

ESTUDIO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE FECUNDACIÓN EN OVOCITOS PROVENIENTES DE OVINOS PREPÚBERES

Catalá María, Romaguera Roser, Izquierdo Dolors, Morato Roser, Paramio M Teresa
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat
Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. Email: Teresa.Paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

El interés de utilizar hembras prepúberes como productoras de embriones es acortar el intervalo generacional y así intensificar el índice de ganancia genética. Por las características de los ovocitos de hembras prepúberes, éstos son un buen material para estudios de reproducción humana como modelo de "ovocitos de baja calidad".

Distintos trabajos han demostrado que ovocitos provenientes de ovinos prepúberes logran alcanzar un alto porcentaje de maduración nuclear, pero las tasas de fecundación y desarrollo embrionario son menores que con ovocitos de animales adultos. Los bajos resultados, en cuanto a la producción de embriones, pueden deberse a una fecundación deficiente, ya sea por la utilización de un medio inadecuado o un exceso o insuficiencia en la capacitación espermática (Armstrong, 2001).

La capacitación varía según especies con una duración de entre 1-2 h en ovino y 10-12 h en ratas (Austin, 1970). La capacitación espermática incluye un conjunto de modificaciones: alteraciones en concentraciones y metabolismo de iones (Yanagimachi, 1994), fluidez de la membrana (Harrison y Miller, 2000), hiperpolarización de la membrana (Zeng y col., 1995) y cambios en la concentración del AMPc (White y Aitken 1989), entre otros.

Así, el objetivo del trabajo fue estudiar diferentes tratamientos de capacitación de espermatozoides y de protocolos de fecundación con el fin de mejorar la capacitación espermática y, de esta manera, obtener un mayor número de embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se recuperaron mediante la técnica del slicing de ovarios de ovejas de 3 a 6 meses de edad. Se seleccionaron los ovocitos con 3 o más capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo. La maduración in vitro se llevó a cabo adaptando los protocolos de Ptak y col. (2006) y Grazul-Bilska y col. (2003), en placas de 4 pocillos con 500 µl de medio de maduración (TCM199 suplementado con 5 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH, 1 µg/ml E₂, 10 ng/ml EGF, 100 µM cisteamina, 0,2 mM Piruvato sódico, 2% ATB y 10% SFB) cubiertos con 200 µl de aceite mineral durante 24 h a 38,5 °C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire y máxima humedad.

Experimento 1: se utilizó una mezcla de semen de 3 machos la cual se mantuvo 1.30 h a temperatura ambiente (Dattena y col., 2003). Se seleccionaron los espermatozoides y se capacitaron en medio mDm (Younis y col., 1991) utilizando diferentes concentraciones y tiempos de los agentes capacitantes: *Tratamiento 1 (T1):* 100 µg/ml heparina, 45 min; *T2:* 100 µg/ml heparina, 1 h; *T3:* 200 µg/ml heparina, 45 min; *T4:* 200 µg/ml heparina, 1 h; *T5:* 10 µg/ml heparina + 200 nM ionomicina, 15 min; *T6:* 10 µg/ml heparina + 200 nM ionomicina, 30 min. La Fecundación in vitro (FIV) se llevó a cabo en gotas de 50 µl de medio TALP (Younis y col., 1991) con 15 ovocitos/gota y 1x10⁶ espermatozoides/ml durante 22 h en una atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

Experimento 2: se utilizó la misma mezcla de semen de 3 machos utilizada en el Exp.1 Los espermatozoides se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1.30 h y posterior a su selección, se cultivaron directamente en gotas con los ovocitos (15 ovocitos/gota de 50 µl) en medio SOF con un 20% de Suero de Oveja en Celo (SOC) durante 22 horas en una atmósfera con un 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ y máxima-humedad. Los resultados de este

experimento se compararon con los obtenidos al capacitar a los espermatozoides con ionomicina y heparina.

En ambos experimentos se tomaron muestras de fecundación para analizar el estadio de pronúcleos. Para ello, se tomaron muestras a las 17 h post-inseminación (hpi), se fijaron con una solución de etanol:acético (3:1) durante 24 h y posteriormente se tiñeron con Lacmoide al 1%.

Finalizada la FIV, los presuntos cigotos se denudaron con un suave pipeteo y se colocaron en microgotas de 20 μ l de medio SOF (6 ovocitos / gota) en una atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ y máxima humedad para su cultivo in vitro (CIV). Se observó división a las 48 hpi y mórulas y blastocistos a los días 8 y 9.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

En la *tabla 1* se muestran los resultados del CIV para los diferentes tratamientos de capacitación espermática. Únicamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos T2 y T5, obteniéndose una mayor división cuando los espermatozoides se capacitaron durante 15 min con ionomicina y heparina (T5). Esto se correlaciona con lo estudiado por Urdaneta y col. (2004), los cuales observaron que la presencia de ionomicina en el medio de capacitación de espermatozoides caprinos proporcionaba un mayor número de embriones. Respecto al desarrollo embrionario, no hemos observado diferencias entre los porcentajes de mórulas y blastocistos obtenidos en los distintos tratamientos.

En las *tablas 2 y 3* se muestran los porcentajes de fecundación utilizando los diferentes protocolos. Hemos obtenido un mayor número de ovocitos correctamente fecundados, divididos, mórulas y blastocistos al utilizar medio SOF con SOC en la fecundación respecto al TALP con ionomicina y heparina (52% y 27%; 67% y 38%; 25% y 1%; 6% y 1% respectivamente).

En conclusión, en nuestras condiciones y con ovocitos provenientes de ovinos prepúberes, la utilización de SOF añadiendo suero de oveja en celo produce un mayor número de blastocistos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Armstrong D.T 2001. *Theriogenology* 55:1303-1322.
- Austin CR 1970. *J. of Reprod. and Fert.* 12 39–53.
- Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P. 2004. *Theriogenology* 62: 481–493.
- Grazul-Bilska A.T., Choi J.T., Weigl R.M., Kirsch J.D., Kraft K.C., Reynolds L.P., Redmer D.A., 2003. *Theriol.* 59:1449-1457
- Harrison y Miller 2000. *Mol. Reprod. and Devel-* 55 220–228.
- Ptak G., Matsukawa K., Palmieri C., Della Salda L., Scapolo P.A., Loi P. 2006. *Human Rep.* 21(9):2228-2237
- Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio MT, Izquierdo D. *Zygote.* 2004 Nov;12(4):277-84
- White y Aitken 1989 *Gamete Research* 22 163–177.
- Yanagimachi R.y col., 1994 Eds E Knobil & JD Neill\$ New York: Raven Press Ltd.
- Younis A.I., Zuelke K.A., Harper K.M., Oliveira M.A.L., Brackett B.G. 1991. *Biol. of Reprod.* 44:1177-1182.
- Zeng Y, Clark E.N., Florman HM, 1995. *Devel. Biology* 171 554–563.

Tabla 1: Desarrollo embrionario en ovocitos de ovejas prepúberes según diferentes tratamientos de capacitación con semen fresco.

Tratamiento capacitante	Nº total. Inseminados	Ovo. Divididos (%)	8 días <i>post-inseminación</i>		
			<16 células (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
T1	84	26 (31) ^{a,b}	16 (19)		1 (1)
T2	84	20 (24) ^b	13 (15)	1 (1)	
T3	72	27 (37) ^{a,b}	12 (17)		3 (4)
T4	93	28 (31) ^{a,b}	13 (14)		
T5	84	36 (43) ^a	13 (15)	2 (2)	
T6	81	27 (33) ^{a,b}	12 (15)		2 (2)

^{a,b}: Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Test de Fisher, P<0.05).

Tabla 2 : Efecto de 2 protocolos de capacitación y fecundación sobre el estadio nuclear de los cigotos.

Tratamiento capacitante	nº total inseminados	nº ovocitos fecundados (%)	Correctamente fecundado (%)	Poliespérmico (%)	Asincrónico (%)
mDm + Iono.+Hep.	92	29 (31) ^a	25 (27) ^a	3 (3)	1 (1)
SOF+20% SOC	79	45 (57) ^b	41(52) ^b	4 (5)	

^{a,b}: Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Test de Fisher, P<0.05).

Tabla 3: Efecto de 2 protocolos de capacitación y fecundación sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de ovejas prepúberes.

Tratamiento capacitante	Nº total. Inseminados	Ovo. Divididos (%)	48hs <i>post-inseminación</i>	8 días <i>post – inseminación</i>		
			<16células (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	
mDm+ Iono.+Hep.	165	63 (38) ^a	25 (15)	2 (1) ^a	2 (1) ^a	
SOF+20% SOC	174	116 (67) ^b	39 (22)	44 (25) ^b	11 (6) ^b	

^{a,b}: Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Test de Fisher, P<0.05).

STUDY OF DIFFERENT IN VITRO FERTILIZATION PROTOCOLS IN PREPUBERTAL OVINE OOCYTES

ABSTRACT: Oocytes-cumulus complexes recovered from lamb ovaries were in vitro matured in TCM 199 medium and fertilized with two different protocols TALP (modified by Younis A.I. et.al 1991) and SOF. In experiment 1 we fertilized in TALP medium using 6 different sperm capacitation mediums: *T1*: 100 µg/ml heparin, 45 min; *T2*: 100 µg/ml heparin, 1 h; *T3*: 200 µg/ml heparin, 45 min; *T4*: 200 µg/ml heparin, 1 h; *T5*: 10 µg/ml heparin + 200 nM ionomycin, 15 min; *T6*: 10 µg/ml heparin + 200 nM ionomycin, 30 min. We observed an increase in oocyte cleavage using 10 µg/ml heparin with 200 nM ionomycin for 15 min. No difference was found in morula and blastocysts production. In experiment 2 we fertilized comparing TALP and SOF. Our results showed an incrementing in vitro embryo production when using SOF medium with 20% ovine estrous serum.

Keywords: Ovine, IVF, sperm capacitation.