

FUENTES DE VARIABILIDAD EN LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES OVINOS Y COMPROBACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A TÉRMINO.

B. Aguilar, N. Poulin¹, M.J. Cocero², J. Folch, J.L. Alabart.

Servicio de Investigación Agroalimentaria. Apdo 727, 50080 Zaragoza.

¹INRA-PRMD, 37380 Nouzilly, France

²SGIT/INIA. Avda. Puerta de Hierro km 5,9. 28040-Madrid

INTRODUCCIÓN

La producción in vitro de embriones ovinos alcanza un porcentaje de éxito en la actualidad que raramente supera el 30% (Cognie, 1999). Además de la existencia de numerosos protocolos para producir in vitro los embriones de diferentes especies, o incluso de una misma especie (Ptak y cols, 1997; Guler y cols, 2000; Hasler, 2000), las personas implicadas en este trabajo conocen bien la necesidad de estandarizar apropiadamente los protocolos en cada laboratorio. Aunque los factores de variación abarcan desde la elección del protocolo hasta las características físicas del laboratorio y materiales a utilizar (Boone y Shapiro, 1990; Bavister, 1995), hemos querido poner de manifiesto en este trabajo algunas fuentes de variabilidad relativas a la utilización de productos no comerciales, como son el semen y el suero de oveja en celo, que afectan directamente al número de embriones producidos con una misma técnica aplicada en idénticas condiciones.

Además, como fruto de las transferencias de embriones realizadas, damos cuenta del nacimiento de los primeros corderos producidos in vitro en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 323 ovocitos, obtenidos por aspiración a partir de ovarios de matadero, que se distribuyeron en 3 experiencias. La manipulación, medios y suplementos utilizados fue idéntica excepto para el objetivo de cada una de ellas. La metodología utilizada para la producción de embriones fue la descrita por Guler y cols. (2000). Brevemente: la maduración se realizó con pFSH (1µg/ml) en medio M199 suplementado con fluido folicular (10%), durante 24 h a 38,5°C en atmósfera de 5%CO₂. Los ovocitos se fecundaron en tubos con DMH suplementado con lactato cálcico, 8 mM, pH: 7.7. Se utilizó semen congelado procedente de un pool de varios machos. Tras un gradiente discontinuo de Percoll (45/90%), se capacitaron los espermatozoides en DMH (pH:7,3) con 20% suero de oveja en celo (SOC) tamponado con Hepes (10 mM) durante 1h a 38,5 °C. Se añadieron 10⁶ espermatozoides/ml y se incubaron durante 18-20 h a 38,5 °C en tubos cerrados. Los cigotos se cultivaron en microgotas de SOF (1 embrión/µl) cubiertas por aceite mineral. Se incubaron durante 6-7 días a 38,5 °C en una atmósfera húmeda con 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂. A las 24 h del inicio del cultivo se añadió 10% FCS a los pocillos y se calculó la tasa de división. El día 7 se evaluó el número de blastocistos obtenidos. Las experiencias realizadas fueron:

Experiencia 1: Comparación entre reactivos químicos para la preparación de medios.

Se hicieron 2 grupos de ovocitos que se maduraron, fertilizaron y cultivaron en medios con idéntica composición química pero con reactivos químicos procedentes de 1: Prolabo (n=40) y 2: Sigma (n=43). El fluido folicular, la pFSH, el SOC y el semen utilizados, habían sido previamente contrastados en el laboratorio de Nouzilly.

Experiencia 2: Influencia del suero de oveja en celo en la tasa de fertilización y desarrollo de los embriones. Se distribuyeron 90 ovocitos en 3 grupos cuya única diferencia en el tratamiento fue el uso de 3 SOC diferentes: Referencia, pool preparado a partir de sangre de 3 ovejas en celo (pool 98) y suero de la oveja 6736.

Experiencia 3: Comparación de lotes de semen congelado. Los ovocitos (n=150) se trataron de forma idéntica excepto en la fertilización in vitro donde se utilizaron 3 pool de semen congelado: Pool F: Referencia; pool 1: semen de 3 machos; pool 2: semen de 3 machos diferentes. La preparación, congelación y descongelación del semen fue la misma en los 3 casos.

De los blastocistos obtenidos en las experiencias 1 y 2 se transfirieron 16 de ellos en fresco según el método descrito por Ramón y cols.(1991). Los embriones de la experiencia 3 se congelaron en fase de mórula compacta al sexto día de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación entre reactivos químicos arrojó resultados similares en ambos grupos si bien tanto la tasa de división como el número de blastocistos obtenidos el día 7 fue sensiblemente superior en el segundo grupo, en que los medios utilizados fueron los de Sigma (Tabla 1). El SOC demostró ser crítico en el proceso de la producción de embriones ya que influye tanto en la tasa de fertilización como en el número de blastocistos (Tabla 2). Así mismo, las diferencias observadas en la tasa de división dependiendo del semen (Tabla 3), apuntan a una importante variación en la capacidad de fertilización in vitro de los moruecos utilizados, ya que la técnica de congelación y preparación empleada fue la misma. Aunque las variables SOC y semen intervienen en las primeras fases del proceso de FIV, en nuestros resultados su influencia también se detecta en el índice final de blastocistos. Estos resultados sugieren que, si bien la utilización de diferentes reactivos comerciales no parece influir en el rendimiento final, si es necesaria una cuidadosa selección del SOC y del semen a utilizar cuando se aplica este protocolo de producción in vitro de embriones. El efecto negativo producido por el uso de productos no adecuados puede falsear la idoneidad de un determinado protocolo.

Tabla 1-Comparación de reactivos químicos

Reactivos	COC	CIV	División	B 7d
1	40	33	24 (60%)	9 (22,5%)
2	43	35	32 (74,4%)	13 (30,2%)

Tabla 2- Comparación de sueros de oveja en celo

SOC	COC	CIV	División	B 7d
Francia	30	27	25 (83,3%) ^a	6 (20%)
Pool 98	30	24	8 (26,7%) ^b	0
6736	30	30	24 (80%) ^a	2 (6,6%)

^{a,b}: P<0,01

Tabla 3- Comparación de lotes de semen congelado

Semen	COC	CIV	División	MC 6d
Pool F	50	43	35 (70%) ^a	16 (32%)
Pool 1	50	45	10 (20%) ^b	4 (8%)
Pool 2	50	41	12 (24%) ^b	3 (6%)

^{a,b}: P<0,01

En cuanto a las transferencias en fresco de embriones producidos in vitro (Tabla 4), la mitad de los embriones se transfirió a receptoras sincronizadas con los embriones, y la otra mitad a receptoras sincronizadas con 24 h de retraso. Se transfirieron 2 embriones por oveja. En 5 receptoras de ambos grupos se obtuvieron valores positivos de P4 el día 17. De estas 5 receptoras, se confirmó la presencia de fetos por ecografía el día 42 en 3 de ellas. Una de las receptoras abortó hacia la mitad de la gestación y las otras dos parieron 3 corderos de forma natural y con pesos considerados normales en los corderos producidos in vivo en esta raza. Del parto doble, el cordero hembra murió a las 24 horas y el macho a los 6 días. El cordero restante no mostró signos de crecimiento anormal, como ocurre en algunos animales producidos in vitro (Thompson y cols. 1995), y se desarrolló hasta alcanzar el estado adulto.

Tabla 4- Transferencia de embriones producidos in vitro

Receptoras	RE-TE	Embriones	FIV-TE	P4 (ng/ml)	Eco 42d	Nacidos
1	8d	B exp/Bexp	7d	>0,5	2	2
2	8d	B/B	7d	>0,5	-	-
3	8d	B/B	7d	0	-	-
4	8d	JB/JB	7d	0	-	-
5	8d	B/B exp	8d	>0,5	2	1
6	8d	JB/B	8d	>0,5	-	-
7	7d	B/B	7d	0	-	-
8	7d	JB/JB	7d	0,4	1	0

RE-TE: intervalo en días entre la retirada de la esponja y la transferencia

FIV-TE: intervalo en días entre la fecundación in vitro y la transferencia

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bavister, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*. 1:91-148.
- Boone, W. R., and S. S. Shapiro. 1990. Quality control in the in vitro fertilization laboratory. *Theriogenology*. 33:23-50.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51:105-116.
- Guler, A., N. Poulin, P. Mermillod, M. Terqui, and Y. Cognié. 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-1, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 54:209-218.
- Hasler, J. F. 2000. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science*. 60-61:81-89.
- Ptak, G., L. Loi, M. Dattena, P. Cappai, and M. Tischner. IVM/IVF techniques in prepubertal lamb oocytes, p. 192. 13e Réunion A.E.T.E. 1997.
- Ramon, J., J. Folch, A. Fernandez-Arias, J. Alabart, M. Cocero, and E. Echegoyen. 1991. La técnica de la transferencia de embriones en ganado ovino. *ITEA*. 11:61-63.
- Thompson, J. G., D. K. Gardner, P. A. Pugh, W. H. McMillan, and H. R. Tervit. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*. 53:1385-1391.