

## EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ALANINA Y GLICINA SOBRE LOS CLIVAJES INICIALES DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

### EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH ALANINE AND GLICYNE ON THE INITIAL CLEAVAGES OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

Catalina Arias L<sup>1\*</sup>, Zoot, Tatiana Ruiz C<sup>1</sup>, Ph.D, Martha Olivera A<sup>1</sup>, Dr. Sci. Agr, Ariel Tarazona M<sup>1,2</sup>, M.Sc.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo Fisiología y Biotecnología Animal. Carrera 75 No 65-87. Bloque 46 Lab. 202. Medellín - Colombia. <sup>1,2</sup>DPA/FCA/BIOGEM Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia. \*Correspondencia: mariak\_53@yahoo.es

Recibido: Mayo 15 de 2007; Aceptado: Diciembre 15 de 2007

#### RESUMEN

**Objetivo.** Determinar el efecto de la suplementación con alanina y glicina en el medio de cultivo sobre el porcentaje de clivaje de embriones bovinos, bajo condiciones de alta (20%) y baja (7%) tensión de oxígeno. **Materiales y métodos.** Los embriones fueron producidos a partir de oocitos madurados *in vitro* en M-199 suplementado con hormonas e inseminados con semen criopreservado; los cigotos fueron cultivados en medio CR1-AA. Al momento del cultivo se adicionaron alanina y glicina (5 mM y 10mM final respectivamente). Se usaron 4 tratamientos (T1: aminoácidos y baja tensión de oxígeno; T2: aminoácidos y alta tensión de oxígeno; T3: no aminoácidos y baja tensión de oxígeno; T4: no aminoácidos y alta tensión de oxígeno). El clivaje fue evaluado a las 48 hpi (horas post inseminación) evaluándose el número de embriones clivados sobre el total de embriones cultivados y el estadio de desarrollo (no clivados, 2, 4, 5-8 células). Se usó el programa estadístico STATISTICA (versión 5.0). **Resultados.** El porcentaje de embriones de 5-8 células en el tratamiento 1 respecto a los otros 3 tratamientos fue mayor ( $p= 0.007$ ). **Conclusiones.** Los aminoácidos alanina y glicina son fundamentales para los clivajes iniciales y en bajas tensiones de oxígeno se aumenta la proporción de embriones competentes hasta las 48hpi.

**Palabras clave:** Clivaje, bovinos, embriones, aminoácidos.

#### ABSTRACT

**Objective.** To determine the effect of supplementation with alanine and glycine *in vitro* culture systems on the cleavage rate of bovine embryos under conditions of high (20%)

and lower (7%) oxygen tension. **Materials and methods.** The embryos were produced from oocytes matured *in vitro* in M-199 supplemented with hormones and inseminated with cryopreserved semen; the zygotes were cultivated in CR1-AA medium. At culture moment alanine and glycine were added (5 mM and 10mM final respectively). Four (4) treatments were used (T1: amino acids and low oxygen tension; T2: amino acids and high oxygen tension; T3: non amino acids and low oxygen tension; T4: non amino acids and high oxygen tension). The cleavage was evaluated to 48 hpi (hours post insemination) being evaluated the number of embryos cleaved on the total of culture embryos and the development stage (non cleaved, 2, 4, 5-8 cells). The statistical program STATISTICA version 5.0 was used. **Results.** Embryos rate of 5-8 cells in the treatment one regarding the other 3 ones were higher ( $p = 0.007$ ). **Conclusions.** The amino acids alanine, glycine and in low oxygen tensions are fundamental for the initial cleavages because the proportion of competent embryos increases up to 48 hpi.

**Key words:** Cleavage, bovines, embryos, amino acids.

## INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* ha tenido como limitante el bajo porcentaje de embriones que se desarrollan hasta estadios aptos para transferencia o congelación (1). Este bajo desarrollo se debe al bloqueo que ocurre en los embriones bovinos durante el paso de 8 a 16 células (cuarto clivaje) (2), el cual ha sido asociado a factores como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (3) y a bajos niveles de barredores (4). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas normalmente durante el proceso de respiración mitocondrial en las blastómeras durante el desarrollo embrionario (5). Estas son controladas endógenamente por un sistema de barredores que incluye el glutatión (GSH), peroxidasa, catalasa, vitaminas y aminoácidos (6). Sin embargo, debido a que los embriones producidos *in vitro* son sometidos a tensiones de oxígeno elevadas (20%), comparadas con las condiciones *in vivo* del ambiente oviductal y uterino las cuales se encuentran en un rango de 5 - 9% por lo que se producen niveles altos de ROS que conllevan al bloqueo del clivaje y la muerte del embrión por apoptosis (7). En el oviducto se encuentran diferentes

tipos de moléculas importantes para el mantenimiento y desarrollo del embrión durante los primeros clivajes (8).

Los aminoácidos están entre los más importantes reguladores del desarrollo pre-implantatorio y por lo tanto son un constituyente crucial de los medios de cultivo. La inclusión de aminoácidos específicos en el medio de cultivo ha mostrado una buena respuesta del embrión que ha permitido superar el bloqueo embrionario observado en muchas especies (9). Alanina y glicina son dos aminoácidos no esenciales (6) que merecen importancia ya que en el perfil de aminoácidos del tracto reproductivo de las hembras mamíferas presenta muy altas concentraciones, por lo cual se cree que cumple funciones importantes durante las etapas del desarrollo temprano, y se sabe que mejoran de producción de blastocistos (10).

Los embriones que se desarrollan sincrónicamente, superan el bloqueo y alcanzan el estadio de blastocisto a los 7 días posfecundación y se denominan competentes (11). Aquellos atrasados en los clivajes y que no son capaces de superar el bloqueo se conocen como no competentes (12). La competencia es una cualidad que se adquiere desde la maduración del oocito, el cual almacena

nutrientes y moléculas que soportan las necesidades metabólicas de los primeros clivajes del embrión (13). Aunado a esto, la presencia de ciertas moléculas (aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento) en el entorno favorece el desarrollo y la competencia del embrión.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sinérgico de los aminoácidos alanina y glicina sobre los clivajes iniciales de embriones bovinos producidos *in vitro* bajo condiciones de alta (20%) y baja (7%) tensión de oxígeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Medellín, Colombia. Temperatura promedio: 24°C, altitud: 1200 msnm.

**Recolección de oocitos y producción de embriones *in vitro*.** Los oocitos fueron extraídos de ovarios de vacas entre 3-5 años de edad, esto se ajustó al promedio aproximado de edad que sigue los criterios de evaluación de canales del sistema ICTA, las cuales fueron provenientes de la planta de beneficio local. Los ovarios fueron transportados hasta el laboratorio en solución salina (NaCl 0.9%) a 38°C y fueron procesados dentro de las tres primeras horas después de su recolección.

Para la obtención de los oocitos, fueron aspirados los folículos entre 2-6 mm de diámetro con una jeringa de 10ml y una aguja calibre 18, el fluido folicular con los complejos cúmulos-oocito (CCOs) fue recuperado y puesto en tubos de centrifuga de 50 ml. El fluido recuperado se dejó sedimentar durante 20 minutos dentro de la incubadora. Luego de la fracción celular se recuperaron los CCOs de excelente calidad (Grado I) (14), teniendo en cuenta los CCOs con citoplasma del oocito homogéneo y mínimo tres capas de células de granulosa compactas rodeando el oocito.

**Maduración *in vitro*.** Los oocitos fueron puestos en M-199 suplementado con 10% de SFB, 5 UI/ml hCG, 0.02 mg/ml FSH y 0.005 mg/ml 17  $\beta$ -estradiol, e incubados por 24 horas a 39°C, 5% CO<sub>2</sub> en aire (20% de oxígeno) y humedad relativa mayor a 95%.

**Fertilización *in vitro*.** Los oocitos madurados (estimado por tinción fluorescente de Hoechst para la expulsión del primer cuerpo polar) fueron lavados y puestos en medio de fertilización TALP (Tyrode's albumina lactato piruvato) (15). Los oocitos fueron inseminados con semen criopreservado previamente descongelado a 37°C y seleccionado por la técnica de doble gradiente de percoll (16), y diluido a una concentración de 1 millón de espermatozoides/ml. La interacción oocitos-espermatozoides se permitió por 18 horas a 39°C, 5% CO<sub>2</sub> en aire (20% de oxígeno) y humedad relativa mayor a 95%.

**Cultivo *in vitro*.** Los cigotos fueron lavados y desnudados de las células del CCO y cultivados en medio de cultivo CR1-AA (17) durante 7 días con 10% SFB adicionado a las 48 (hpi), los cuales fueron incubados a 39°C, en alta tensión (5% CO<sub>2</sub>, 20 % de oxígeno, 95% de humedad relativa) o en baja tensión de oxígeno (mezcla de 5% de CO<sub>2</sub>, 7% de oxígeno, 88% de nitrógeno y 100% humedad relativa). No se realizó cambio de medio durante todo el periodo de cultivo. Todos los medios empleados fueron suplementados con 1% de solución antibiótica de penicilina-estreptomocina. Los reactivos utilizados fueron de SIGMA-Aldrich Corp, St. Louis. U.S.A, excepto el SFB de Gibco Corp y hCG comercial.

**Tratamientos.** Los aminoácidos se adicionaron al momento del cultivo, su concentración (alanina 5 mM y glicina 10 mM) fue establecida según previas investigaciones en donde el uso de estos mejoraron el desarrollo embrionario (10).

Para cada tratamiento se utilizaron mínimo 20 embriones con 4 réplicas cada uno. T1. Aminoácidos y baja tensión de oxígeno (7%), T2. Aminoácidos y alta tensión de oxígeno (20%), T3. No aminoácidos y baja tensión de oxígeno (7%), T4. No aminoácidos y alta tensión de oxígeno (20%).

La evaluación del clivaje fue determinada por observación directa de los embriones bajo estereomicroscopio a las 48 hpi registrando el número de embriones en cada estadio de acuerdo con los siguientes criterios: No clivado 1 célula; 1er clivaje 2 células; 2do clivaje 4 células; 3er clivaje 5-8 células.

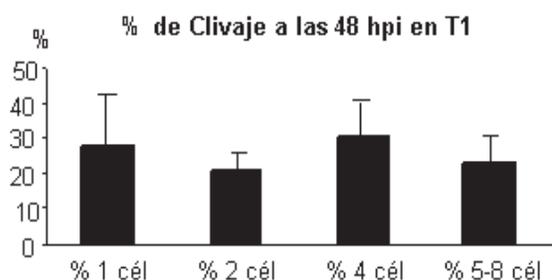
**Análisis estadístico.** Se realizó un diseño aleatorizado desbalanceado. Se realizaron análisis descriptivo y para la diferencia entre tratamientos se aplicó la prueba de

Tukey. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa STATISTICA (versión 5.0).

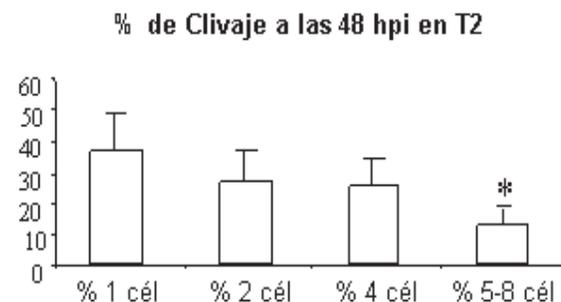
**Aspectos éticos.** Los procedimientos fueron evaluados y aprobados por el comité de ética de la Universidad de Antioquia.

## RESULTADOS

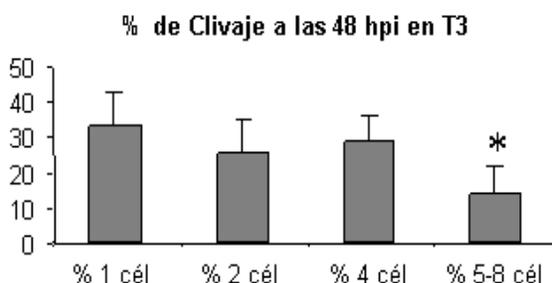
El tratamiento 1 presentó el mayor porcentaje de embriones en estadio de 5-8 células y una tendencia a obtener mayor porcentaje de clivaje (Figura 1). Los tratamientos 2, 3 y 4 presentaron menor porcentaje de embriones en estadio de 5-8 células ( $p > 0.05$ ) respecto a los demás estadios embrionarios y una tendencia a tener un mayor porcentaje de embriones sin clivar (Figuras 2, 3 y 4).



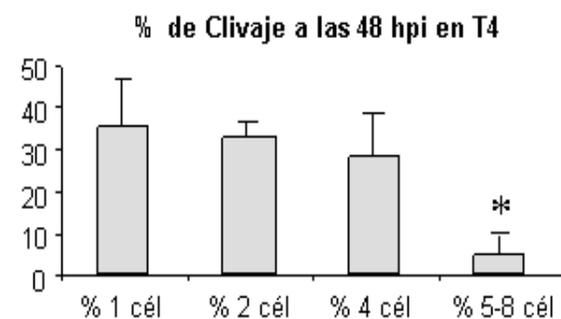
**Figura 1.** Porcentajes de clivaje para el T1 (ala, gly y 7% O<sub>2</sub>)



**Figura 2.** Porcentajes de clivaje para el T2 (ala, gly y 20% O<sub>2</sub>)



**Figura 3.** Porcentajes de clivaje para el T3 (no ala, no gly y 7% O<sub>2</sub>)

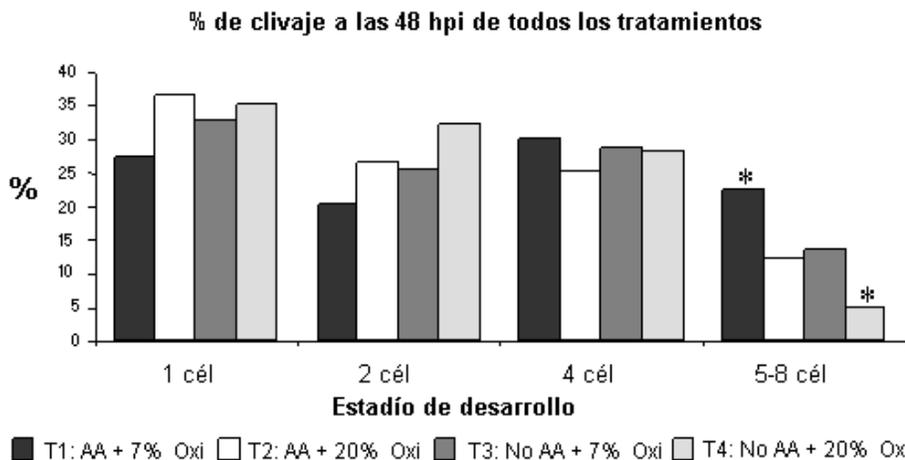


**Figura 4.** Porcentajes de clivaje para el T4 (no ala, no gly y 20% O<sub>2</sub>)

## DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que los embriones del tratamiento 1 presentaron un mejor desarrollo (porcentaje de embriones entre 5-8 células) respecto a los demás tratamientos ( $p > 0.05$ ) respecto al tratamiento 4 (Figura 5). Esto podría explicarse por el efecto sinérgico de los aminoácidos alanina y glicina y a la tensión de oxígeno baja. Investigaciones previas proponen tres posibles modos de acción de los aminoácidos entre los cuales se incluyen la regulación del metabolismo energético, osmolitos y *buffers* internos (18). También se sabe que alanina y glicina participan en rutas metabólicas importantes para el mantenimiento de la competencia del embrión. La glicina es constituyente del glutatión, el cual es el principal barredor de especies reactivas de oxígeno. Además, glicina y  $\beta$ -alanina son considerados osmolitos orgánicos o zwitteriónicos que protegen contra el daño por cambios en la osmolaridad, que son causados por la acumulación de NaCl durante el cultivo (19). De igual forma la glicina ayuda a mantener el equilibrio ácido-base y la estabilidad del pH intracelular. La alanina por su parte, es un aminoácido con alta tasa de recambio y considerado como un importante osmoprotector (19).

Los resultados de los tratamientos con alta tensión de oxígeno en donde el porcentaje de embriones competentes fue menor, puede explicarse ya que se sabe que las altas concentraciones de oxígeno (20 %) son perjudiciales para el desarrollo (20, 21). Adicionalmente, bajo las condiciones de alta tensión, hay producción de ROS los cuales pueden reaccionar con los polipéptidos y lípidos de membrana, resultando en daño celular por inactivación enzimática y peroxidación lipídica (22). También se conoce que en los embriones bovinos producidos *in vitro* en tensiones altas de oxígeno (20%), el  $H_2O_2$  se produce endógenamente y se acumula en las blastómeras que no son capaces de barrerlo, lo que ocasiona muerte celular por apoptosis (7). A diferencia de lo encontrado previamente por Moore y Bondioli (23), en donde alanina y glicina mejoraron el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* en una tensión de oxígeno alta, en el presente estudio solamente se encontró diferencia significativa cuando se utilizó una tensión de oxígeno baja (T1), lo cual indica que el efecto del estrés generado por las ROS no puede ser contrarrestado solamente por una ruta dependiente de alanina y glicina, sino que los embriones utilizan diferentes mecanismos para mantener el equilibrio intracelular.



**Figura 5.** Efecto de los diferentes tratamientos sobre los porcentajes de clivaje a las 48 hpi.

En el tratamiento 2, los resultados obtenidos de bajos porcentajes de embriones competentes de 5-8 células se dieron posiblemente porque la alta tensión de oxígeno pudo desencadenar estrés oxidativo, el cual generaría perturbaciones en diferentes rutas metabólicas del embrión, lo que le impidió responder eficazmente ante esta agresión medioambiental. En el tratamiento 3 no hubo estrés oxidativo por la tensión de oxígeno. Sin embargo, los porcentajes de embriones competentes se mantuvieron bajos. Esto indica que aunque el estrés oxidativo sea bajo, los aminoácidos alanina y glicina fueron importantes para el clivaje y desarrollo de los embriones bovinos. En el tratamiento 4 también se encontraron bajos porcentajes de embriones competentes, posiblemente porque hay un efecto combinado de la alta tensión de oxígeno aunado a la deficiencia de alanina y glicina, lo cual posiblemente fue un limitante para el desarrollo temprano.

En la producción *in vitro* de embriones bovinos un factor importante es la estabilidad de los embriones, determinada entre el número de cigotos cultivados respecto a los clivados. Esta mayor estabilidad fue encontrada en el tratamiento 1, en donde del total de embriones cultivados, un alto porcentaje de los mismos alcanzó el estado de 5-8 células mientras que para los tratamientos T2, T3, T4, del total de embriones cultivados, el porcentaje de embriones encontrados en 5-8 células a las 48 hpi fue menor ( $p < 0.05$ ) (Figura 5).

Cuando se evaluaron los tratamientos en cada porcentaje de clivaje (Figura 5), para el porcentaje de clivaje de 5-8 células se encontró una diferencia a favor del tratamiento 1 con respecto al 4 ( $p < 0.05$ ). La comparación entre tratamientos a las 48 hpi, no fue significativa en las proporciones de embriones entre los estadíos de 1 hasta 4 células ( $p > 0.05$ ). Sin embargo se observó una clara tendencia del tratamiento 1 a presentar mayor porcentaje de embriones en los estadíos avanzados (5-8 células) respecto a los demás tratamientos que presentaron tendencia a producir mayor porcentaje de cigotos no clivados y embriones en estadio de 2 células a las 48 hpi. Esto indicó una falta de competencia de los embriones de los tratamientos 2, 3 y 4, ya que se espera que un embrión competente alcanzara el tercer ciclo celular en el momento en que se realizó la evaluación (48hpi) (11). La proporción de embriones entre 5-8 células fue mayor en el tratamiento 1 (alanina, glicina y baja tensión), respecto al 4 (no aa y alta tensión). Esto demostró que hubo un efecto sinérgico positivo para los primeros clivajes y el desarrollo de los embriones bovinos producidos *in vitro* de la presencia de alanina y glicina en el medio simultáneamente con la baja tensión de oxígeno.

Se concluye que los aminoácidos alanina y glicina son fundamentales para los clivajes iniciales y en bajas tensiones de oxígeno se aumenta la proporción de embriones competentes hasta las 48hpi.

## REFERENCIAS

1. Serrano C, Olivera-Angel M. Detenimiento en el ciclo celular de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Taurus* 2003; 5 (20): 20-35.
2. Thompson JG, McNaughton C, Gasparini B, McGowan LT, Tervit HR. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during

- compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 47-55.
3. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting Effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol on *In Vitro* Development under Oxidative Stress and Cystine Uptake of Bovine Embryos. *Biol Reprod* 2002; 6: 562-567.
  4. Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy PD. Responsiveness of early embryos to environmental insults. *Theriogenology* 2001; 55: 209-223.
  5. Brookes P. Mitochondrial H leak and ROS Generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 2005; 38 (1): 12-23.
  6. Fernández V Daniel, citado por Laguna P. José y Piña G. Enrique. *Bioquímica de Laguna*. 5 ed. México DF. Editorial El Manual Moderno. 2002. Pág 9.
  7. Velez-Pardo C, Tarazona Morales A, Jimenez Del Rio M, Olivera-Angel M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* 2007; 67: 1285-1296.
  8. Miller JGO, Schultz GA. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* 1987; 36: 125-129.
  9. Boland M, Lonergan P, O' Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 2001; 55: 1323-1340.
  10. Eun- Song L, Yutaka F. Synergistic Effect of Alanine and Glycine on Bovine Embryos Cultured in Chemically Defined Medium and amino Acid Uptake by *in vitro*-produced Bovine Morulae and Blastocysts. *Biol Reprod* 1996; 55: 1383-1389.
  11. Duranthon V, Renard JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 2001; 55 (6): 1277-1289.
  12. Tarazona AM, Rodriguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim* 2005; 40: 1-7.
  13. Leung KC, Adashi E. The ovary. Second edition. San Diego, California, Elsevier Academic Press. 2004. Chapter 7: 113-129.
  14. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64(3): 904-909.
  15. Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990; 26(1) 40-46.
  16. Parrish JJ, Krogenaes IA, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44: 859-869.

17. Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49:459-62.
18. Gardner DK. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J Reprod Fertil* 1999; suppl 54: 461-475.
19. Kerri MD, Baltz JM. Organic Osmolytes and Embryos: Substrates of the Gly and  $\beta$  Transport Systems Protect Mouse Zygotes against the effects of raised Osmolarity. *Biol Reprod* 1997; 56: 1550-1558.
20. Legge M, Sellens MH. Free radical scavengers ameliorate the 2 cell Block in mouse embryo culture. *Human Reprod* 1991; 6: 867- 87.
21. Cummins J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115: (Suppl 1) 23-29.
22. Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxy radicals in presence of iron chelaters. *FEBS Lett* 1987; 92: 321-326.
23. Moore K, Bondioli K. Glycine and Alanine Supplementation of Culture Medium Enhances Development of in vitro Matured and Fertilized Cattle Embryos. *Biol Reprod* 1993; 48: 833-840.