

DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS PROCEDENTES DE OOCITOS MADURADOS IN VITRO EN PRESENCIA DE ETANOL

Díez, C.; Duque, P.; Hidalgo, C.; Facal, N.; Gómez, E.

SERIDA-CENSYRA. Camino de los Claveles 604, Somió. 33203 Gijón
Principado de Asturias

INTRODUCCION

El medio de cultivo empleado para la maduración in vitro puede afectar no sólo al porcentaje de oocitos que alcanzan la metafase II o a su aptitud para ser fecundados, sino que también puede tener un efecto determinante sobre la producción final de blastocistos (Bavister, 1992). Se desconocen en buena medida los requerimientos para la maduración del oocito bovino, especialmente para la maduración del citoplasma. El empleo de medios químicamente definidos permitiría identificar los factores activos que intervienen en este proceso (Mermillo et al, 1999). La adición de etanol al medio de maduración in vitro da lugar a la activación del oocito y lo induce a dividirse sin necesidad de fecundación. De este modo, el etanol, bien sólo o con otras sustancias (citocalasina B, cicloheximida), se utiliza en concentraciones determinadas como agente partenogénético (Fukui et al, 1992; Nagai, 1992; Presicce y Yang, 1993; Tanaka et Kanagawa, 1997). Varias técnicas de producción de embriones in vitro recurren a la utilización del etanol como solvente para determinados compuestos insolubles en agua (p.ej. 17β Estradiol) y los nuevos sistemas de criopreservación de oocitos y embriones (Vajta et al, 1998) utilizan altas concentraciones de alcoholes como agentes crioprotectores. Su empleo presupone que las dosis con que se trabaja carecen de efectos perjudiciales sobre el desarrollo embrionario.

Recientemente se ha demostrado que la presencia de etanol durante la maduración, aunque no modifica los índices de maduración, las tasas de polispermia ni las divisiones iniciales del cigoto, da lugar a una reducción de la producción de blastocistos en el desarrollo (Avery y Greve, 2000) a partir de concentraciones del 0,3%.

El objetivo de este trabajo es estudiar si la presencia de un 1,5% de etanol durante la maduración afecta al subsiguiente desarrollo embrionario, previamente a su utilización como solvente incluido en un medio de maduración químicamente definido.

MATERIAL Y METODOS

Se recogieron ovarios de vacas de raza Asturiana de los Valles en el Matadero Central de Asturias, y se transportaron en solución salina y antibióticos a 25-30° C. En el laboratorio, los ovarios se lavaron 2 veces con agua corriente y 1 vez con solución salina estéril. Tanto la temperatura ambiental como la de los medios de mantenimiento se mantuvieron a 35° C. Mediante un sistema de vacío conectado a una aguja de 18G, se aspiraron los folículos de 1 a 8 mm. El líquido folicular con los complejos cumulus-oocito (CCOs) se recogió en un tubo con TCM199 Hepes + 0.4 g/L BSA + 2 UI Heparina/ml y se aclaró con el mismo medio a través de una membrana de concentración. Los CCOs se seleccionaron a 20X. Sólo se usaron

oocitos con citoplasma homogéneo incluidos en un cumulus compacto con, al menos, tres capas de células. Los CCOs se lavaron 3 veces en el medio de mantenimiento y 2 en el medio de maduración asignado a cada uno de los tres grupos experimentales.

El medio de maduración usado rutinariamente en nuestro laboratorio contiene un 0,5% de etanol (solvente del E₂). Para realizar el estudio se elaboró un medio básico de maduración (MM) fue TCM199-25mM bicarbonato, 1 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH y 1 µg/ml E₂ a partir del cual se elaboraron los 3 grupos experimentales:

- 1) MM + 10% FCS (Grupo FCS; concentración final de etanol 0,5%)
- 2) MM + 0,5 mg/ml de polivinil-alcohol + 1% Etanol (Grupo Etanol; concentración final de etanol 1,5%)
- 3) MM + 0,5 mg/ml de polivinil-alcohol (Grupo PVA; concentración final de etanol 0,5%): control.

Los CCOs se incubaron a 39°C, 5% CO₂ en aire y 90% de humedad relativa. Después de 22-24 horas de maduración, los oocitos se fertilizaron in vitro con espermatozoides motiles obtenidos mediante swim-up a partir de semen congelado y descongelado. La concentración en el medio de fertilización fue de 2 x 10⁶ espermatozoides por ml de medio de fecundación. Al cabo de 18 horas, las células del cumulus se eliminaron por agitación y los presuntos cigotos se cultivaron en medio SOF modificado con aminoácidos, citrato y mioinositol (SOFaaci), al cual se añadió un 5% de FCS a las 64 horas post-inseminación (PI). Las condiciones de cultivo fueron 39° C, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de humedad relativa. El medio de cultivo se renovó durante los días 3 y 6 y el desarrollo se evaluó hasta el día 8 PI.

Los datos obtenidos fueron sometidos a ANOVA y al test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1 Desarrollo in vitro de embriones bovinos tras maduración en presencia de FCS, Etanol o PVA

	R	N	% Mórulas	%Bl. Día 6	%Bl. Día 7	%Bl. Día 8	%Exp Día 7
FCS	5	162	55.5±1.4 ^a	24.4±3.6 ^a	42.9±2.4 ^a	43.3±1.8 ^a	17.3±2.1
Etanol	5	184	36.9±3.2 ^b	14.2±2.7 ^{ab}	30.4±2.1 ^b	32.9±3.0 ^{ab}	13.4±2.3
PVA	4	147	37.0±2.6 ^b	8.4±0.7 ^b	25.0±7.1 ^b	29.1±8.1 ^b	8.9±2.1

Porcentajes calculados sobre el número de oocitos en maduración; R: número de repeticiones del experimento; N: número de oocitos puestos en maduración; % Mórulas: mórulas obtenidas en día 6 PI, % Bl. Día 6, 7 y 8: blastocistos obtenidos en día 6, 7 y 8 PI respectivamente; %Exp Día 7 blastocistos expandidos en día 7.PI. ANOVA: superíndices diferentes (a, b) en la misma columna difieren significativamente (p<0.05)

Tanto los porcentajes de división a las 72 h PI (88.2±2.9, 89.4±1.4 y 82.8±7.4 para etanol, FCS y PVA respectivamente) como el desarrollo embrionario hasta la fase de mórula (% de embriones de 5-8 células en día 3: 63.9±5.9, 68.9±4.9 y 53.8±7.3) fueron similares en los tres grupos estudiados (p>0.05). La presencia de etanol al 1,5% en el medio de maduración tampoco afectó de forma significativa a la producción de blastocistos en día 6, al grado de expansión en día 7 ni a la

producción total de blastocistos tras 8 días de cultivo comparada con el FCS. No obstante, las tasas de blastocistos en día 7 fueron más bajas que las obtenidas en presencia de FCS. Con relación al grupo PVA, el incremento en un 1% de la concentración de etanol no tuvo efecto significativo sobre el desarrollo embrionario y tendió a acelerar la aparición de los blastocistos. Avery y Greve (2000) observaron un efecto perjudicial del etanol en tras maduración en condiciones semidefinidas (con BSA y sin hormonas) con concentraciones de etanol superiores al 0,3%, pero no observaron variaciones en la velocidad de formación de blastocistos entre los días 7 y 9. Sin embargo, los resultados obtenidos tras maduración en presencia de un 0,3% o de un 1% de etanol fueron semejantes.

Aunque la presencia de suero aumenta los índices de producción de blastocistos, estos resultados demuestran que es posible utilizar concentraciones de un 1-5% de etanol como solvente en la elaboración de medios químicamente definidos para el estudio de los factores que intervienen en el proceso de maduración in vitro. Sin embargo, es necesario estudiar la viabilidad de los embriones producidos en estas condiciones (gestación, resistencia a la criopreservación y número de células)

REFERENCIAS

- Avery B, Greve T (2000) Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, 55:438-445.
- Bavister, B. (1992) Problems of in vitro embryo development in domestic animals. *Virtanen Institute Symposium on In Vitro culture of Domestic Animal Embryos*, 21-27
- Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y, Ohsaki K (1992) Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 33:357-362
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y (1999) Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*. 54:449-60
- Minamihashi A., Watson AJ., Watson PH., Church RB. and Schultz AG (1993) Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol. *Theriogenology* 40: 63-76.
- Nagai, T. (1992) Development of bovine in vitro-matured follicular oocytes activated with ethanol. *Theriogenology* 37: 869-875.
- Presicce GA., and Yang X. (1993) Dynamics of activation of in vitro-matured bovine follicular oocytes following combined ethanol and cycloheximide treatment. *Theriogenology* 39: 290
- Tanaka H, Kanagawa H (1997) Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. *Anim Reprod Sci*. 49:113-23
- Vajta G, Holm P, Kuwayama H, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. (1998) A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos the OPS vitrification. *Mol Reprod Dev* 45: 560-565.

Trabajo financiado por el Proyecto 1FED97-0023.