

**EFFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO OVOCITO-ESPERMATOZOIDE SOBRE
LA POSTERIOR DIVISIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS DE
CABRA PREPÚBER MADURADOS Y FECUNDADOS *IN VITRO***

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

Departament de Patologia i de Producció Animals. Facultat de Veterinària.

Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

INTRODUCCIÓN

La Fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* ha dado lugar a un normal desarrollo embrionario y al nacimiento de animales vivos (Brackett y col., 1982). Sin embargo, el número de animales nacidos vivos por sistemas de FIV es muy bajo en relación al número de embriones producidos en el laboratorio. La baja viabilidad de estos embriones podría ser debida a anomalías que se producirían durante los primeros momentos de la fecundación. Una de las principales causas del no desarrollo de los cigotos es la poliespermia (Iwasaki y col., 1989). Esta anomalía puede ser debida a un exceso de espermatozoides en el medio de fecundación o a un tiempo de inseminación demasiado largo. *In vitro*, los ovocitos pueden no desarrollar el bloqueo contra la poliespermia con la misma efectividad que los ovocitos madurados *in vivo* (Leibfried-Rutledge y col., 1987), y, además, este bloqueo se reduce en ovocitos sobremadurados (Szöllösi, 1975). Por ello, sería necesario controlar el tiempo de contacto del ovocito con el espermatozoide así como la concentración de espermatozoides para minimizar la incidencia de poliespermia. Además, los ovocitos incubados con los espermatozoides durante un largo período de tiempo en un volumen de medio relativamente pequeño están expuestos a la acción de enzimas hidrolíticos, liberados por los espermatozoides muertos, que pueden tener un efecto perjudicial en el potencial desarrollo de los cigotos. Generalmente, en el bovino, los ovocitos y espermatozoides se mantienen en co-cultivo entre 18 y 24 horas (revisado por Brackett y Zuelke, 1993) si bien Rehman y col. (1994) consiguen porcentajes de división y desarrollo embrionario superiores después de 24 horas de co-cultivo. Long y col. (1993) indican que el tiempo de co-cultivo de los ovocitos con los espermatozoides no afecta al porcentaje de blastocistos obtenidos pero sí que incrementa significativamente el porcentaje de cigotos poliespérmicos.

Así, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tiempo de co-cultivo ovocito-espermatozoide sobre el posterior desarrollo embrionario.

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 medio TCM199/Hepes 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 de 50 µl de medio (8 ovocitos/gota) cubiertas por aceite de parafina durante 27 horas a 38.5°C y una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

La capacitación de los espermatozoides y la fecundación de los ovocitos se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Younis y col. (1989) pero utilizando una concentración de heparina de 100 µg/ml de heparina y un tiempo de capacitación de 45 minutos.

A las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 horas después 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 test χ^2 . Las diferencias se consideran significativas a partir de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados del efecto del tiempo de contacto ovocito-espermatozoide sobre la posterior división y desarrollo embrionario de ovocitos de cabra prepúber madurados y fecundados *in vitro* se presentan en la Tabla 1. El porcentaje total de división celular a las 48 horas post-inseminación aumentó progresivamente con el tiempo de contacto de los espermatozoides con los ovocitos hasta un máximo de un 45,5% (35/77) después de 24 horas de co-cultivo, si bien este valor no difirió significativamente del valor 31,2% (24/77) obtenido a las 20 horas. El porcentaje de embriones que presentaban solo 2 células a las 48 horas fue siempre inferior al 12% y no se vio afectado por el tiempo de inseminación. Contrariamente, el porcentaje de embriones de más de 2 células aumentó significativamente con el tiempo hasta alcanzar valores de 18,2% (12/66), 19,5% (15/77), 33,8 (26/77) y 30,3% (20/66) después de 16, 20, 24 y 28 horas respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los mayores porcentajes de división, a las 48 horas de la inseminación, se obtienen después de un período de co-incubación de los ovocitos con los espermatozoides de 24 horas (45,5%), aunque estos no difieran significativamente de los obtenidos con 20 y 28 horas de co-incubación. En el bovino, Rehman y col. (1994) también indican porcentajes de división significativamente superiores después de 24 horas de incubación.

Los distintos porcentajes de fecundación observados entre los tiempos de co-incubación pueden ser debidos a los distintos intervalos de tiempo que necesita cada espermatozoide para completar su capacitación y reacción acrosómica (Bedford, 1983).

Un posible factor que podría modificar este tiempo estaría relacionado con los machos utilizados para la recogida del semen. Así, Leibfried-Rutledge y col. (1989) observan que el período de tiempo necesario de penetración de los ovocitos varía según los machos utilizados aunque, después de 24 horas de incubación, los espermatozoides de todos los machos son equivalentes en cuanto al porcentaje de penetración y fecundación

Tabla 1: Efecto del tiempo de contacto ovocito-espermatozoide sobre la división embrionaria *in vitro*

Tiempo de contacto	Nº ovocitos inseminados	Total divididos % (nº)	% (nº) de zigotos que presentaban un estadio de :	
			2 células	>2 células
2	49	0 ^d	0	0 ^c
4	146	15,1 ^{bc} (22)	4,8 (7)	10,3 ^b (15)
6	56	10,7 ^c (6)	1,8 (1)	8,9 ^{bc} (5)
8	134	23,1 ^{bc} (31)	9,7 (13)	13,4 ^b (18)
12	145	24,1 ^b (35)	9,7 (14)	14,5 ^b (21)
16	66	24,2 ^b (16)	6,1 (4)	18,2 ^{ab} (12)
20	77	31,2 ^{ab} (24)	11,7 (9)	19,5 ^{ab} (15)
24	77	45,5 ^a (35)	11,7 (9)	33,8 ^a (26)
28	66	36,4 ^{ab} (24)	6,1 (4)	30,3 ^a (20)

a,b,c,d: Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas

BIBLIOGRAFÍA

Bedford, J.M. (1983) Significance of the need of sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* **33**:698-704.

Brackett, B.G., Zuelke, K.A. (1993) Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* **39**:43-64.

Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A. (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* **27**:147-158.

Iwasaki, S., Shioya, Y., Masuda, H., Hanada, A., Nakahara, T. (1989) Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Res.* **22**:83-91.

Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H., Northey, D.L., First, N.L. (1987) Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* **36**:376-383.

Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Parrish, J.J., D.L., First, N.L. (1989) *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **31**:61-74.

Long, C.R., Chase, C.N., Balise, J.J., Duby, R.T., Robl, J.M. (1993) Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameters and development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* **39**:261

Rehmann, N., Collins, A.R., Suh, T.K., Wright Jr., R.W. (1994) Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, **41**:1447-1452.

Szöllosi, D. (1975) Mammalian eggs aging in the fallopian tubes. Dins: Blandau, R.J. (ed.): Aging gametes. Their biology and pathology. Proc. Int. Symposium on Aging Gametes, Seattle, Washington.

Younis, A.I., Brackett, B.G., Fayrer-Hosken, R.A. (1989) Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* **23**:189-201.