. Este substrato optimiza la adherencia de las células embrionarias a la superficie de cultivo y promueve el crecimiento celular. El cultivo primario se establece y se inicia el crecimiento celular (75% de los blastocistos inician crecimiento). El cultivo primario de trofotodermo bovino a menudo está

contaminado por el crecimiento de células de endodermo; aunque este puede escindirse fácilmente, dado su crecimiento en superficie sobre las células de TE, sin adhesión celular a las mismas.

Shimada et al. establecieron una línea celular trofoblástica utilizando un sistema de cultivo sustentado en el uso de medios de cultivo celulares, condicionados por cultivos primarios de fibroblastos endometriales bovinos, y utilizando superficies de cultivo optimizadas [79]. El desarrollo de un sistema de cultivo en ausencia de mEF es muy deseable, ya que de este modo todos los resultados de estudios *in vitro* llevados cabo con líneas de TE bovino serán atribuidos únicamente al TE y no a la otra línea celular o bien como consecuencia del cocultivo.

Shimada et al. desarrollaron el cultivo de TE bovino en placas de cultivo celular tratadas previamente con una suspensión de colágeno, para optimizar la adherencia celular a la superficie de cultivo [79]. Utilizaron como medio de cultivo un medio condicionado por fibroblastos uterinos bovinos.

La adhesión del embrión y su posterior crecimiento se observa tras una semana de cultivo, momento en el que se alcanza la confluencia celular. Las sucesivas expansiones se realizan cada 7-10 días. La línea celular BT-1 fue cultivada de forma continua, sin observarse senescencia ni cambios morfológicos, por más de 18 meses y 75 pasajes.

Shimada et al. reportaron adhesión del embrión a las 24h de cultivo, en el 91% de los casos, mientras que solo el 64,9% y 34,2% de los embriones se adhirieron a la placa de cultivo cuando empleó medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino o medio de cultivo sin suero respectivamente [79].

El medio condicionado por fibroblastos endometriales bovinos acelera el crecimiento de la línea celular BT-1. El recuento de núcleos celulares a los 4 días de iniciado el cultivo es el doble en el medio condicionado por fibroblastos que en los medios convencionales. Este resultado sugiere que el medio condicionado por fibroblastos contiene factor (es) que estimulan el crecimiento de las células del trofoblasto. El citado autor no posee evidencia directa respecto a la identificación de estos factores.

Un procedimiento alternativo para realizar las expansiones celulares, fue el reportado por Shimada et al. [79]. Este consiste en el cultivo de las vesículas celulares liberadas al medio por la monocapa de células trofoblásticas. Tras un cultivo continuado de TE, aparecen en la monocapa celular unas estructuras cavernosas “dome-like”. Estas estructuras continúan acumulando fluido hasta formar vesículas celulares de 100µm- 1 mm de tamaño, las cuales se disocian del cultivo y permanecen en suspensión. Al expandir estas vesículas a otra placa de cultivo celular, se adhieren a la superficie de la placa en 24h. Las células de TE presentan estrechas uniones intercelulares (tight junctional connections) en la porción apical de las células, que impiden el intercambio de fluido y favorecen la acumulación de fluido dentro de las células. Aunque las uniones entre ellas son fuertes, las uniones a la placa son muy débiles y este es un factor muy importante para la proliferación. También se observan numerosos desmosomas debajo de las “tight junctional connections” [83]. El ingreso de fluido en la cavidad del blastocisto, es debida actividad polarizada $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ del sistema de transporte de sodio en las blastómeras [64].

Debido a las limitaciones técnicas implicadas en la obtención de DNA amplificado, y a la incompatibilidad que presenta con la nueva generación de paneles de alta densidad de SNPs, es necesario el desarrollo de un sistema de cultivo que permita la producción de cultivos celulares trofoblásticos partiendo del cultivo de biopsias embrionarias. Esto permitirá producir suficiente cantidad de DNA de buena calidad, para realizar diversos análisis genómicos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consistió en determinar un sistema de cultivo así como un medio de cultivo celular adecuados, que permitiera optimizar la adherencia y el crecimiento celular de biopsias de trofotodermo embrionario bovino, con el objeto de disponer de suficiente ADN genómico, para la realización de análisis genómicos en embriones preimplantacionales. Este objetivo principal le podemos dividir en los siguientes:

1. Establecimiento de un cultivo celular de trofotodermo embrionario bovino a partir de cada embrión en estadio de blastocisto, mediante procedimiento de biopsia.
 - 1.1. Desarrollo de un sistema de cultivo que favorezca la rápida adhesión de la biopsia embrionaria.
 - 1.2. Desarrollo de un medio de cultivo que favorezca el rápido crecimiento celular a partir de la biopsia embrionaria.
2. Establecer una metodología para biopsiar embriones y cultivar *in vitro* dichas biopsias, sin afectar a la supervivencia embrionaria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCCIÓN IN VITRO DE BLASTOCISTOS BOVINOS

3.1.1. RECOLECCIÓN DE OVOCITOS

Todos los reactivos fueron comprados a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO.), salvo las excepciones que se indican. Para este trabajo se usaron ovarios provenientes de hembras sacrificadas en mataderos comerciales. Se seleccionaron ovarios de animales reproductivamente maduros (mayores de 15-18 meses de edad) y se colectaron en solución salina fisiológica (0,9% NaCl) suplementada con gentamicina 0,1%, en recipientes isotérmicos a 35-36° C. Ya en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces con solución salina, y se mantuvieron en un baño a 38,5° C.

La recuperación de los ovocitos se realizó mediante la aspiración de los folículos ováricos de 2-8 mm de diámetro, usando una jeringa y una aguja hipodérmica (18 G). El líquido folicular se depositó en un tubo de 50 ml a 38,5° C. Tras la decantación de los ovocitos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de ovocitos resultante se diluyó con PBS, para después depositarlo en placas Petri donde se llevó a cabo la selección ovocitaria.

La selección de los ovocitos se basó en la evaluación visual de las características morfológicas reportadas anteriormente [84, 85]. Se escogieron únicamente ovocitos que poseían más de 4 capas de células del cúmulus, completas y compactas (Grado 1), y ovocitos más oscuros en su zona perimetral, con 1-3 capas de células del cúmulus (Grado 2). La evaluación visual se llevó a cabo mediante una lupa estereoscópica (Nikon® SMZ-1500). Los ovocitos seleccionados se lavaron 3 veces en PBS a 38° C para eliminar restos celulares, y dos veces en medio de maduración, previamente equilibrado en incubador a 38° C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

3.1.2 MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

Para la maduración de los ovocitos, se utilizó un medio compuesto por M199 suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% y 10 ng/ml de “epidermal growth factor” (EGF). La maduración se desarrolló en placas de 4 pocillos (Nunc Inc., Roskilde, Denmark) con 500 µl de medio en cada pocillo, en proporción de 50 ovocitos/pocillo. Los ovocitos se mantuvieron en maduración durante 22-24 horas, en incubador a 38,5° C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

3.1.3 FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

La fecundación de los ovocitos madurados se realizó en el medio FIV, con la siguiente composición: medio Tyrode compuesto por bicarbonato sódico 25 mM, piruvato sódico 1 mM, albúmina sérica bovina (BSA) (sin ácidos grasos) 6 mg/ml, de lactato sódico 22 mM y sales de heparina sódica (184 unidades/mg) 10 µg/ml (Calbiochem, San Diego, CA).

Los ovocitos maduros se lavaron en el medio de fecundación y a continuación se transfirieron a placas de 4 pocillos con 250 µl de medio, en proporción de 50 ovocitos/pocillo. Los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante la centrifugación de las dosis de semen descongelado (Toro Somedano IA-2-25-120 Asturiana V) en un gradiente de densidad (1 ml top layer sobre 1 ml de bottom layer) Bovipure™ (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Sweden) a 700 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Los espermatozoides viables obtenidos en el precipitado se centrifugaron en solución salina isotónica Boviwash™ (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Sweden) a 700 x g durante 5 min, para evitar cambios bruscos en el pH y la osmolaridad de la dilución espermática antes de incorporarse al medio de fertilización. El conteo espermático del precipitado resultante se realizó mediante un hemocitometro. La dilución espermática requerida se obtuvo agregando un volumen de medio de FIV adecuado para alcanzar una concentración de 2×10^6 espermatozoides/ml. La concentración final necesaria de 1×10^6 espermatozoides/ml se obtuvo agregando 250 µl de la suspensión a

cada pocillo. Los ovocitos se cocultivaron con la dilución espermática durante 18-22 horas en el incubador, a 38,5 ° C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

3.1.4 CULTIVO IN VITRO (CIV)

Los presuntos cigotos fueron desnudados de las células del cúmulo mediante agitación con vórtex durante 3 min. A continuación se lavaron cuatro veces en PBS y dos veces en medio de cultivo (Fluido Sintético Oviductal Bovino (SOF) + 5% FCS). El cultivo se realizó en un sistema de microgotas de 25 µl de medio cubiertas por aceite mineral, en proporción de 1 embrión/µl. Los embriones se mantuvieron en el incubador a 38,5° C, 5% de CO₂, 5% de O₂, y humedad saturada durante todo su desarrollo, hasta el día 10 (día 0= día de la fecundación).

3.1.5 VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA

Se utilizó como sistema de valoración la proporción de blastocistos producidos en cada día de desarrollo, y como un indicador de calidad para las réplicas utilizadas en los experimentos, se utilizó la tasa de eclosión de la zona pelúcida. Mediante el recuento de los embriones divididos en 2 o más blastómeras se determinó la tasa de división embrionaria temprana a 48 horas post inseminación (hpi). La segunda valoración del desarrollo embrionario se efectuó los días 6-10 post inseminación (dpi), mediante el recuento de la producción de blastocistos. La calidad de los blastocistos producidos fue estimada mediante la valoración de: la tasa de eclosión embrionaria acumulada, para los días 7-10, y la tasa de eclosión individual para cada día de desarrollo, respecto a los blastocistos eclosionados totales producidos hasta el día 10.

3.2 ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES DE TROFECTODERMO BOVINO EN CULTIVO PURO

3.2.1 DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO ÓPTIMO PARA LA ADHESIÓN DE LA BIOPSIA

Se realizaron múltiples experimentos para determinar un sistema óptimo que facilite una rápida adhesión de la biopsia de trofectodermo a la placa de cultivo mediante el empleo de distintos soportes de cultivo (no mostrado). Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó como soporte de cultivo una placa P 35 (8,5 cm²), con microgotas de medio de cultivo de 10 µl (0,13 cm²), que permite obtener unas 13000 células en cultivo confluyente (Figura 1).

Se prepararon micro gotas de 10 µl de gelatina al 0,1% bajo aceite mineral durante 30 min., para favorecer una rápida adhesión celular. El tiempo de adhesión celular supone un limitante en el éxito de establecimiento del cultivo celular de TE bovino. A continuación y tras retirar la gelatina, se inocularon a través del aceite mineral, microgotas de 10 µl de medio de cultivo y se equilibraron durante 3h en el incubador a 38,5 ° C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

Figura 1. Sistema de cultivo de biopsias de trofectodermo bovino en micro gotas 10 µl bajo aceite mineral.



3.2.2 DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO QUE OPTIMICE EL RÁPIDO CRECIMIENTO CELULAR A PARTIR DE LA BIOPSIA

Una vez optimizado el sistema para una rápida adhesión celular, se desarrolló un medio de cultivo óptimo que permitiera un rápido crecimiento celular. Los medios de cultivo evaluados fueron:

- a. Medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos (MCFM) + medio DMEM (1:1), suplementado con EGF (20ng/ml).
- b. Medio condicionado por fibroblastos embrionarios de vaca (MCFV) + medio DMEM (1:1), suplementado con EGF (20ng/ml).
- c. Medio condicionado por cultivo primario de células oviductales bovinas (MCCO) + medio DMEM (1:1), suplementado con EGF (20ng/ml).
- d. SOF + EGF (20ng/ml).
- e. Medio DMEM + EGF (20ng/ml).

Como puede observarse todos los medios fueron suplementados con factor de crecimiento epidermal (EGF), ya que Hambruch y col. Demostraron que el EGF estimula la proliferación de células de trofoblasto bovino [86].

Los componentes del medio DMEM fueron: DMEM (suplementado con 4500 mg/l glucosa, glutaMAX, y piruvato; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% FBS (PAA Laboratories Cölbe Germany), 2 mM glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales y una mezcla de antibióticos compuesta por: 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Un medio de una línea celular se considera condicionado tras un cultivo continuado de una monocapa celular confluyente durante al menos 72h [79].

El medio condicionado se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se alicuotó y se congeló a -20°C [79].

Los cultivos celulares en sistema de microgota se expandieron a pocillos de placa P96 una vez que alcanzaban confluencia celular entorno al día 7-10

desde el inicio del cultivo. La metodología empleada fue la disgregación mecánica con punta amarilla y pipeta automática.

Para evaluar el efecto de los cinco distintos medios en lo referente a la adherencia de la biopsia y su posterior crecimiento, se llevaron a cabo dos experimentos distintos:

3.2.2.1 EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BLASTOCISTOS

El objetivo de este experimento fue determinar el medio de cultivo que mejor optimiza la tasa de adherencia y crecimiento celular (TACC) del trofotodermo embrionario bovino. El experimento está enfocado a dar solución a la necesidad existente de contar con un medio de cultivo que garantice la proliferación de líneas celulares de TE bovino a partir de embriones de 8-10 días.

Para llevar a cabo este primer experimento, se utilizaron blastocistos de 8-10 dpi, tal como se ha descrito en la metodología [87], los cuales fueron cultivados en los distintos medios descritos (Tabla 2). Se determinó la TACC de los embriones cultivados en el sistema de microgota, y de las expansiones celulares realizadas a placa P96, correspondientes a las microgotas que alcanzaron confluencia celular.

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en los 2 experimentos, se analizaron los porcentajes de blastocistos que se adhirieron e iniciaron crecimiento en el sistema de microgotas, y los porcentajes de microgotas que presentaron confluencia celular y que continuaron su crecimiento al realizar expansiones a pocillos de placa P96 para todas las réplicas utilizadas, tanto en cultivos de blastocistos enteros como de biopsias de TE. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en una sola vía entre las medias de los porcentajes para cada medio de cultivo (grupo). La significancia de las diferencias encontradas entre los grupos se determinó realizando el

procedimiento de múltiple comparación, utilizando la metodología Holm-Sidak. En el primer experimento, el análisis de los datos correspondientes al cultivo de embriones enteros en P96, se realizó mediante el ANOVA Kruskal- Wallis en una sola vía por rangos, y la significancia estadística entre los grupos fue determinada realizando el procedimiento de múltiple comparación utilizando la prueba de Tukey.

3.2.2.2 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO, SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS

Una vez determinado el medio que optimiza el rápido crecimiento celular a partir del cultivo de embriones enteros, se evaluaron nuevamente los medios de cultivo descritos (Tabla 3), con el propósito de determinar el medio que optimiza la TACC a partir del cultivo de un número reducido de células. Para llevar a cabo este segundo experimento, se realizó el cultivo de biopsias de TE, obtenidas a partir del corte de blastocistos eclosionados de 8-10 dpi. Los cultivos se iniciaron de manera individual en el sistema de microgota, y de igual manera que en el experimento 1, se realizaron las expansiones a P96.

3.2.3 EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR EN LOS DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO

Una vez iniciados los cultivos celulares, se procedió a realizar el recuento de aquellos blastocistos y biopsias que lograron adherirse al sustrato, y que presentaron crecimiento celular. El recuento se realizó en el cuarto día de cultivo, mediante la visualización de las microgotas que experimentaron el desarrollo de monocapas celulares, y de aquellas que presentaron confluencia celular en los días 7-10. De igual manera, se realizó el recuento de todas las líneas celulares que una vez expandidas a pocillos de placa P96 continuaron su crecimiento celular.

La eficiencia en el crecimiento celular en el sistema de microgota está condicionada por los siguientes parámetros: a) una buena práctica en la toma de la biopsia, b) una rápida adhesión de la biopsia al sustrato y c) un medio de cultivo óptimo que favorezca el crecimiento celular a partir de la biopsia.

3.2.4. PROCEDIMIENTO DE BIOPSIA Y SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA

Se obtuvieron biopsias de células de TE a partir de embriones eclosionados de 8-10 dpi. La selección de los embriones se basó en la evaluación visual de las características morfológicas indicadoras de buena calidad embrionaria. Para cada sesión de corte, los embriones fueron lavados previamente en grupos de 5 en medio M2 (M7167, Sigma Aldrich Company, Ayrshire, UK) a 38,5°C, y seguidamente se procedió a la toma de biopsia de cada embrión depositándolo en una microgotas de M2. Con una hoja de bisturí (n°18) se realizó una pequeña incisión en la superficie del plástico, para permitir la inmovilización del embrión sin necesidad por tanto de emplear alguna sustancia adherente. A continuación se procedió al corte del embrión, evitando dañar la ICM.

Una vez realizado el corte, es posible que ambas porciones del embrión queden adheridas a los bordes de la superficie; estas se logran separar manipulándolas cuidadosamente con una pipeta pasteur. La biopsia de trofotodermo se lavó previamente en una placa P35 con 2 ml del medio de cultivo correspondiente, y se transfirió a su cultivo en microgota.

Como se mencionó anteriormente, los estudios realizados a partir de biopsias embrionarias están condicionados a mantener elevada la viabilidad del embrión resultante, de manera que, las técnicas y procedimientos empleados para obtener las biopsias no repercutan negativamente en la capacidad del embrión para implantarse y generar preñez. Para realizar los estudios de supervivencia embrionaria, se utilizaron blastocistos transferibles de 8 dpi, a los cuales se les practicó una biopsia de forma manual. Se determinó la tasa de supervivencia embrionaria *in vitro* 24 h post biopsia. Los embriones biopsiados se lavaron en una placa p35 con 2 ml de medio SOF suplementado con 5%

FCS y 5,56 mM de Glucosa, y se incubaron en grupo en microgotas de 50 μ l bajo aceite mineral durante 24 h, en incubador a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂ y humedad saturada, para la evaluación de supervivencia embrionaria tras la toma de biopsia. Se determinó la proporción de blastocistos biopsiados que sobrevivían a la biopsia y que re-expandían.

3.2.5. RECUENTO CELULAR DE LAS BIOPSIAS

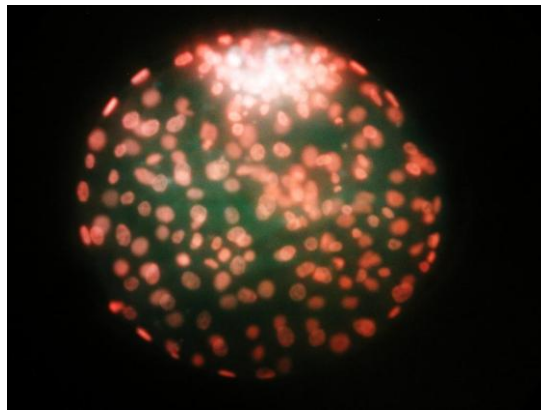
Con el objeto de conocer la proporción de células biopsiadas respecto del embrión intacto, y de conocer el número de células de partida para el establecimiento de la línea celular de TE, se realizó el recuento del número de células que contienen las biopsias obtenidas a partir del corte de blastocistos transferibles de 8 dpi. En una primera serie de réplicas, se realizó por un lado el recuento de células totales en embriones completos, y por otro lado el recuento celular de las biopsias. En otra serie de réplicas, se realizaron recuentos celulares tanto en las biopsias obtenidas, como en el embrión restante; para de esta forma determinar directamente el número de células del embrión biopsiado.

Para el recuento celular, se realizó la tinción de los núcleos celulares usando una modificación del protocolo de tinción diferencial [88]. Para lograr la permeabilización parcial del TE y posterior tinción, los blastocistos se incubaron en 300 μ l de PBS con 0,2% de Tritón X-100 y 100 μ g/ml de yoduro de propidio en oscuridad, durante 50 seg. a temperatura ambiente. Los blastocistos una vez fijados y teñidos se sumergieron en glicerol, teniendo la precaución de no incorporar solución de fijación. Finalmente, los blastocistos se montaron individualmente sobre un portaobjetos en gotas de glicerol, y se cubrieron cuidadosamente con un cubre objetos para su posterior visualización y recuento celular. Para realizar la tinción de las biopsias de TE, se permitió la recuperación de la biopsia durante 3h tras el corte, en medio SOF suplementado con 5% FCS y glucosa 5,56 mM, y se aplicó el protocolo de tinción con yoduro de propidio. El recuento de núcleos celulares, se realizó a partir del análisis de fotografías obtenidas a través de una cámara fotográfica (Nikon Coolpix, Japan) adaptada a un microscopio invertido (Nikon Eclipse

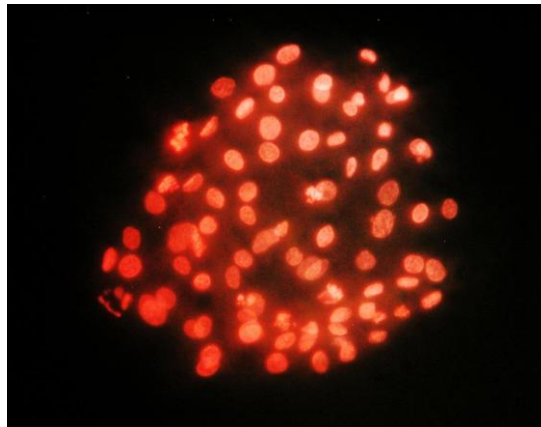
TE300), equipado con una lámpara de fluorescencia y filtros de excitación (Figura 2).

Figura 2. Imagen representativa de a) embrión de 8 dpi marcado con yoduro de propidio, b) Biopsia de blastocisto de 8 dpi, teñido con yoduro de propidio para su recuento celular.

A



B



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA DE LAS RÉPLICAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA

Para realizar la evaluación de los medios de cultivo, se recogieron 1219 ovarios, de los cuales se aspiraron 5286 COCs provenientes de folículos de 2-8 mm, y se lograron cultivar 4420 presuntos cigotos (83,6 % de los COCs aspirados). Se utilizó la valoración de la producción de blastocistos y de la tasa de eclosión embrionaria, como indicadores de calidad, para las 10 réplicas utilizadas.

El desarrollo embrionario observado, se detalla en la Tabla 1. Se registró una proporción de cigotos divididos tempranos de 85,4%, y una producción de blastocistos comprendida entre 26-30% para los días 7-10 dpi. La tasa de eclosión acumulada respecto a la producción de blastocistos, para cada día de desarrollo, aumentó notablemente a partir del día 8 (28,9%) respecto al día 7 (1,0%); luego aumentó para los días 9 y 10 hasta un valor de 54%. En el día 10, la producción de blastocistos se detuvo y continuó la eclosión de una proporción baja de embriones que mostraron un desarrollo retrasado. No se registraron blastocistos de día 6 eclosionados; la mayor proporción de eclosiones ocurrieron en los días 8 (36,7%) y 9 (47,7%).

La primera dificultad que observamos a la hora de utilizar biopsias para iniciar cultivos primarios, fue que el tamaño de la biopsia y el sistema de cultivo inicial eran claves para permitir que la biopsia se pegara a la placa de cultivo y las células se dividieran. Por este motivo, antes de analizar el mejor medio de cultivo, realizamos un trabajo previo comparando un sistema de cultivo en microgota (en placa tratada con gelatina) y un sistema de cultivo abierto, y observamos que solo en el sistema de microgota, la biopsia era capaces de pegarse y crecer eficientemente. En segundo lugar comparamos biopsias que contenían aproximadamente el 40 o el 20% del embrión de día 8 de desarrollo, y observamos que en ambos casos la supervivencia del resto del embrión biopsiado era buena, pero que solo cuando realizábamos biopsias del 40%

obteníamos una buena tasa de adherencia y crecimiento. Con este trabajo preliminar teníamos un sistema que permitía a las biopsias pegarse al medio de cultivo y crecer, y que nos permitía analizar el resto de objetivos del trabajo.

4.2. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TROFECTODERMO EN BLASTOCISTOS ENTEROS

Se cultivaron un total de 216 blastocistos enteros eclosionados de 8-10 dpi en el sistema de microgota en tres replicas independientes. La mayor tasa de adherencia y crecimiento celular (TACC) se obtuvo en el MCFM (100%), aunque este medio no presentó diferencias significativas respecto al MCCO (97,8%). La TACC resultante de las expansiones realizadas en P96 correspondientes a las microgotas que presentaron confluencia celular, se describen en la Tabla 2. El medio de cultivo donde se registró una mayor eficiencia, fue el MCFM (100%), aunque nuevamente no mostró diferencias significativas con el grupo MCCO (81,8%).

Tabla 1. Desarrollo embrionario *in vitro* de las 10 réplicas usadas para realizar la evaluación de los medios de cultivo

	División	Producción de blastocistos				
		n				
		%(media+ESM)				
		Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
N	3788	287	1149	1280	1329	1329
	85,4±2,1	6,5±1,5	26,2±2,2	28,9±1,7	30,1±1,7	30,1±1,7
BEA			14	287	602	696
			1,0±0,4	22,0±3,4	46,0±3,3	54,0±3,5
BED			14	273	315	94
			1,8±0,6	36,7±4,0	47,7±3,1	13,8±2,3

N: número de COCs cultivados; BEA: Blastocistos eclosionados acumulados, y su proporción respecto a la producción de blastocistos; BED: blastocistos eclosionados en cada día, y su proporción respecto a los 696 blastocistos totales eclosionados al día 10; ESM: error estándar de la media.

Tabla 2. Tasa de adherencia y crecimiento celular del trofectodermo embrionario bovino en microgotas (μ G) o placas P96, utilizando blastocistos de 8-10 dpi.

	Medio de cultivo celular				
	DMEM	SOF	MCFM	MCCO	MCFV
N	48	71	25	39	33
TACC en μ G	42	56	25	38	22
n					
%(Media \pm ESM)	87,0 \pm 4,2 ^c	79,1 \pm 3,6 ^{bc}	100,0 \pm 0,0 ^a	97,8 \pm 2,2 ^a	66,7 \pm 3,0 ^b
TACC en P96	21	0	25	31	7
n					
%(Media \pm ESM)	48,9 \pm 5,1 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^a	81,8 \pm 1,6 ^a	31,6 \pm 3,0 ^b

N: número de blastocistos cultivados en micro gotas; MCFM: medio condicionado por fibroblastos murinos; MCCO: medio condicionado por células oviductales bovinas; MCFV: medio condicionado por fibroblastos bovinos; TACC: tasa de adherencia y crecimiento celular; μ G: micro gota; ESM: error estándar de la media; ^{abc}: Diferentes súper índices en misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05)
Se utilizaron 3 replicas

4.3. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL USO DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA TASA DE ADHERENCIA Y CRECIMIENTO CELULAR DEL TE, A PARTIR DEL CULTIVO DE BIOPSIAS EMBRIONARIAS

Se realizaron 3 replicas para evaluar el efecto de los medios de cultivo sobre la eficiencia de la TACC, en cultivos de biopsias de TE en microgota. La mayor TAAC se registró cuando se usó el MCFM (73,9%), observándose en muchos casos una adhesión de la biopsia con inicio de proliferación, tan sólo 48 h después de iniciado el cultivo (Figura 3)

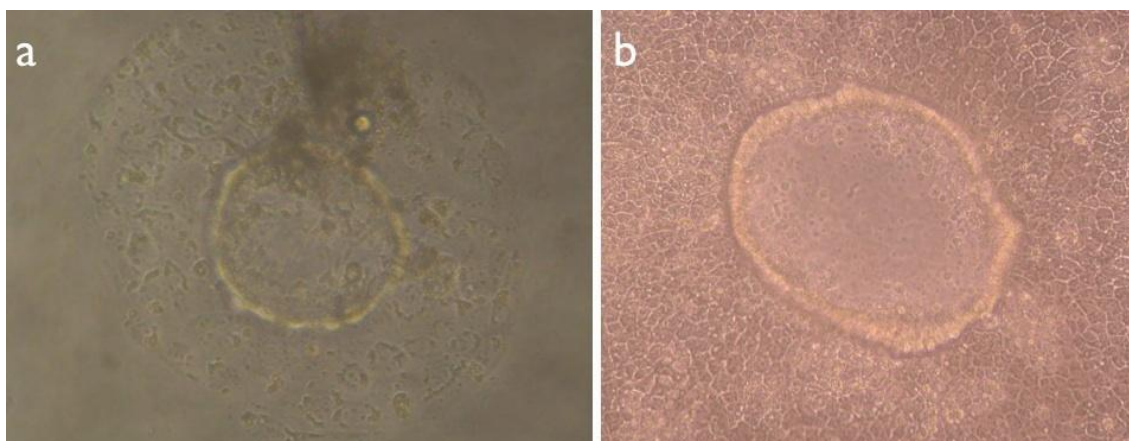
Respecto al cultivo de expansión de la biopsia en P96 (Tabla 3), tras alcanzar confluencia celular en microgota una vez transcurridos 7-10d de iniciado el cultivo (Figura 3), se observó que los medios que mostraron una mayor tasa de crecimiento celular fueron DMEM (55,6%), MCFM (48,2%) y MCCO (43,8%); Mientras que SOF resultó el peor medio de cultivo para la expansión de la biopsia (0,0%). Una vez transcurridos 7-10 días de cultivo celular, comienzan a aparecer en la monocapa las primeras cavernas y vesículas típicas del cultivo *in vitro* de TE bovino (Figura 3).

Tabla 3. Tasas de adherencia y crecimiento celular del trofotodermo embrionario bovino en microgotas (μ G) o placas P96, utilizando biopsias de blastocistos de 8-10 dpi.

	Medio de cultivo celular				
	DMEM	SOF	MCFM	MCCO	MCFV
N	35	42	42	69	33
TACC en μ G	18	15	31	41	13
n					
%(Media \pm ESM)	51,6 \pm 1,5 ^b	35,5 \pm 2,7 ^c	73,9 \pm 1,6 ^a	57,8 \pm 1,5 ^b	39,4 \pm 3,0 ^c
TACC en P96	10	0	15	18	4
n					
%(Media \pm ESM)	55,6 \pm 5,6 ^a	0,0 \pm 0,0 ^b	48,2 \pm 4,3 ^{ac}	43,8 \pm 3,4 ^{ac}	30,0 \pm 21,5 ^c

N: número de blastocistos cultivados en μ G; MCFM: medio condicionado por fibroblastos murinos; MCCO: medio condicionado por células oviductales bovinas; MCFV: medio condicionado por fibroblastos bovinos; μ G: micro gota; P96: pocillo de placa P96; ESM: error estándar de la media; ^{abc}: Diferentes súper índices en misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). Se utilizaron 3 replicas.

Figura 3. Proliferación celular a partir de biopsia de trofotodermo bovino en MCFM. a) Adhesión de la biopsia e inicio de proliferación celular tras 24h de cultivo de la biopsia. b) Monocapa celular de TE a partir de biopsia tras 7d de cultivo. Se observa la Aparición de las primeras estructuras tipo “dome like” así como vesículas.



4.4. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA DE LAS RÉPLICAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA Y RECuento CELULAR

Se realizó la valoración del desarrollo y la calidad embrionaria, correspondiente a las 10 réplicas utilizadas para llevar a cabo el recuento celular de biopsias y para evaluar la supervivencia embrionaria. Se colectaron un total de 959 ovarios, y se cultivaron 4740 presuntos cigotos.

La proporción de cigotos divididos tempranos fue de 89,0%, tal y como se muestra en la Tabla 4. La tasa de producción de blastocistos entre los días 7 y 8 se mantuvo en el rango de 22-25%. La tasa de eclosión embrionaria acumulada respecto a la producción de blastocistos para cada día de desarrollo, aumentó considerablemente en el día 8 (27,2%) respecto al día 7 (3,0%). No se registraron blastocistos de día 6 eclosionados.

Tabla 4. Desarrollo embrionario *in vitro* de las 10 réplicas utilizadas en los recuentos celulares, y en los estudios de supervivencia al corte de blastocistos de 8dpi.

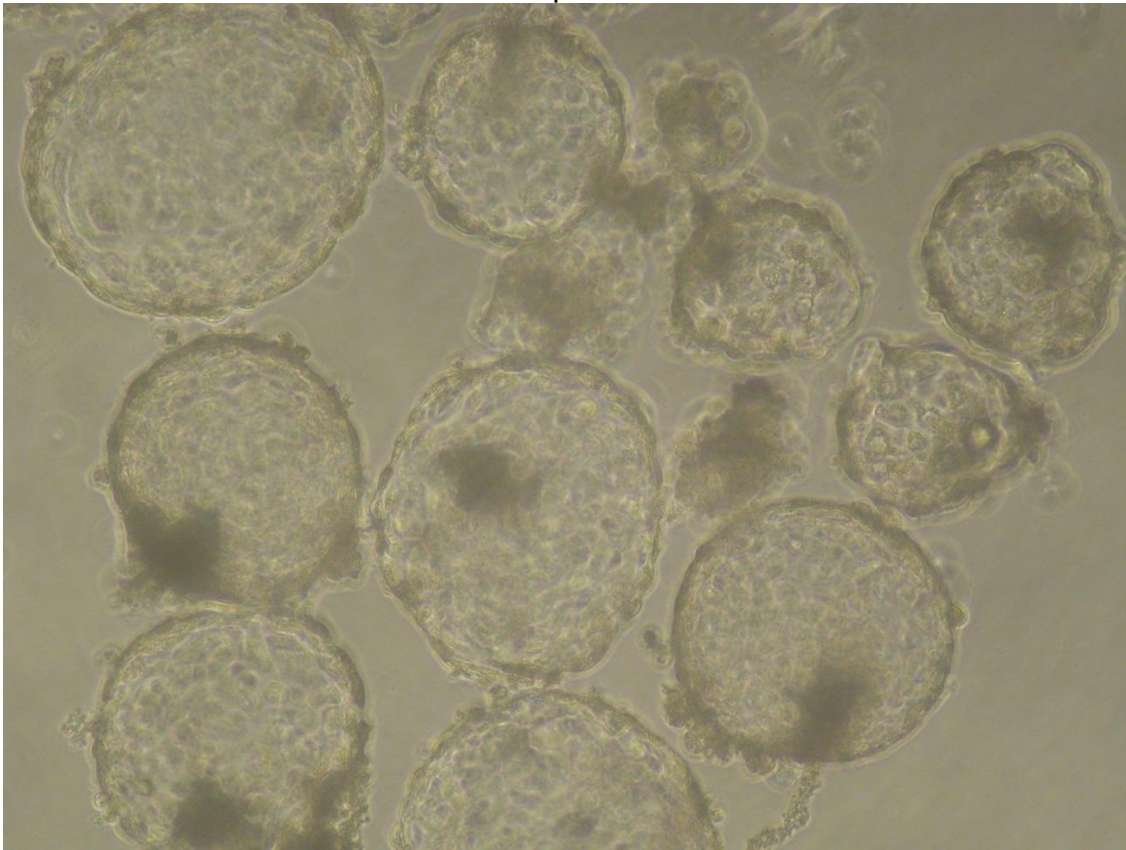
N	Division n %(media±ESM)	Desarrollo embrionario % (media±ESM)				
		Dia 6		Dia 7		Dia 8
		Bl	Bl	Ecl	Bl	Ecl
4740	4226 89,0±0,82	86 2,4±0,64	1048 22,0±1,83	33 3,0±0,79	1217 25,5±1,57	326 27,2±2,59

N: número de cigotos cultivados; Bl: Blastocistos, Ecl: Blastocistos eclosionados acumulados; ESM: error estándar de la media.

4.5. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA POST BIOPSIA.

Para determinar la tasa de supervivencia embrionaria *in vitro* post biopsia, se utilizaron blastocistos de 8 dpi, eclosionados y de buena calidad, evitando el uso de embriones pequeños y apoptóticos de aspecto irregular. Se realizaron biopsias de TE a un total de 190 blastocistos, mostrando una tasa de supervivencia a 24h post biopsia de 82,2 % (Figura 4).

Figura 4. Imagen de blastocistos tras 24h de su biopsia.



4.6. RECUENTO CELULAR DE LAS BIOPSIAS.

En un primer experimento se registró el recuento celular de un total 37 blastocistos eclosionados de 8 dpi. Se obtuvo un recuento promedio de 158,6 células. En un segundo experimento se realizó el recuento celular, después del corte del embrión, tanto de las biopsias embrionarias como del embrión biopsiado. Se realizó el recuento de 25 biopsias (Tabla 5); en las que se obtuvo un recuento celular promedio de 72,4 células (42,4% de las células totales). En el grupo de 25 embriones biopsiados, se obtuvo un promedio de 98,5 células (57,6% de las células totales). La suma promedio de biopsias y embrión biopsiado fue de 170,9 células.

Tabla 5: Recuento de núcleos celulares de biopsias de trofotodermo y el resto del embrión.

	Embrión biopsiado D8 eclosionado	Biopsia de TE de embrión D8 eclosionado	Sumatoria de células
N	25	25	25
Número de células %(media±ESM)	98,5±3,2	72,4±3,8	170,9±4,5
%	57.6	42,4	

N: número de blastocistos ó biopsias utilizadas; D8: día 8; TE: trofotodermo; %: porcentaje respecto a la sumatoria de células; ESM: error estándar de la media

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La principal limitación existente para realizar análisis genéticos en embriones pre implantacionales radica en el número reducido de células que se obtienen a partir de una biopsia embrionaria, y por consiguiente, una muy limitada cantidad de DNA genómico como material de partida. Esto es una limitación porque hasta el momento no existe un procedimiento que pueda multiplicar de forma eficiente esa reducida cantidad de ADN genómico, lo cual permitiría disponer de suficiente cantidad de ADN para llevar a cabo análisis de SNPs en la totalidad del genoma. En el presente trabajo hemos desarrollado un sistema eficiente que permite, a partir de una biopsia embrionaria, el establecimiento de una línea celular pura de trofotodermo bovino, sin necesidad de cocultivar con “feeder layer”, y sin afectar a la supervivencia del embrión. De este modo disponemos de la suficiente cantidad de DNA genómico de cada embrión, para llevar a cabo el análisis de múltiples caracteres productivos de interés económico.

Los embriones bovinos empleados en el trabajo proceden en su totalidad de producción *in vitro*. La metodología de producción *in vitro* de embriones empleada en nuestro laboratorio muestra una tasa media de producción de blastocistos de día 7 de 26,35%; una cifra que se encuentra dentro de los parámetros normales publicados (20-40%) en la actualidad [29]. Por el contrario, la tasa de eclosión acumulada hasta el día 10 (54,3%), se encuentra por encima del rango de 30-50% reportado [89] correspondiente al cultivo embrionario para medios semidefinidos. La mayor proporción de blastocistos eclosionados se produjo entre los días 8-10, que concuerda con los datos descritos en la literatura [21]. Los parámetros de desarrollo embrionario mencionados son indicativos de la buena calidad embrionaria de los blastocistos empleados en el trabajo.

Hasta la fecha sólo se ha conseguido el establecimiento de un número muy limitado de líneas celulares de trofotodermo bovino a partir de biopsia embrionaria. Estos trabajos tenían como finalidad el estudio *in vitro* del proceso de placentación y las líneas celulares se establecieron en cocultivo con “feeder layer” de ratón [80-82] o bien en ausencia de “feeder layer” y gracias al empleo

de un medio condicionado por fibroblastos endometriales bovinos [79]. La relevancia de nuestro trabajo radica en la posibilidad de establecer cultivos celulares primarios de TE a partir de cada embrión entero, con una eficiencia cercana al 100%. Además, puesto que nuestro objetivo era el establecimiento de un cultivo celular primario de TE a partir de una biopsia embrionaria, fuimos capaces de establecer una línea celular a partir de cada biopsia, en el 48% de las biopsias que proliferaron tras el corte (74%). Esta reducción de la eficiencia de establecimiento de una nueva línea celular de TE al 48% en el caso de biopsia celular, es debida por un lado a una reducción en el número de células de partida (70 células que corresponden aproximadamente al 40% del embrión), y por otro lado debido al daño celular durante el procedimiento de biopsia [90].

Estas líneas celulares las establecimos en un medio condicionado por fibroblastos embrionarios de ratón (MCFM), en ausencia de “feeder layer”; y por tanto el DNA genómico extraído de las mismas para posteriores análisis genéticos no presentará contaminantes de otras especies. Los medios condicionados por fibroblastos oviductales y el medio control de DMEM también permitieron una alta eficiencia en el establecimiento de líneas celulares (44% y 56% respectivamente) aunque el crecimiento inicial a partir de la biopsia fue significativamente menor (58% y 52% respectivamente) que en el caso de MCFM. Por tanto MCFM supone un medio óptimo para la rápida adhesión y crecimiento celular de trofotodermo bovino.

Las tasas de supervivencia embrionaria tras la toma de biopsia mediante micro sección de un embrión de 7 dpi, publicadas recientemente, muestran un 90% [1, 2] de eficiencia a las 24h del corte. Humblot .et al. demostraron que la tasa de supervivencia y de desarrollo embrionario no se ve afectada por el procedimiento de biopsia, y además es similar en embriones producidos *in vitro* e *in vivo* [2]. En nuestro laboratorio hemos alcanzado una tasa de supervivencia del 82,2% en embriones de 8 dpi eclosionados y biopsiados. Si tenemos en cuenta que el estado de desarrollo y la calidad de los embriones en el momento de la biopsia así como el tamaño de la biopsia practicada tienen un efecto directo en la calidad de los embriones 24h después de la biopsia [1],

nuestra metodología de biopsia es ligeramente más lesiva al escindir aproximadamente el 40% del embrión.

En este trabajo hemos optimizado un sistema de biopsia y de cultivo, y hemos seleccionado el medio de cultivo celular más adecuados para conseguir cultivos primarios de biopsias de trofodermo embrionario bovino, permitiendo de este modo disponer de suficiente ADN genómico, para la realización de análisis genómicos de embriones preimplantacionales.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- Se necesita una biopsia del trofotodermo con unas 70 células para poder iniciar un cultivo primario de células embrionarias y conseguir multiplicarlas hasta 300 mil con una alta eficiencia.

2.- Se necesitan embriones de más de 150 células para que la biopsia embrionaria (que debe contener un alto número de células) no reduzca su viabilidad.

3.- Solo con un sistema de microgota se pueden iniciar cultivos primarios de las biopsias del trofotodermo con una alta eficiencia.

4.- El cultivo condicionado por fibroblastos embrionarios murinos contiene todos los factores necesarios para el cultivo de la biopsia, y tanto este medio como DMEM permiten el cultivo posterior en placas P96 eficientemente.

5.- Hemos desarrollado un sistema que nos permite usar el genotipado masivo en embriones bovinos sin necesidad de preamplificar el DNA embrionario.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Peippo J, Viitala S, Virta J, Rätty M, Tammiranta N, Lamminen T, Aro J, Myllymäki H, Vilkki J. Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 1373-1378.
2. Humblot P, Le Bourhis D, Fritz S, Colleau JJ, Gonzalez C, Guyader Joly C, Malafosse A, Heyman Y, Amigues Y, Tissier M, Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet Med Int* 2009; 2010: 192787.
3. Boichard D, Fritz S, Rossignol MN, Boscher MY, Malafosse A, Colleau JJ. Implementation of marker-assisted selection in French dairy cattle. In. Montpellier: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); 2002: 1-4.
4. Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 433-443.
5. Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 2001; 157: 1819-1829.
6. Goddard ME, Hayes BJ. Genomic selection. *J Anim Breed Genet* 2007; 124: 323-330.
7. Ducrocq V. Le projet AMASGEN vers la sélection génomique du futur. *Bulletin Technique de l'Insemination Artificielle* 2010; 135: 18-19.
8. Fritz S. Perspectives d'utilisation de la sélection génomique chez les bovins laitiers. *Bulletin Technique de l'Insemination Artificielle* 2010; 135: 15-17.
9. Colleau JJ, Fritz S, Guillaume F, Baur A, Dupassieux D, Boscher MY, Journaux L, Eggen A, Boichard D. Simulating the potential of genomic selection in dairy cattle breeding. In. Thiverval Grignon: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); 2009: 419.
10. Hafez ES. Reproducción e inseminación artificial en animales. 2000.
11. Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 64: 315-325.
12. Georges M, Massey J. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germline manipulation. *Theriogenology* 1991; 35: 151-159.
13. Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 1995; 43: 51-60.

14. Nicholas FW. Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science* 1996; 42: 205-214.
15. Cunningham E. The application of biotechnology to enhance animal production in different farming systems. *Livestock Production Science* 1999; 58: 1-24.
16. Van Arendonk JAM, Bijma P. Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe--a modelling approach. *Theriogenology* 2003; 59: 635-649.
17. Galli C, Lazzari G. Embryo technologies in dairy cattle. 26th European Holstein and Red Holstein Conference, Prague 2005.
18. Thibier M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report, Embryo Transfer Newsletter. 2008: 1.
19. Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59: 651-674.
20. Ponsart C, Marquant Leguienne B, Humblot P. Evolution and future trends for use of embryo based biotechnologies in the bovine. In proceedings 11th Rencontre Recherche Ruminants (3R). Paris (France) 2004: 361-368.
21. Gordon I (ed.). Laboratory production of cattle embryos. 2003.
22. Badr H, Bongioni G, Abdoon A S, Kandil O, Puglisi R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* 2007; 15(4): 355-367.
23. Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* 2003; 79: 245-264.
24. Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyés A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F. Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. *Journal of Dairy Science* 2006; 89: 2510-2518.
25. Lonergan P, Evans ACO, Boland E, Rizos D, Fair T, Duffy P, Sung LY, Du F, Chaubal S, Xu J, Yang X, Tian XC. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. *Theriogenology* 2007; 68: 1128-1137.
26. Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo

yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009; 71: 690-697.

27.Pereira R, Marques C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking* 2008; 9: 267-277.

28.Hasler J. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009; 22: 119-125.

29.Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008; 69: 17-22.

30.Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43: 44-50.

31.Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, Fuente Jdl, Gutiérrez-Adán A. Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 589-595.

32.Lonergan P, Pedersen HG, Rizos D, Greve T, Thomsen PD, Fair T, Evans A, Boland MP. Effect of the Post-Fertilization Culture Environment on the Incidence of Chromosome Aberrations in Bovine Blastocysts. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 1096-1100.

33.Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006; 131: 651-660.

34.Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction* 1995; 10: 3004-3011.

35.Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Touze J, Dessy F. Survival and viability of fresh and frozen-thawed in vitro bovine blastocysts. *Reprod. Nutr. Dev.* 1995; 35: 3-10.

36.Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 2003; 78: 203-216.

37.Van Soom A, Vandaele L, Goossens K, de Kruif A, Peelman L. Gamete origin in relation to early embryo development. *Theriogenology* 2007; 68: S131-S137.

38. Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178-191.
39. Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 137-152.
40. Lindner GM, Wright Jr RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983; 20: 407-416.
41. Van Soom A, Boerjan M (eds.). Assessment of mammalian embryo quality invasive and non-invasive techniques. Kluwer Academic Pub. Group ; 2002.
42. Guignot F, Baril G, Dupont F, Cognie Y, Folch J, Alabart JL, Poulin N, Beckers J-F, Bed'hom B, Babilliot J-M, Mermillod P. Determination of sex and scrapie resistance genotype in preimplantation ovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2009; 76: 183-190.
43. Le Bourhis D, Amigues Y, Charreaux F, Lacaze S, Tissier M, Morel A, Mervant G, Moulin B, Gonzalez C, Humblot P. Embryo genotyping from in vivo biopsed bovine embryos. *Proceedings of 24th AETE 2008*: Abstract pp 188.
44. Le Bourhis D, Amigues Y, Charreaux F, Lacaze S, Tissier M, Guyader-Joly C, Mervant G, moulin B, Vignon X, Gonzalez C, Humblot P. Embryo genotyping from in vivo biopsed bovine embryos after whole genome amplification. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009; 21: 192 (abstr. 187).
45. Humblot P, Le Bourhis D, Amigues Y, Colleau J, Heyman Y, Fritz S, Gonzalez C, Guyader-Joly C, Malafosse A, Tissier M, Ponsart C. Combined use of reproductive technologies for genomic selection in the bovine. *20th European AI Vets Meeting, November 19-20th. Utrecht 2008*: 4-10.
46. Colleau JJ, Fritz S, Ponsart C, Bourhis DI, Lacaze S, Tissier M, Mervant G, Amigues Y, Druet T, Malaeosse A, Boichard D, Humblot P. The value of embryo typing in a marker-assisted selection programme for dairy cattle. In. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); 2008: 427-430.
47. Machaty Z, Paldi A, Csáki T, Varga Z, Kiss I, Bárándi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 98: 467-470.
48. Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 1995; 43: 71-80.

49. Carbonneau G, Morin N, Durocher J, Bousquet D. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology* 1997; 47: 266-266.
50. Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Bulla J, Renard JP. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 2001; 55: 1071-1081.
51. Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD. Chromosome Aberrations in In Vitro-Produced Bovine Embryos at Days 2-5 Post-Insemination. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1143-1148.
52. Bredbacka P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology* 2001; 55: 23-34.
53. Geldhof A, Goossens L, Moyaert I, Cuelenaere M, Roschlau K, Roschlau D, Nivot A, Beckers J, Ectors F. Sex determination in bovine embryos by microaspiration. Results of five years practice under farm conditions. In 16^e Réunion A.E.T.E 2000: 150 (abstract).
54. Herr CM, Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991; 35: 45-54.
55. Bredbacka P. Biopsy of Morulae and Blastocysts*. *Reproduction in Domestic Animals* 1991; 26: 82-84.
56. Bredbacka P. Recent developments in embryo sexing and its field application. In 14^e Réunion A.E.T.E 1998: 105-111.
57. Lacaze S, Ponsart C, Discala D, Richet L, Valadier A, Pailhous C, Humblot P. Use of embryo sexing an MOET in AUBRAC cows to save the dairy genetic type. *Proceedings of 24th AETE 2008: Abstract pp 182.*
58. Ponsart C, Salas Cortes L, Jeanguyot N, Humblot P. Le sexage de embryons a le vent en poupe! . *Bulletin Technique de l'Insemination Artificielle* 2008; 129: 30-31.
59. Gonzalez C, Le Bourhis D, Guyader Joly C, Moulin B, Heyman Y, Humblot P. Pregnancy rates after single direct transfer of biopsied frozen-thawed bovine embryos according to quality. *Proceedings of 24th AETE 2008: Abstract*
60. El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard M-A, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics* 2006; 28: 84-96.
61. Georges M. Mapping genes underlying production traits in livestock. In. *Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1998: 77-101.*

- 62.Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89: 5847-5851.
- 63.Wells D, Sherlock JK, Delhanty JDA, Handyside AH. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 1214-1218.
- 64.Carlson B (ed.). *Patten's Foundations of Embryology*. New York: McGraw-Hill; 1996.
- 65.Handyside AH, Johnson MH. Temporal and spatial patterns of the synthesis of tissue-specific polypeptides in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1978; 44: 191-199.
- 66.Pedersen R (ed.). *Potency, lineage, and allocation in preimplantation mouse embryos.*; 1886.
- 67.Reima I, Lehtonen E, Virtanen I, Flechon J. The cytoskeleton and associated proteins during cleavage, compaction and blastocyst differentiation in the pig. *Differentiation* 1993; 54: 35-45.
- 68.Betteridge K, Fléchon J. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 1988; 29: 155-187.
- 69.Plante L, King W. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by<i>in Vitro</i> and<i>in Vivo</i> fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1994; 11: 515-529.
- 70.Kessler MA, Duello T, Schuler L. Expression of Prolactin-Related Hormones in the Early Bovine Conceptus, and Potential for Paracrine Effect on the Endometrium. *Endocrinology* 1991; 129: 1885-1895.
- 71.Martal JL, Chêne NM, Huynh LP, L'Haridon RM, Reinaud PB, Guillomot MW, Charlier MA, Charpigny SY. IFN-tau: A novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities. *Biochimie* 1998; 80: 755-777.
- 72.Flint APF, Henville A, Christie WB. Presence of placental lactogen in bovine conceptuses before attachment. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979; 56: 305-308.
- 73.Morgan G, Wooding FBP, Beckers JF, Friesen HG. An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989; 86: 745-752.

74. Godkin J, Bazer F, Roberts R. Ovine Trophoblast Protein 1, an Early Secreted Blastocyst Protein, Binds Specifically to Uterine Endometrium and Affects Protein Synthesis. *Endocrinology* 1984; 114: 120-130.
75. Ogren L, Talamantes F (eds.). *The placenta as an endocrine organ: polypeptides*. New York: Raven press; 1994.
76. Morgan G, Wooding FB, Brandon MR. Immunogold localization of placental lactogen and the SBU-3 antigen by cryoultramicrotomy at implantation in the sheep. *Journal of Cell Science* 1987; 88: 503-512.
77. Fléchon JE, Laurie S, Notarianni E. Isolation and characterization of a feeder-dependent, porcine trophoblast cell line obtained from a 9-day blastocyst. *Placenta* 1995; 16: 643-658.
78. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A-K, Nagy A, Rossant J. Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4. *Science* 1998; 282: 2072-2075.
79. Shimada A, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. Isolation and characterization of a bovine blastocyst-derived trophoblastic cell line, BT-1: development of a culture system in the absence of feeder cell. *Placenta* 2001; 22: 652-662.
80. Talbot NC, Caperna TJ, Edwards JL, Garrett W, Wells KD, Ealy AD. Bovine Blastocyst-Derived Trophoblast and Endoderm Cell Cultures: Interferon Tau and Transferrin Expression as Respective In Vitro Markers. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 235-247.
81. Talbot NC, Caperna TJ, Powell AM, Garrett WM, Ealy AD. Isolation and characterization of a bovine trophoblast cell line derived from a parthenogenetic blastocyst. *Molecular Reproduction and Development* 2004; 69: 164-173.
82. Talbot N, Powell A, Camp M, Ealy A. Establishment of a bovine blastocyst-derived cell line collection for the comparative analysis of embryos created in vivo and by in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer, or parthenogenetic activation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2007; 43: 59-71.
83. Ducibella T, Anderson E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Developmental Biology* 1975; 47: 45-58.
84. Leibfried L, First NL. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. *Journal of Animal Science* 1979; 48: 76-86.
85. de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruijff TAM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research* 1989; 24: 197-204.

86.Hambruch N, Haeger J-D, Dilly M, Pfarrer C. EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK. *Placenta* 2009; 31: 67-74.

87.Hashizume K, Shimada A, Nakano H, Takahashi T. Bovine trophoblast cell culture systems: a technique to culture bovine trophoblast cells without feeder cells. *Methods Mol Med* 2006; 121: 179-188.

88.Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive biomedicine online* 2001; 3: 25-29.

89.Barrio M, Peña AI, Quintanella LA, Becerra JJ, Herradón PG. Efecto de la composición y renovación parcial del medio de cultivo sobre el desarrollo de los embriones producidos in vitro. *Archivos de zootecnia* 2003; 52: 441-451.

90.Bredbacka P. Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 44: 159-166.