

# Efectos beneficiosos de las células vero sobre la capacidad de desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*



<https://cu-id.com/2248/v46e11>

## Beneficial effects of vero cells on the developmental capacity of *in vitro*-produced bovine embryos

Boris Ramos Serrano, José Ernesto Hernández-Pichardo\*

Laboratorio de Manejo de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Colonia Villaquiedad, Delegación Coyoacán, CP. 04960, México, D.F.

**RESUMEN:** El cocultivo de embriones es una alternativa efectiva para mejorar la capacidad de desarrollo de embriones producidos *in vitro* bajo condiciones subóptimas. Embriones bovinos producidos por las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y clonación somática (CS) fueron cocultivados sobre monocapas células Vero y evaluados los porcentajes de desarrollo alcanzados. En los embriones obtenidos por FIV se observó un incremento altamente significativo en el porcentaje de la primera división embrionaria 75,4 % (n=614/814) vs. 60,9 % (n=564/926) ( $p<0,0052$ ), y la producción de blastocistos 17,8 % (n=145/814) vs. 8,1 % ( $p<0,0001$ ), en ambos casos, en condiciones de cocultivo o no, con células Vero, respectivamente. En el grupo de embriones clonados se observaron diferencias significativas en la producción de blastocistos 28,9 % (n=193/668) vs 10,2 % (n=83/814) ( $p<0,0001$ ) cocultivados con o sin células Vero, respectivamente. Se obtuvo un promedio de  $101\pm 61,0$  núcleos/embrión (n=12 blastocistos) cuando fueron cocultivados en monocapas de células Vero. Los resultados confirman la capacidad del cocultivo con las células Vero para incrementar los porcentajes de producción de blastocistos bovinos por las técnicas de fertilización *in vitro* y clonación somática.

**Palabras clave:** Células Vero, cocultivo de embriones, factores embriotróficos.

**ABSTRACT:** Embryo co-culture is an effective alternative to improve the developmental capacity of embryos produced *in vitro* under suboptimal conditions. Bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) techniques were co-cultured on Vero cell monolayers and the development percentages reached were assessed. In IVF-derived embryos, a highly significant increase was observed in the percentage of first cleavage 75.4 % (n=614/814) vs. 60.9 % (n=564/926) ( $p<0.0052$ ), and blastocyst production 17.8 % (n=145/814) vs. 8.1 % ( $p<0.0001$ ); in both cases, under co-culture and non-culture conditions, using Vero cells, respectively. A mean of  $101\pm 61.0$  nuclei/embryo (n=12 blastocysts) was obtained when co-cultured in Vero cell monolayers. The results confirm the ability of co-culture with Vero cells to increase the production percentages of bovine blastocysts by IVF and SCNT techniques.

**Key words:** Vero cells, embryo co-culture, embryotrophic factors.

## INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones bovinos ofrece una oportunidad invaluable para el desarrollo de múltiples biotecnologías reproductivas que impactan el desarrollo económico y científico del sector ganadero (1). Sin embargo, bajo condiciones tropicales la calidad de los gametos obtenidos está comprometida (2), limitando su uso en otras biotecnologías más avanzadas (3,4).

Una alternativa para el mejoramiento de la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* es el uso de los sistemas de cocultivo, específicamente utilizando monocapas de células Vero (5). Con este método se han obtenido resultados superiores en el desarrollo *in vivo* e *in vitro* de embriones de varias especies. Se plantea que estas células ejercen sus efectos positivos principalmente por tres

vías, *i*) secreción de factores embriotróficos, *ii*) por detoxificación del medio de cultivo, y *iii*) reducción de algunos constituyentes del medio de cultivo como la glucosa (6-8).

Es ampliamente conocido que el estrés calórico y nutricional afectan el comportamiento reproductivo y calidad de los gametos en los bovinos (9-11). En Cuba la principal fuente para la obtención de los Complejos Cumulo-Ovocitos (CCOs) inmaduros bovinos provienen de ovarios colectados de hembras sacrificadas para el consumo humano, muchas de ellas eliminadas de los rebaños por la pérdida de la fertilidad, asociadas a causas de envejecimiento, o estrés nutricional o calórico (12). En este sentido, el mejoramiento de la calidad de los gametos extraídos de estas hembras permitiría abordar otras biotecnologías reproductivas.

\*Correspondencia a: José Ernesto Hernández-Pichardo. E-mail: [ehernan@correo.xoc.uam.mx](mailto:ehernan@correo.xoc.uam.mx).

Recibido: 05/04/2024

Aceptado: 09/07/2024

Considerando los criterios planteados, nos propusimos evaluar si el cocultivo con células Vero incrementa el desarrollo *in vitro* y calidad de los embriones bovinos producidos por las técnicas de fertilización *in vitro* y clonación somática, utilizando ovarios de matadero como fuente de CCOs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y medios de cultivo *in vitro*

Los medios de cultivo se elaboraron con agua ultrapura (18 MΩ, calidad Milli-Q) y reactivos químicos calidad SIGMA, Ltd. En el caso del medio de cultivo CR1aa fue elaborado en el laboratorio (13). Todos los medios de cultivos se esterilizaron por filtración (poro de 0,22 μm Ø, MiniSart) y se conservaron durante un período máximo de cuatro semanas a 4 °C en frascos de cristal (500 mL) sellados.

### Ovarios bovinos de mataderos donantes de CCOs inmaduros

Los ovarios se adquirieron del matadero local "Manolo Rojo" (Municipio Nueva Paz, Empresa Cárnica Tauro, Mayabeque) ubicado a dos horas de viaje con respecto al laboratorio. Como donantes se aprovecharon hembras adultas mestizas (Hosltein/Cebú) con una condición corporal entre 1,5 a 2 de una escala de 5 puntos. Los ovarios colectados fueron depositados en una solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7.2) suplementada con 50 μg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma, G4793) y transportados hasta al laboratorio a una temperatura entre los 28 y 30 °C.

### Maduración *in vitro* de los CCOs inmaduros

Los CCOs fueron extraídos por el método de punción folicular considerando folículos con diámetros entre 3 a 5 mm. Una vez extraídos los CCOs fueron clasificados teniendo en cuenta el: *i)* número de capas del *cumulus oophorus*, *ii)* la compactación del *c. oophorus*, y *iii)* la homogeneidad e intensidad del color del citoplasma del óvulo. Los CCOs seleccionados fueron madurados en medio TCM 199 (Sigma, M4530) suplementado con gonadotropinas a razón de 10 μg/mL de FSHp (Sigma, F2293), 10 μg/mL de LHo (Sigma, L5269), 1 μg/mL de 17 β Estradiol (Sigma, E2758) y 10% de suero fetal bovino inactivado (Catalog No. 11550356, GIBCO, USA). Además, se le agregó 10 ng/mL del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-hr, Lote 03IFAB864, CIGB, La Habana, Cuba), 1 mM de glutamina (Sigma, G8540), 0,2 mM de piruvato de sodio (Sigma, P4562) y 50 μg /mL de sulfato de gentamicina (Sigma, G4793). La maduración *in vitro* se realizó en cajas de cultivo de cuatro pocillos (Four Wells, Nunclon

™, Delta, Surface, Denmark), donde se depositaron 400 μL de medio de maduración TCM 199 por pocillo y entre 25 a 30 CCOs/ pocillo. Inmediatamente, los CCOs se incubaron por espacio de 22 h en una atmósfera compuesta por 100 % de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y a 38,5 °C. Se consideraron como criterios de maduración citoplasmática y nuclear: *i)* Expansión y grado de mucificación del *c. oophorus*, y *ii)* la extrusión del primer cuerpo polar.

### Fertilización *in vitro* de los CCOs maduros

La capacitación y selección de los espermatozoides móviles se realizó por el principio de Swim-Up (14,15). Del nitrógeno líquido se extrajeron cuatro pastillas de semen congelado y depositaron individualmente en tubos cónicos con 1 mL de medio de capacitación TALP-SPERM [Elaborado en el laboratorio; (14)], enriquecido con 0,2 mM de piruvato de sodio (Sigma, P4562), 6 mg/mL de BSA (Sigma, A3311) y 50 μg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma, G4793). Cada muestra se incubó a 37 °C durante 1 h. Luego, el sobrenadante de las muestras se extrajo mezclándolas suavemente en un sólo tubo. Los espermatozoides se centrifugaron dos veces (200 x g) por 10 minutos, intercalando entre ellas un cambio de medio fresco TALP-SPERM. Del precipitado formado se tomó aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides, y fueron depositados en medio TALP-FERT (microgotas de fertilización de 400 μL). Este medio fue suplementado con 0,2 mM de piruvato de sodio, 6 mg/mL de BSA (Sigma, A6003), 5 mM de glucosa (Sigma, G6152), 50 μg /mL de sulfato de gentamicina (Sigma, G4793), 10 μg/mL de sulfato de heparina (Sigma, H3149) y la mezcla correspondiente de activadores 2mM D-Penicilamina (Sigma, P4875), 1 mM de hipotaurina (Sigma, H1384) y 250 μM de epinefrina (Sigma, E4250). Seguidamente, los CCOs maduros se distribuyeron en las microgotas de fertilización *in vitro* a razón de 30 CCOs por pocillo y se coincubaron con los espermatozoides por 48 h. Se consideró como único criterio de fertilización los cigotos divididos a las 48 horas post inseminación. Los cigotos obtenidos fueron cocultivados en microgotas de 400 μL de medio CR1aa con o sin células Vero según el diseño experimental. En general se utilizó una atmósfera de cultivo compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> en aire, 100% de humedad relativa y una temperatura de 38,5 °C.

### Producción *in vitro* de los embriones clonados

La CS se realizó por el método tradicional de Wilmut *et al.*, 1997 (16). Ovocitos en MII (18-20 horas post maduración) fueron desnudados por pipeteo en medio de manipulación suplementado con 0,3 mg/mL de hialuronidasa (Sigma, H4272), una vez libres de célula del cúmulo se seleccionaron los

ovocitos con cuerpo polar y citoplasma homogéneo. Para la enucleación éstos se incubaron durante 20 min en medio de manipulación con citocalasina B (7,5 µg/mL; Sigma, C6762), e individualmente se le extracción del plato metafásico y el primer cuerpo polar a cada óvulo maduro. Seguidamente, los citoplastos fueron reconstruidos con fibroblastos fetales, e inducida la fusión celular en una solución de Manitol 0,3 M (Sigma, M1902), aplicando dos pulsos eléctricos 2,2 kV/cm<sup>2</sup> de una duración de 30 µs (CELLFUSION, CF150/B, BLS®, Hungría). Los complejos fundidos fueron reprogramados en medio TCM 199 que contenía cicloheximida (10 µg/mL; Sigma, C4859) y citocalasina B (5 µg/mL) más 10% suero fetal bovino. Los embriones clonados fueron cultivados en microgotas de 400 µL de medio CR1aa en la presencia o no de las células Vero según el diseño experimental.

### **Cultivo *in vitro* de las células Vero y elaboración de las monocapas para el cultivo de los embriones**

Para el establecimiento de las monocapas celulares se extrajo del nitrógeno líquido un vial de células Vero (Subpase 7, concentración celular de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ mL), e inmediatamente fue descongelado a 37 °C. El contenido del vial se diluyó en 10 mL de medio CR1aa suplementado con 2% de suero fetal bovino, y dicho volumen centrifugado a 120 x g/ 10 min. Seguidamente, el precipitado fue extraído y diluido en 10 mL de medio CR1aa a razón de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL. A partir de esta dilución se extrajo 1 mL y se depositó en cada pocillo de las placas de cultivo (4-Wells, Nunclon™, Delta, Surface, Denmark). Las células Vero fueron cultivadas por 24 h hasta observar la formación de la monocapa, pasado ese tiempo se le retiró el 100% del medio de cultivo y añadió medio fresco CR1aa suplementado con 2% de suero fetal bovino y 12,5 µM de 2β-Mercaptoetanol (Sigma, M7522), quedando lista la monocapa para el cultivo de los embriones bovinos.

### **Diseño experimental**

#### **Cocultivo de los embriones producidos por las técnicas de FIV y CS**

Como grupos experimentales se utilizaron los cigotos obtenidos por las técnicas de fertilización *in vitro* y CS. Los embriones producidos por ambas técnicas fueron divididos y cocultivados *in vitro* en dos condiciones sobre una monocapa de células Vero (Grupo con Vero) y grupo sin monocapa de células Vero (Grupo Control). El cultivo *in vitro* se realizó en placas de cuatro pocillos (Nunclon™, Delta, Surface, Denmark). En cada pocillo se depositó 400 µL de medio CR1aa suplementado con 2% de suero fetal bovino y 12,5 µM de 2β-Mercaptoetanol.

Los pocillos no se cubrieron con aceite de parafina y como máximo se depositaron 30 embriones/pocillo, finalmente los embriones se cultivaron en una atmósfera compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> en aire, 100% de humedad relativa a 38,5 °C. Como principales criterios de desarrollo *in vitro* se evaluaron los porcentajes de la primera división embrionaria, el desarrollo de los embriones hasta estadio blastocistos (7 a 9 d post inseminación) y, en el caso de los blastocistos clonados obtenidos se realizó el conteo total de núcleos por embrión.

### **Análisis estadístico**

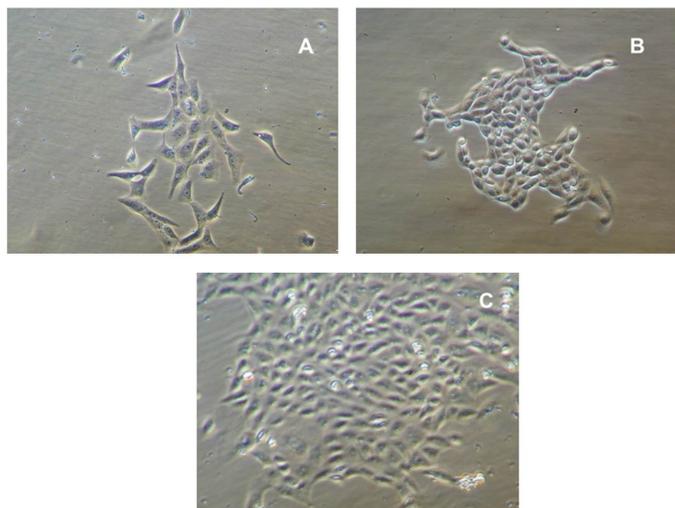
Para los análisis estadísticos fue utilizada la prueba de Chi-cuadrado (2) con un nivel de significación de  $p < 0,05$ , empleando el programa GraphPad Prism version 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

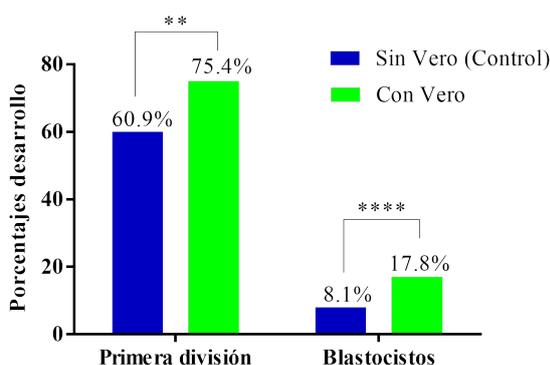
### **Desarrollo *in vitro* de los embriones producidos por FIV y cocultivados en monocapas de células Vero**

Las células Vero, con características epiteliales y un origen común al tracto reproductivo (mesodermo; ver [figura 1A y B](#)), han demostrado su capacidad para estimular el desarrollo embrionario *in vitro* (5,17), en particular en condiciones subóptimas de cultivo (6) y en embriones micromanipulados (18). En nuestro experimento se observaron diferencias altamente significativas ([Gráfico 1](#)) en los porcentajes de embriones que alcanzaron la primera división embrionaria 75,4% vs 60,9% ( $p < 0,0052$ ), y el estadio de blastocisto 17,8% vs 8,1%; ( $p < 0,0001$ ) cuando fueron cocultivados o no, sobre células Vero. Estudios relacionados demuestran el efecto positivo que ejerce las células Vero sobre el desarrollo embrionario en bovinos, con incrementos significativos en la producción de blastocisto, de 26,5% vs 0,7% ( $p < 0,001$ ) (19) y 14,7% vs 2,8% ( $p < 0,01$ ) (20), en condiciones de cocultivo o no con células Vero, respectivamente. En bovinos, los resultados publicados hasta la fecha demuestran el gran potencial de las células Vero para incrementar el desarrollo de blastocitos *in vitro* con valores entre un 15,7% (21) y 36,3% (22). También, en humanos se ha demostrado la utilidad de los cocultivos con células Vero para la producción de blastocitos *in vitro* (57,0% vs 17,0%;  $p < 0,05$ ) (23), y el número de blastómeros por embrión (24).

El cocultivo es una relación tripartita entre "*Medio de cultivo-Células-Embrión*" generándose efectos beneficiosos que favorecen el desarrollo embrionario. Entre estos, la detoxificación del medio, regulación de concentraciones de gases y metabolitos; así como la secreción de factores proteicos son los



**Figura 1.** Patrón de crecimiento de células Vero cultivadas en microgotas: A) Anclaje y estiramiento inmediato post siembra; B) Establecimiento de un clon celular ( $\approx 130 \pm 3$  células),  $\approx 24$  h post siembra; C) Conformación de un parche celular listo para el cocultivo de embriones,  $>48$  h post siembra. Morfología epitelial. / *Growth pattern of Vero cells cultured in microdroplets: A) Immediate post-seeding anchorage and stretching; B) Establishment of a cell clone ( $\approx 130 \pm 3$  cells),  $\approx 24$  h post-seeding; C) Formation of a cell patch ready for embryo co-culture,  $>48$  h post-seeding. Epithelial morphology.*



**Gráfico 1.** Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro* y cocultivados en monocapas de células Vero. (Efecto del tratamiento: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ . Prueba de Chi-cuadrado). / *In vitro-produced bovine embryo fertilization and co-cultured in Vero cell monolayers (Treatment effect: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ . Chi-square test).*

más importantes. Este último, es conocido como "sistema embriotrófico autocrino" (8), identificándose en cultivo de células Vero polipéptidos con pesos moleculares que oscilan entre 6,5 a 35,9 kDa, y concentraciones en el orden de 2-4  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL (25).

También es interesante el uso de medios condicionados, proceso en el cual los medios de cultivos son expuestos a las células Vero durante 48h a 72h, y enriqueciendo el medio de cultivo con proteínas como: el factor de crecimiento epidérmico, factor inhibidor de la leucemia, factor de crecimiento transformador- $\beta$ , e interleucina 6, entre otros (6,26). Se ha comprobado en otros cocultivos como las células epiteliales obtenidas de oviducto bovino (BOEC, por sus siglas en inglés) secretan proteínas en el orden de 32 - 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$

(27) y células de granulosa bovina en el orden de 40  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL (28). Estas proteínas, una vez purificadas e incluidas en el cultivo de embriones, a razón de 0,8-1,6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , incrementan los porcentajes de blastocistos eclosionados (21,6% vs 1,4%;  $p < 0,05$ ), demostrándose su papel embriotrófico (25). En bovinos se ha observado un incremento significativo en la producción de blastocistos, con diferencias de 14,7% vs 2,8% ( $p < 0,01$ ) (20) y 14,6% vs 0,7% ( $p < 0,001$ ) (19), cuando fueron utilizados medios condicionado y no condicionado, respectivamente. Este efecto también ha sido comprobado con la adición de factores de crecimiento "puros" en los medios de cultivos *in vitro* de embriones, reflejándose en un incremento en la tasa de desarrollo de blastocistos, así como un número superior de blastómeros por embrión, y una reducción significativa de blastómeros en apoptosis (29-31).

Si bien las células Vero han sido una de las líneas celulares de mayor uso para el cocultivo de embriones en diferentes especies, otras líneas celulares han demostrado su capacidad de promover el desarrollo embrionario en condiciones *in vitro* como, por ejemplo: las células de hígado de ratas búfalo (BRL, por sus siglas en inglés) (22), las células de riñón bovino Madin-Darby (MDBR, por sus siglas en inglés) (20); y células de la granulosa, y células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (32).

En nuestras condiciones se extrajeron un promedio 2,4 CCOs/ovario ( $n=2105$  CCOs/ 888 ovarios bovinos) en 17 réplicas experimentales (Resultados no publicados), con la particularidad que estos gametos provienen de hembras con baja condición corporal, como consecuencia de estrés nutricional. Si bien la viabilidad de estos gametos está comprometida por esta condición (9), en nuestro caso el uso del

cocultivo jugó un papel beneficioso en los embriones producidos. Este resultado ofrece una opción práctica aquellos grupos que sólo cuentan con ovarios de matadero proveniente de hembras de desecho, y requieren grandes cantidades de gametos. No menos importante es una alternativa más económica en comparación con otras técnicas para la extracción de CCOs inmaduros, como las técnicas de Ovum Pick-Up (OPU, por sus siglas en inglés) (33,34) o la superovulación de hembras donantes (35).

### Desarrollo de los embriones clonados bovinos cocultivados en monocapas de células Vero

En un segundo experimento, un total de 1482 embriones clonados fueron divididos en dos variantes de cultivo *in vitro*. La presencia de células Vero tuvo un efecto positivo en los embriones micromanipulados, lográndose diferencias altamente significativas, particularmente, en el desarrollo *in vitro* de blastocistos, de 28,9% vs 10,2% ( $p < 0,0001$ ), cocultivados con o sin células Vero, respectivamente (Tabla 1). La clonación somática es una técnica compleja que por su extensa micromanipulación infringe numerosos daños a los embriones (36). Los principales daños son ejercidos sobre la integridad y volumen del citoplasma embrionario, la zona pelúcida, la exposición a inhibidores de la síntesis proteica, y uso de ionóforos para provocar la activación artificial del genoma embrionario (37,38). Por ello, es de interés permanente la búsqueda de tratamientos y vías que permitan incrementar la viabilidad de los embriones post micromanipulación. El uso del cocultivo ha sido efectivo en otras técnicas de micromanipulación que provocan daños significativos en las citoestructuras y metabolismo de óvulos y embriones (18, 39). Con embriones clonados bovinos,

cocultivados con células Vero, se alcanzan altos valores de producción de blastocistos, que oscilan entre un 37,4% (40) y un 29,8% (41).

En el aspecto citomorfológico se comprobó que los blastocistos producidos en condiciones de cocultivo poseen un botón embrionario y trofoblasto bien definidos (Figura 2 A, B). Con una edad de siete días post cultivo *in vitro*, estos poseen un promedio de  $101 \pm 61,0$  núcleos/ embrión clonado ( $n=12$ , blastocistos), en comparación con los embriones obtenidos de cultivos sin células Vero  $62 \pm 28,8$  núcleos/ embrión clonado ( $n=12$ , blastocistos). Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones previas. Por ejemplo, en medio CR1aa se obtuvieron un total de  $92,5 \pm 13,3$  núcleos/ embrión clonado ( $n=11$ , blastocistos), y en medio complejo Menezo-B2 se lograron  $103,6 \pm 6,6$  núcleos/ embrión clonado ( $n=27$ , blastocistos) (40).

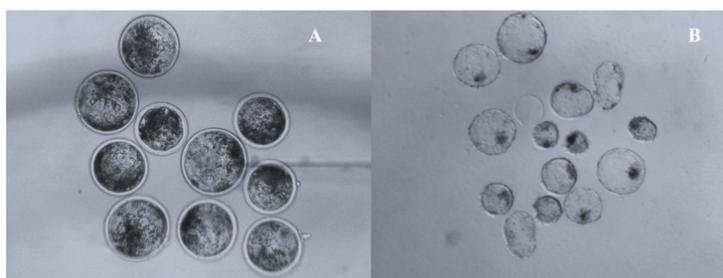
Conocer el número de núcleos que contiene un embrión producido *in vitro* es de vital importancia, ya que existe una estrecha relación entre el número de núcleos que posee un embrión y la viabilidad embrionaria en las etapas pre y post implantatoria. Se plantea que, para establecer una preñez a partir de la transferencia de un blastocisto bovino, con una edad de siete días post fertilización *in vitro*, debe tener un número crítico de  $117 \pm 6$  núcleos totales (42). Sin embargo, esta cifra puede variar entre laboratorios, e incluso desconocerse ya que no se realizan los estudios de fluorescencia nuclear necesarios para determinar la calidad de los mismos.

Otro factor determinante para obtención de buenos resultados en la producción *in vitro* de embriones bovinos es la correcta selección del medio de cultivo. En este experimento se utilizó medio CR1aa elaborado en nuestro laboratorio. Es un medio simple diseñado específicamente para el cultivo de embriones

**Tabla 1.** Resultados del desarrollo *in vitro* de los embriones clonados bovinos. / Results of *in vitro* development of cloned bovine embryos.

Sistema de cultivo	Criterios Evaluados		
	n	Primera División	Blastocistos
Con Vero	668	459 (68,7%)	193 (28,9%) <sup>a</sup>
Sin Vero Grupo Control	814	518 (63,6%)	83 (10,2%) <sup>b</sup>

Efecto del tratamiento: <sup>ab</sup>  $p < 0,0001$ . Prueba de Chi-cuadrado.  
Treatment effect: <sup>ab</sup>  $p < 0,0001$ . Chi-squared test.



**Figura 2.** Embriones bovinos clonados producidos *in vitro* A) 7 días y B) 9 días post cocultivo en monocapa de células Vero. / Cloned bovine embryos produced *in vitro* A) 7 days, and B) 9 days after co-culture on Vero cell monolayers.

bovinos, y puede ser elaborado con reactivos y agua de calidad apropiados (43). Es significativo la supervivencia de las células Vero nueve días en medio CR1aa sin sufrir cambios visibles de muerte celular, propiedad que permite mantener los embriones en este sistema de cocultivo por el tiempo seleccionado. Según la compañía Americana de Colecciones de cultivos Celulares (ATCC®, por sus siglas en inglés), recomienda para su cultivo utilizar el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y realizarle cambios de medios de 3 a 4 veces por semana.

Esta línea celular, con morfología epitelial, conserva la propiedad de inhibición de la proliferación por contacto. Por ello, para su mantenimiento es recomendable evitar que alcance la máxima confluencia, ya que en esta fase dejan de crecer y se inician los eventos de senescencia. En nuestras condiciones, las células Vero fueron sembradas a un 50% de confluencia en pocillos con un área de 1,9 cm<sup>2</sup>, a una relación de ≈520 células/mm<sup>2</sup>, requiriendo entre 24 a 30 h para doblar su número y conforma una monocapa al 100% de confluencia (≈1300-1500 células/mm<sup>2</sup>). Durante el periodo de cocultivo *in vitro* propuesto para los embriones micromanipulados (7-9 días), no se observaron en las monocapas de células Vero signos de muerte celular o cambios mayores, como por ejemplo el desprendimiento o contracción individual de las células o de las monocapas formadas. Estudios relacionados demuestran la adaptabilidad de las células Vero en cultivos libres de suero fetal (19), en nuestras condiciones la inclusión de un 2% de suero fetal bovino fue suficiente para conservar las monocapas celulares por espacio de dos semanas.

## CONCLUSION

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de las monocapas de células Vero para incrementar los porcentajes de producción de blastocistos bovinos por las técnicas de fertilización *in vitro* y clonación somática.

## REFERENCIAS

1. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine. *Animal*. 2020;14(5):991-1004.
2. Cordeiro ALL, Satrapa RA, Gregianini HAG, Gregianini JTF, Maia GFN, Landim-Alvarenga FC. Influence of temperature-humidity index on conception rate of Nelore embryos produced in vitro in northern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52(3):1527-32.
3. Shakweer WME, Krivoruchko AY, Dessouki SM, Khattab AA. A review of transgenic animal techniques and their applications. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023;21(1):55.
4. Bevacqua RJ, Fernandez-Martín R, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, et al. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*. 2016;86(8):1886-96.e1.
5. Ménézo YJ, Servy E, Veiga A, Hazout A, Elder K. Culture systems: embryo co-culture. *Methods Mol Biol*. 2012;912:231-47.
6. Conway-Myers BA. Co-culture update: creating an embryotrophic environment in vitro. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(3):175-82.
7. Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F, Gardner DK. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev*. 1997;46(2):146-54.
8. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*. 1995;1(2):91-148.
9. Cardoso FC, Kalscheur KF, Drackley JK. Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. *J Dairy Sci*. 2020;103(6):5684-93.
10. Dovolou E, Giannoulis T, Nanas I, Amiridis GS. Heat Stress: A Serious Disruptor of the Reproductive Physiology of Dairy Cows. *Animals (Basel)*. 2023;13(11).
11. Souza-Cácares MB, Fialho ALL, Silva WAL, Cardoso CJT, Pöhland R, Martins MIM, et al. Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. *Theriogenology*. 2019;130:103-10.
12. de Armas R, Solano R, Riego E, Pupo CA, Aguilar A, Ramos B, et al. Use of F1 progeny of HolsteinxZebu cross cattle as oocyte donors for in vitro embryo production and gene microinjection. *Theriogenology*. 1994;42(6):977-85.
13. Rosenkrans CF, First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci*. 1994;72(2):434-7.
14. Parrish JJ. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 2014;81(1):67-73.
15. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986;25(4):591-600.
16. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(1):3-7.

17. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol.* 2008;Appendix 4:Appendix 4E.
18. Hajian M, Hosseini SM, Asgari V, Ostadhoosseini S, Forouzanfar M, Nasr Esfahani MH. Effect of Culture System on Developmental Competence, Cryosurvival and DNA-Fragmentation of In Vitro Bovine Blastocysts. *Int J Fertil Steril.* 2011;5(1):21-6.
19. Menck MC, Guyader-Joly C, Peynot N, Le Bourhis D, Lobo RB, Renard JP, et al. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. *Reprod Nutr Dev.* 1997;37(2):141-50.
20. Myers MW, Broussard JR, Menezo Y, Prough SG, Blackwell J, Godke RA, et al. Established cell lines and their conditioned media support bovine embryo development during in-vitro culture. *Hum Reprod.* 1994;9(10):1927-31.
21. Pegoraro LM, Thuard JM, Delalleau N, Guérin B, Deschamps JC, Marquant Le Guienne B, et al. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells. *Theriogenology.* 1998;49(8):1579-90.
22. Duszewska AM, Reklewski Z, Pieńkowski M, Karasiewicz J, Modliński JA. Development of bovine embryos on Vero/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology.* 2000;54(8):1239-47.
23. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod.* 1992;7 Suppl 1:101-6.
24. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Hum Reprod.* 1999;14(3):774-81.
25. Chen HF, Ho HN, Chen SU, Chao KH, Lin HR, Huang SC, et al. Peptides extracted from Vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium. *J Assist Reprod Genet.* 1994;11(3):165-71.
26. Desai NN, Goldfarb JM. Growth factor/cytokine secretion by a permanent human endometrial cell line with embryotrophic properties. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13(7):546-50.
27. Maeda J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein- and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. *Biol Reprod.* 1996;54(4):930-6.
28. Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod.* 1993;49(3):582-7.
29. Ahumada CJ, Salvador I, Cebrian-Serrano A, Lopera R, Silvestre MA. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. *Animal.* 2013;7(3):455-62.
30. Sakagami N, Umeki H, Nishino O, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, et al. Normal calves produced after transfer of embryos cultured in a chemically defined medium supplemented with epidermal growth factor and insulin-like growth factor I following ovum pick up and in vitro fertilization in Japanese black cows. *J Reprod Dev.* 2012;58(1):140-6.
31. Wooldridge LK, Keane JA, Rhoads ML, Ealy AD. Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development. *J Anim Sci.* 2022;100(7).
32. Miranda MS, Nascimento HS, Costa MP, Costa NN, Brito KN, Lopes CT, et al. Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(10):1395-403.
33. Baruselli PS, Sá Filho MF, Ferreira RM, Sales JN, Gimenes LU, Vieira LM, et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim.* 2012;47 Suppl 4:134-41.
34. Ferré LB, Alvarez-Gallardo H, Romo S, Fresno C, Stroud T, Stroud B, et al. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in cattle: State-of-the-art and its impact on the in vitro fertilization embryo production outcome. *Reprod Domest Anim.* 2023;58(3):363-78.
35. Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2019;32(2):104-24.
36. Malin K, Witkowska-Piłaszewicz O, Papis K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology.* 2022;189:246-54.
37. Srirattana K, Kaneda M, Parnpai R. Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4).
38. Czernik M, Anzalone DA, Palazzese L, Oikawa M, Loi P. Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. *Int J Dev Biol.* 2019;63(3-4-5):123-30.
39. Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology.* 2001;55(4):923-36.

40. Liu L, Shin T, Pryor JH, Kraemer D, Westhusin M. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer. *Cloning*. 2001;3(2):51-8.
41. Li GP, White KL, Aston KI, Meerdo LN, Bunch TD. Conditioned medium increases the polyploid cell composition of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts. *Reproduction*. 2004;127(2):221-8.
42. Ross PJ, Goissis MD, Martins JPN, Chitwood JL, Pursley JR, Rosa GJM, et al. Blastocyst Cell Number and Allocation Affect the Developmental Potential and Transcriptome of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Stem Cells Dev*. 2023;32(17-18):515-23.
43. Rosenkrans CF, Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod*. 1993;49(3):459-62.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** **Conceptualización:** Boris Ramos Serrano, José Ernesto Hernández Pichardo.

**Análisis de datos:** Boris Ramos Serrano, José Ernesto Hernández Pichardo. **Investigación:** Boris Ramos.

**Escritura del Borrador original:** Boris Ramos, José Ernesto Hernández Pichardo. **Revisión, edición y aprobación de la revisión final del manuscrito:** Boris Ramos, José Ernesto Hernández Pichardo.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)