

EFECTO DE DIFERENTES SISTEMAS DE LAVADO Y/O SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES SOBRE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Palomo, M.J. Mogas, T., Izquierdo, M.D. y Paramio, M.T.

Departament de Patologia i de Producció Animals, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCIÓN

El procesamiento previo del semen para su utilización en la fecundación *in vitro* tiene como objetivo la eliminación del plasma seminal y/o la selección de los espermatozoides más móviles.

En el ganado bovino, el semen fresco o congelado se lava de los componentes del plasma seminal o de los crioprotectores utilizando principalmente gradientes de Percoll (Saeki y col., 1990; Utsumi y col., 1991), una centrifugación suave (Parrish y col., 1988) o mediante un *swim-up* (Gordon y Lu, 1990; Schellander y col., 1990; Choi y col., 1991). Por otra parte, Harrison (1976) utiliza para el lavado de semen fresco de morueco un centrifugado en una solución Ficoll. En el ganado caprino, la técnica del *swim up* es la que se aplica de forma rutinaria en los protocolos de FIV (Younis y col., 1991; De Smedt y col., 1992).

El objetivo de este trabajo es comparar la eficacia de diferentes procesamientos del semen en la fecundación *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en recipientes isotérmicos. Los ovocitos se obtuvieron cortando los ovarios repetidamente (técnica de *slicing*) en un medio TCM199 suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico y 50 µg/ml de gentamicina. Se seleccionaron los ovocitos que presentaban una o más capas completas de células del *cumulus* y un citoplasma de aspecto homogéneo. Se lavaron tres veces y se cultivaron en el medio descrito anteriormente suplementado con un 20% de suero inactivado de cabra en celo (SCZ), 10 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH y 1 µg/ml de 17β-estradiol. El cultivo se realizó en microgotas durante 27 horas a 38,5°C y una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Se recogieron eyaculados frescos de 3 machos de probada fertilidad con la ayuda de una vagina artificial. Se mezclaron los eyaculados a partes iguales y se procesaron siguiendo 4 tratamientos distintos:

- Control: 50 µl de semen se diluyeron en 2 ml de medio HEPES/TALP y se incubaron durante 1 hora,
- Gradientes de densidad de Percoll: 1 ml de una suspensión de espermatozoides en HEPES/TALP (1:2) se depositó sobre un gradiente de densidad de Percoll (40/80%) y se centrifugó durante 20' a 900×g,
- Solución Ficoll: 1 ml de una suspensión de espermatozoides en HEPES/TALP (1:2) se depositó sobre 5 ml de medio de lavado Ficoll (7,5%) (Harrison, 1976) y se sometió a una centrifugación (900×g) durante 15',
- *Swim-up*: 50 µl de semen se depositaron en el fondo de un tubo cónico que contenía 2 ml de medio HEPES/TALP. Una hora más tarde se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 200×g durante 10'.

Los sedimentos resultantes en los cuatro tratamientos se resuspendieron 1:1 en medio HEPES/TALP con heparina (100 µg/ml) durante 45'.

Después de 27 horas de maduración, los ovocitos se traspasaron a microgotas de medio de fecundación TALP suplementado con hipotaurina (1 µg/ml). Después de la capacitación, se valoró la concentración espermática y una alícuota (5 µl) de la suspensión de espermatozoides se añadió en las gotas de fecundación (concentración final: $4-4,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml). La fecundación se realizó en las condiciones de cultivo descritas anteriormente.

La fecundación de los ovocitos se evaluó en una muestra recogida a las 17 horas de la inseminación y fijada en ácido acético:etanol (1:3, v/v). Se consideró penetración normal (2PN+C) cuando los cigotos presentaban 2 pronúcleos y la cola del espermatozoide; penetración poliespérmica (PS) cuando los cigotos presentaban 2 o más colas de espermatozoide en el citoplasma y penetración anormal (PAN) cuando los cigotos habían sido penetrados por un solo espermatozoide pero con alguna alteración o retraso en la formación de los pronúcleos.

A las 24 horas de la inseminación, los cigotos se traspasaron a una monocapa de células de la granulosa en medio TCM 199 suplementado con gentamicina (50µg/ml), piruvato sódico (50µg/ml), bicarbonato sódico (2,2 mg/ml) y un 20% de suero de cabra en celo para su posterior desarrollo embrionario. A las 48 horas de la inseminación, se evaluó la división de los embriones clasificándolos en embriones de 2 células y embriones de más de 2 células

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un análisis de varianza. Las diferencias se consideran significativas a partir de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Las Tablas 1 y 2 contienen los resultados del efecto de los distintos sistemas de lavado y/o selección de espermatozoides sobre la fecundación y posterior desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos de cabras prepúberes. El porcentaje de penetración total a las 17 horas de la inseminación así como el porcentaje de división total y de embriones de más de 2 células a las 48 horas post-inseminación fue significativamente superior para el tratamiento control respecto a los otros tres. Si bien se observa la misma tendencia a la superioridad del mismo tratamiento en el porcentaje de penetración normal, poliespérmica y anormal a las 17 horas o en el porcentaje de embriones con sólo 2 células a las 48 horas post-inseminación, sólo se mantienen diferencias significativas en el porcentaje de penetración normal con respecto a los tratamientos Percoll y Ficoll.

Los resultados obtenidos en el presente experimento indican que el lavado previo y la selección de los espermatozoides no tan sólo no son necesarios sino que además presentan un efecto perjudicial sobre los porcentajes de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*. Ello hace suponer que, en nuestras condiciones, la calidad de los eyaculados sería la suficiente para no necesitar ningún tratamiento de selección previo. Además, las constantes diluciones realizadas en el tratamiento control hasta llegar a la de la gota de inseminación (1:1000) minimizaría el efecto negativo del plasma seminal.

Tabla 1: Efecto de diferentes sistemas de lavado y/o selección de los espermatozoides sobre el porcentaje de penetración total y su distribución en penetración normal, poliespérmica y anormal.

	Nº ovocitos	% PEN TOT	% 2PN +C	% PS	% PAN
CONTROL	122	52,5 ^a	23,0 ^a	17,2	12,3
FICOLL	106	32,1 ^b	12,3 ^{bc}	12,3	7,6
PERCÖLL	102	23,5 ^b	6,9 ^c	12,8	3,9
SWIM-UP	111	36,0 ^b	17,1 ^{ab}	11,7	7,2

a,b,c: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Tabla 2: Efecto de diferentes sistemas de lavado y/o selección de los espermatozoides sobre la división embrionaria a las 48 horas de la inseminación

	Nº ovocitos	% DIV TOT	% 2 CÉLULAS	% > 2CÉLULAS
CONTROL	313	44,4 ^a	13,1	31,3 ^a
FICOLL	319	32,6 ^b	11,3	21,3 ^b
PERCOLL	248	22,2 ^b	8,1	14,1 ^b
SWIM-UP	376	25,3 ^b	11,2	14,1 ^b

a,b: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

BIBLIOGRAFÍA

- Choi, Y.H., Fukui, Y., Ono, H. (1991) Effects of media and the presence of bovine epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and development capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* **36**:863-873.
- De Smedt, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A., Cognié, Y. (1992) In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* **37**:1049-1060
- Gordon, I., Lu, K.H. (1990) Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* **33**:77-87.
- Harrison, R.A.P. (1976) A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **48**:347-353.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, M.A., First, N.L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**:1171-1180.
- Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L., First, N.L. (1990) In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available Follicle Stimulating Hormone. *Theriogenology* **34**:1035-1039.
- Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H., Schleger, W. (1990) In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* **33**:477-485
- Utsumi, K., Kato, H., Iritani, A. (1991) Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogeneology* **35**:695-703.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.L., Brackett, B.A. (1991) In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* **44**:1177-1182.