

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE INSULINA-TRANSFERRINA-SELENIO Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL MEDIO DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PROCEDENTES DE TERNERAS PREPÚBERES

Córdova, B.L.¹, Morató, R.¹, Izquierdo, M.D.², Paramio, M.T.² y Mogas, T.¹
¹Departamento de Medicina y Cirugía Animales. ² Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.
bladimir_cordova@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Diferentes trabajos describen una menor capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos procedentes de animales prepúberes respecto a los de animales adultos y lo atribuyen a una falta o incapacidad para completar la maduración citoplasmática. Se ha observado que, si bien estos ovocitos consiguen realizar la maduración nuclear y que las primeras divisiones embrionarias se dan en un porcentaje más o menos igual al de los embriones de vacas adultas, estos no logran una correcta maduración citoplasmática y presentan una disminución en la obtención de blastocitos (Khatir et al., 1998).

La adición de ácido ascórbico al medio de maduración cumple un papel antioxidativo, ya que la tensión oxidativa del medio de maduración es perjudicial para las células de la granulosa y el ovocito (Tatemoto et al., 2001). El ácido ascórbico incluido en un medio de maduración puede ayudar a proteger las células del cúmulus de la apoptosis y ayuda en la maduración citoplasmática del ovocito (Wu et al., 2006).

Por otra parte, la adición de insulina ayuda a mejorar el crecimiento celular y el porcentaje de blastocistos, ya sea sola o en combinación con transferrina y selenio (Fouladi-Nashta y Campbell, 2006). Así, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la adición de insulina-transferrina- selenio y ácido ascórbico al medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos prepúberes a nivel de maduración citoplasmática del ovocitos y su posterior desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro*. La maduración, la fecundación y el cultivo embrionario *in vitro* se realizaron según el protocolo descrito por Rizos y colaboradores (2002). Brevemente, se recogieron ovarios de terneras en el matadero y se transportaron al laboratorio en PBS a 37°C. Los ovocitos se obtuvieron mediante aspiración y se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo con tres o más capas de células del cúmulus. Los ovocitos obtenidos se dividieron en tres grupos experimentales: 1) **TCM**: TCM199 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 µg/ml de Epidermal Growth Factor y 50 µg/ml de gentamicina; 2) **TCM-ITS**: el mismo medio TCM descrito anteriormente suplementado con 5 µg/ml ITS (5 µg/ml insulina + 3 µg/ml transferrina y 3 ng/ml selenio); 3) **TCM-ITS-ASC**: el mismo medio TCM-ITS descrito anteriormente suplementado con 10 µg/ml de ácido ascórbico. La maduración se llevó a cabo en pocillos de 500 µl de medio de maduración (40-50 ovocitos/pocillo) durante 24 horas a 38,5°C y con un 5% de CO₂ en aire.

Para la fecundación *in vitro*, los ovocitos fueron transferidos a 250 µl de medio de fecundación (medio Tyrodes suplementado con 25 mM bicarbonato sódico, 22 mM lactato sódico, 1 mM piruvato sódico, 6 mg/ml albúmina sérica bovina y 10 µg/ml heparina sódica). Los espermatozoides se obtuvieron tras la centrifugación de espermatozoides congelados/descongelados a través de un gradiente discontinuo de Percoll. Tras su recuento celular, se colocaron 250 µl de la suspensión espermática junto con los ovocitos (concentración final: 1x10⁶ espermatozoides/ml) y se co-cultivaron a 38,5°C y con un 5% de CO₂ en aire.

A las 22 horas post-inseminación (hpi), los presuntos cigotos fueron desnudados por pipeteo y transferidos a microgotas de medio SOF suplementado con 5% de SFB. Se evaluó el porcentaje de división celular a las 48hpi y el desarrollo hasta blastocisto a los 8 días post-inseminación.

Inmunocitoquímica. Transcurridas 24 horas de la maduración *in vitro* se procedió al estudio de la distribución de los GCs y los cromosomas. Para ello, se eliminaron las células del cúmulus de los ovocitos por pipeteo suave. Posteriormente, los ovocitos se trataron con pronasa (2%) para digerir la zona pelúcida y se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 30 minutos. A continuación, los ovocitos se lavaron en PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 (2.5%) y se trataron con una solución de bloqueo (PBS-BSA al 1%). Seguidamente, los ovocitos fueron incubados en una solución 100 µg/ml de *Lens Culinaris Agglutinin unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA)* en PBS durante 30 minutos. Los ovocitos, en grupos de 10, se montaron sobre un portaobjetos tratado con poli-L-lisina, se les agregó 10 µl de DAPI y se cubrieron con un cubreobjetos. A continuación, se evaluó la distribución de los GCs y los cromosomas en un microscopio de epifluorescencia. El criterio utilizado para clasificar la distribución de los GCs y los cromosomas fue el mismo que el descrito por Morató et al. (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras 24 horas de maduración *in vitro*, los ovocitos del grupo TCM (97.8%) presentaron un porcentaje significativamente mayor de ovocitos que alcanzaban el estadio de metafase de la segunda división meiótica en comparación a los grupos TCM-ITS (78.9%) y TCM-ITS-ASC (85.4%). A nivel de la configuración cromosómica normal y anormal, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (Tabla 1).

Tabla 1. Configuración cromosómica de los ovocitos de ternera madurados en presencia de ITS y/o ácido ascórbico.

	Total n	MII n (%)	Normal n (%)	Desordenados n (%)	Descondensados n (%)
TCM (control)	47	46 (97.8)a	27(57.5)	20(42.5)	
TCM-ITS	52	41(78.9)b	27(52.0)	24(46.0)	1(2.0)
TCM-ITS-ASC	41	35(85.4)b	23(56.0)	16(39.0)	2(5.0)

^{a, b}: Valores con diferentes letras en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

A nivel de distribución de los GCs, no se observaron diferencias significativas en el patrón de distribución de los GCs entre los tres grupos experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los gránulos corticales de los ovocitos de ternera madurados en presencia de ITS y/o ácido ascórbico.

	Total n	MII n (%)	Agregados n (%)	Cortical n (%)	Periférico n (%)
TCM (control)	47	46 (97.8)a	1(2.2)	10(21.2)	36(76.6)
TCM-ITS	52	41(78.9)b		18(36.1)	34(65.4)
TCM-ITS-ASC	41	35(85.4)b	1(2.4)	12(29.3)	28(68.3)

^{a, b}: Valores con diferentes letras en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

A las 48 hpi, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de división embrionaria entre los tres grupos experimentales mientras que, a nivel de desarrollo embrionario, el grupo TCM (25%) presentó porcentajes de blastocistos significativamente superiores al resto de los grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Desarrollo embrionario de los ovocitos de ternera madurados en presencia de ITS y/o ácido ascórbico

	n	División Embrionaria	Blastocistos
		n (%) 48 hpi	n (%) Día 8 pi
TCM (control)	120	81 (67.0%)	31(25.0%) ^a
TCM-ITS	112	64(57.0%)	14(12.5%) ^b
TCM-ITS-ASC	120	83(69.0%)	16(13.3%) ^b

^{a,b}: Valores con diferentes letras en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Los resultados anteriormente descritos indican que la adición de insulina-transferrina-selenio y/o ácido ascórbico al medio durante el periodo de maduración *in vitro* no proporciona un medio adecuado para que los ovocitos procedentes de bovinos prepúberes desarrollen una competencia ovocitaria adecuada, ya que se traduce en un descenso significativo del porcentaje de blastocistos tras su fecundación *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fouladi-Nashta, AA., Campbell, KH. 2006. *Reproduction* 131(3):449-460.
- Khatir, H., Lonergan, P., Mermillod, P. 1998. *Theriogenology* 50(6):917-929.
- Morató, R., Izquierdo, D., Albarracín, JL., Anguita, B., Palomo, MJ., Jimenez-Macedo, AR., Paramio, MT., Mogas, T. 2008. *Mol. Reprod. Dev.* 75 (1):191-201
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, MP., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2002. *Biol. Reprod.* 66(3):589-595.
- Tatemoto, H., Ootaki, K., Shigeta, K., Muto, N. 2001. *Biol. Reprod.* 65(6):1800-1806.
- Wu, D., Cheung, QC., Wen, L., Li, J. 2006. *Biol. Reprod.* 75(4):547-554.

EFFECT OF THE ADDITION OF INSULIN-TRANSFERRIN-SELENIUM AND ASCORBIC ACID IN THE IN VITRO MATURATION MEDIUM OF PREPUBERTAL BOVINE OOCYTES

ABSTRACT: The purpose of this study was to evaluate the effects of the addition of insulin-transferrin-selenium (ITS) and ascorbic acid to the *in vitro* maturation medium on the chromosome configuration, cortical granules (CG) distribution and further embryo development of prepubertal bovine oocytes. Immature calf oocytes were randomly assigned to three experimental groups: (1) *TCM*: TCM 199 with 10% fetal bovine serum (FBS) and 10µg/ml Epidermal Growth Factor (EGF); (2) *TCM+ITS*: TCM199 with 10% FBS, 10µg/ml EGF and 5µg/ml ITS; (3) *TCM+ITS+ASC*: TCM199 with 10% FBS, 10µg/ml EGF and 5µg/ml ITS and 10 µg/ml ascorbic acid. After *in vitro* maturation, samples of calf oocytes from each experimental group were fixed and evaluated after *in vitro* maturation using specific fluorescent probes. the remaining oocytes were fertilized and cultured *in vitro*. Cleavage and blastocyst rates were determined on days 2 and 8 after fertilization, respectively. CG and chromosome distribution did not differ between experimental groups as well as cleavage rate at 48 hpi. However, supplementation with ITS and acid ascorbic or just ITS yielded significantly lower blastocyst rates than TCM group. These results indicate that the supplementation of the IVM medium with ITS with or without ascorbic acid does not improve the subsequent embryo development of prepubertal bovine oocytes.

Keywords: calf, ITS, ascorbic acid, cortical granules