

# EFFECTO DE SISTEMAS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA COMPETENCIA DE COMPLEJOS CÚMULUS-OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *IN VITRO*

David L. Gómez-López<sup>1</sup>, Diego A. Velasco-Acosta<sup>1</sup>,  
Diego F. Dubeibe-Marín<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Agrosavia. Centro de Investigación Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera -Mosquera, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bogotá, Colombia.

dgomez@agrosavia.co

<https://orcid.org/0000-0002-2078-5656>

## Introducción

El pH de los medios de cultivo es vital para las actividades celulares, por lo tanto, es un factor que debe ser controlado durante los procedimientos de producción *in vitro* de embriones. Este estudio tuvo como objetivo evaluar dos alternativas para el control del pH del medio de cultivo durante la maduración *in vitro* (MIV) de complejos cúmulus-ovocitos (CCOs) bovinos.

## Metodología

Los CCOs inmaduros fueron obtenidos de ovarios de planta de sacrificio. Posteriormente a su selección, fueron distribuidos en grupos de 20 y cultivados en medio de maduración [TCM-199, suplementado con 10% SFB, 0,01 UI de LH y FSH, penicilina G (73µg/mL) y estreptomycin (70µg/mL)] durante 24 h. Los grupos experimentales fueron conformados por: (i) un sistema de gasificación química (GQ), que consistió en la adición de pastillas efervescentes (PE) compuestas de ácido cítrico (0,012 g), y bicarbonato de sodio (0,023g), dentro de un sistema cerrado compuesto de dos tubos acoplados por una manguera de acrilonitrilo estireno y sellados con tapones de silicona (Figura 1); (ii) un medio de cultivo a base de TCM-HEPES (25mM) independiente de una atmosfera controlada de CO<sub>2</sub>; y (iii) como grupo control (GC) fue utilizado un sistema convencional en incubadora a 7% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 38.5°C y humedad saturada. Para los grupos GQ y TCM-HEPES el cultivo se realizó en transportadora de ovocitos a 38.5°C. Posterior a la MIV, los CCOs de todos los grupos fueron fecundados *in vitro* (FIV) durante 18 h, utilizando una concentración de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL; finalmente, los presuntos cigotos fueron llevados para cultivo durante 7 días en medio SOFaa. Los procedimientos de FIV y cultivo *in vitro* fueron realizados en incubadora convencional a 38,5°C y humedad saturada, en 7% de CO<sub>2</sub> y 7% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y balance nitrógeno, respectivamente. Fue evaluado el nivel de pH del medio de cultivo al inicio (0 h) y al final (24 h) de la MIV. De igual manera, fueron evaluadas la tasa de maduración nuclear de los ovocitos a las 24 h de cultivo mediante tinción con Hoechst 33342 (10 µg/mL), además de las tasas de clivaje y producción de blastocistos los días 3 y 7 de cultivo, respectivamente. El experimento fue repetido 10 veces y los resultados fueron analizados en el programa SAS<sup>®</sup>. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas con la prueba chi cuadrado, y las diferencias del nivel de pH fueron analizadas mediante ANOVA y las comparaciones fueron hechas con la prueba de Tukey.



Figura 1. Sistema de gasificación química

## Resultados

A las 0 h de cultivo el valor del pH fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el GC en comparación a los grupos GQ y TCM-HEPES (7,4 vs 7,3, y 7,3, respectivamente). Por su parte, a las 24 h de cultivo el pH de los medios fue diferente ( $p < 0,05$ ) entre todos los grupos evaluados (7,1; 7,2; y 7,3, para GQ, GC y TCM-HEPES, respectivamente). Fue observado que la proporción (%) de ovocitos que alcanzaron la metafase II fue menor ( $p < 0,05$ ) en el grupo TCM-HEPES, en comparación a GC y GQ (65,32, 77,57 y 77,06, respectivamente) mientras que entre los grupos de GQ y GC no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) (Figura 2).

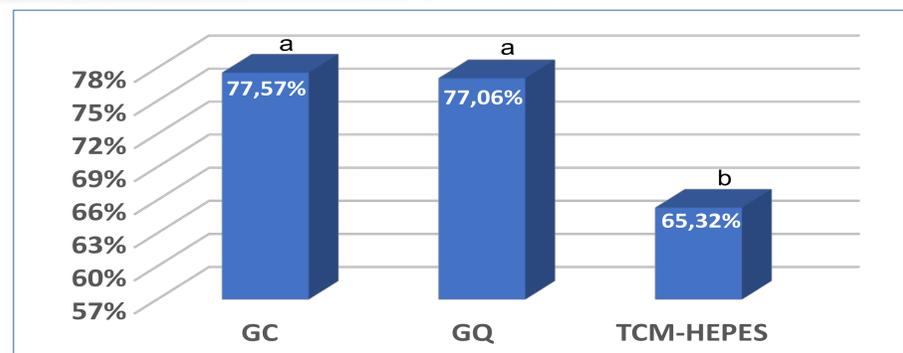


Figura 2. Ovocitos que alcanzaron la metafase II (MII). Letras diferentes entre grupos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

De la misma manera, la tasa de clivaje y la producción final de blastocistos (%) fueron menores ( $p < 0,05$ ) en el grupo TCM-HEPES con relación al GC y GQ (50,61±30,29 y 18,71±70,06 vs 58,04±26,36 y 26,2±54,04; y 62,20±13,96 y 28,47±40,22, respectivamente), y tampoco se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) para estas evaluaciones entre GQ y GC (Figura 3 y (Figura 4).

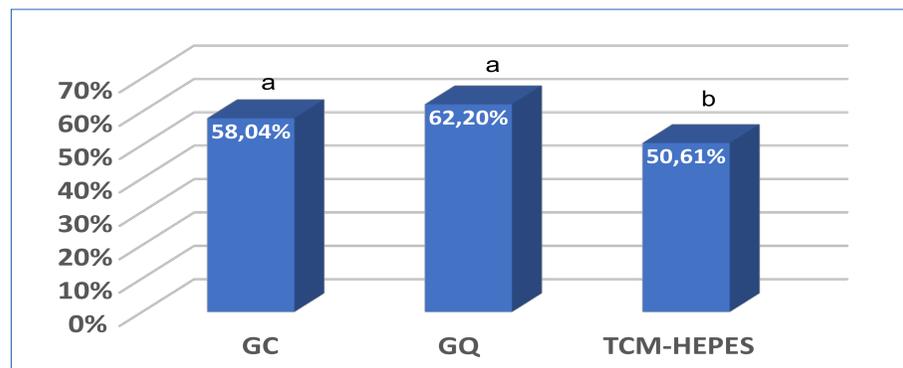


Figura 3. Tasa de clivaje. Letras diferentes entre grupos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

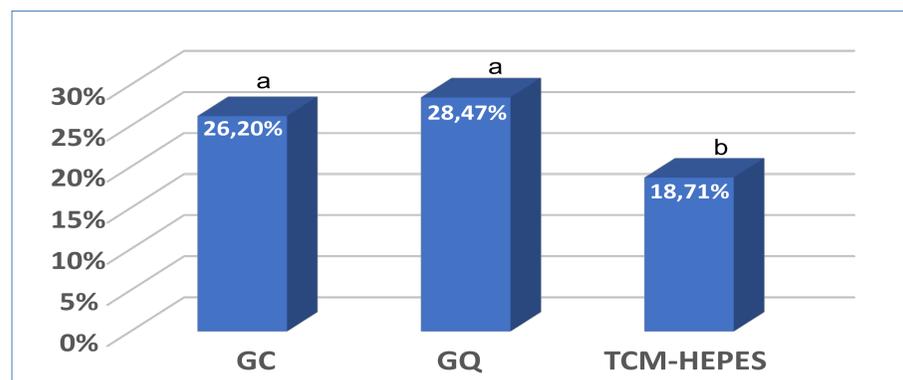


Figura 4. Producción final de blastocistos. Letras diferentes entre grupos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

## Conclusión

En conclusión, la inclusión de un medio no dependiente de una atmosfera controlada de CO<sub>2</sub> (TCM-HEPES) durante la maduración de los CCOs bovinos presenta efectos deletéreos sobre la competencia de las estructuras. Por otro lado, estos resultados sugieren que la GQ puede ser una alternativa eficiente y más económica, no sólo durante el proceso de MIV en el laboratorio sino, además, durante el transporte de los CCOs desde su lugar de colecta, sin la necesidad de incluir el uso de equipos especializados o cilindros con gas presurizado. Futuros estudios son necesarios para evaluar el efecto de la GQ sobre la calidad de los embriones producidos.

## Agradecimientos

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - MADR, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Agrosavia, Corporación Colombia Internacional - CCI