

EFFECTO DEL MEDIO DE CRECIMIENTO PREVIO A LA MADURACIÓN *IN VITRO* SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES EN CABRAS PREPÚBERES

Hammami, S., Romaguera, R., Roura, M., Catalá, M.G., Paramio, M.T. y Izquierdo, D.
Dpto. Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona). España. E-mail: Dolors.Izquierdo@uab.es

INTRODUCCIÓN

La utilización de ovocitos inmaduros procedentes de ovarios de cabras prepúberes sacrificadas en el matadero presenta la ventaja de poder disponer de una fuente prácticamente ilimitada y a muy bajo coste de gametos femeninos. Sin embargo proporciona una población de ovocitos muy heterogénea en el grado de crecimiento (Martino et al., 1994), lo que justifica el bajo rendimiento de la técnica de producción *in vitro* de embriones (PIVE) (Jiménez-Macedo et al., 2007; Anguita et al., 2007) debido a su pequeño diámetro ovocitario (110–125 µm). Durante los últimos años, distintos grupos de investigación se han centrado en el perfeccionamiento de cada una de las técnicas implicadas en la PIVE a partir de hembras prepúberes, principalmente en los protocolos de maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV), con el fin de tratar de reproducir *in vitro* los mecanismos fisiológicos que rigen la función reproductiva, ya que, *in vivo*, durante la edad juvenil el ovocito está expuesto a concentraciones bajas de gonadotropinas, esteroides necesarios para el crecimiento folicular (Peluso, 1988), factores de crecimiento y otras moléculas desconocidas que pueden interactuar entre sí regulando los cambios maduracionales que afectan al ovocito (Ding y Foxcroft, 1992). Así, Wu et al. (2006) demostraron que cultivando los ovocitos de cerdas prepúberes durante las primeras 24 horas de MIV en un medio de crecimiento que contenía concentraciones hormonales bajas, ácido ascórbico e insulina, transferrina y selenio (ITS) (efecto antioxidante para las células de la granulosa; Tatemoto et al., 2001) se mejoraba la competencia de los ovocitos pequeños para el desarrollo embrionario *in vitro*.

Como en nuestro laboratorio se utilizan ovocitos de cabras prepúberes, parece necesario un procedimiento que apoye el crecimiento *in vitro* de los ovocitos de menor diámetro, por ello el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de diferentes protocolos de MIV basados en el medio de crecimiento descrito por Wu et al. (2006) sobre la fecundación y el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cabras prepúberes (aproximadamente de 2 meses de edad) fueron recogidos en un matadero comercial y transportados al laboratorio en PBS (P-4417, Sigma, St. Louis, MO, EEUU) a 38 °C en un contenedor isotérmico. Una vez en el laboratorio, se seleccionaron los ovarios con mejor desarrollo folicular y se desecharon los que presentaban formaciones quísticas o una morfología anormal. Los complejos –ovocito-cúmulus (COCs) se obtuvieron mediante el método de *slicing* de los folículos que se realizó con una hoja de bisturí en una placa de petri que contenía medio TCM-199 (M-2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO₃ (S-3817) y 5 µL/mL de gentamicina (G1272). Se seleccionaron los COCs con más de una capa compacta de células del cúmulus y citoplasma homogéneo y se les midió el diámetro, clasificándolos en dos grupos: <125µm y ≥125µm. Los COCs se repartieron en 5 grupos experimentales según el diámetro y el medio de MIV utilizado. La maduración se llevó a cabo en grupos de 25 COCs por microgota de 100µL de medio cubiertas con aceite mineral (Sigma, M-3516) durante un total de 24 h a 38,5°C y con un 5% de CO₂ en aire.

Los medios de cultivo de ovocitos durante la maduración *in vitro* fueron los siguientes:

1) MT (Medio Tradicional): TCM199 (Sigma-M4530) suplementado con 275 µg/mL de piruvato sódico (Sigma, P-3662), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma, G1272), 146 µg/mL de L-glutamina (Sigma, G-5763), 10% de DBS (suero de donante bovino), 10 µg/mL FSH, 10 µg/mL LH, 1 µg/mL 17β-estradiol y 100 µM cisteamina (Sigma, M9768); **2) MC** (Medio de Crecimiento): medio TCM 199 suplementado con 100 µM cisteamina, 100 µg/ml ácido ascórbico y 5 µl/mL ITS, 0,04 µg/mL FSH, 0,04 µg/mL LH, 0,004 µg/mL 17β-estradiol. **3) MTM** (Medio Tradicional Modificado): TCM199 suplementado con 275 µg/mL de piruvato

sódico, 50 µg/mL de gentamicina, 146 µg/mL de L-glutamina, 10% de DBS, 0,04 µg/mL FSH, 0,04 µg/mL LH, 0,004 µg/mL 17β-estradiol **4) MCM** (Medio de Crecimiento Modificado): medio TCM 199 suplementado con 100 µM cisteamina, 100 µg/ml ácido ascórbico y 5 µl/mL ITS, 10 µg/mL FSH, 10 µg/mL LH, 1 µg/mL 17β-estradiol. En la Tabla 1 se muestra el diseño experimental seguido para la MIV en cada grupo de ovocitos.

Transcurrido el tiempo de maduración, los ovocitos se lavaron tres veces en medio TALP y se transfirieron a microgotas de 100µL del mismo medio al cual se añadió semen fresco capacitado con heparina (concentración final: 4×10^6 espermatozoides/mL) y se co-cultivaron durante 24h a 38,5°C y con un 5% de CO₂ en aire.

Tras 24 h de co-incubación de los gametos, los presuntos cigotos (10 presuntos cigotos/microgota de 20 µL) se pusieron a cultivar durante 8 días en medio (SOF: synthetic oviductal fluid) (Takahashi y First, 1992) a 38,5 °C y en una atmósfera con un 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ y saturada de humedad. Al final del proceso, se valoró el desarrollo embrionario mediante observación en microscopio estereoscópico y los embriones fueron teñidos con Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570) para comprobar el número de células que presentaban mediante un microscopio de fluorescencia.

Los datos sobre la tasa de división y el desarrollo embrionario hasta blastocisto de cada uno de los grupos experimentales fueron comparados mediante ANOVA usando el procedimiento de modelos lineales (GLM), del paquete estadístico SAS. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se resumen los resultados de división embrionaria, desarrollo hasta el estadio de blastocisto y número medio de células de los blastocistos obtenidos. Los resultados de división solo se vieron influenciados por el diámetro ovocitario, siendo significativamente mayor en los de mayor diámetro (≥ 125 µm) ($P < 0,05$). Respecto a los ovocitos de pequeño diámetro, se apreció una eficacia muy similar de la FIV entre los 4 grupos experimentales, aunque se observó una ligera superioridad de los ovocitos madurados en Medio Tradicional Modificado las 12 primeras horas. Este tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos con los ovocitos de mayor diámetro. La tasa de desarrollo hasta blastocisto registrada a los 8 días de la FIV con respecto al número total de ovocitos puestos a MIV solo ha diferido significativamente en relación al diámetro ovocitario (Tabla 1, $P < 0,05$), lo que concuerda con investigaciones previas realizadas tanto en cabras prepúberes (Anguita et al., 2007) como adultas (Crozet et al., 1995) y no se obtuvo ninguna mejora con respecto a los diferentes protocolos utilizados para los ovocitos pequeños. En cuando a la comparación de la calidad de los blastocistos obtenidos, evaluada según el número de células de los blastocistos, los blastocistos procedentes de ovocitos ≥ 125 µm presentaron un número medio de células muy superior ($P < 0,05$) a los blastocistos procedentes de ovocitos pequeños.

Así, los resultados obtenidos indican que en los ovocitos < 125 µm, tanto el uso de medio de crecimiento como las modificaciones basadas en el nivel hormonal y la suplementación con ITS y ácido ascórbico en el medio MIV, no mejora ni el porcentaje de blastocistos obtenidos ni la calidad de los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Córdova et al. (2009) con ovocitos procedentes de bovinos prepúberes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anguita, B., Jimenez-Macedo, A.R., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, M.T. 2007. *Theriogenology* 67: 526–536.
- Córdova, B.L., Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, M.T., Mogas T. 2009. *ITEA Tomo II*: 699-70.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M. & Dubos, MP. 1995. *J Reprod Fertil* 103: 293-298.
- Ding, J., Foxcroft, G. R. 1992. *Biol Reprod* 47: 648-655.
- Jimenez-Macedo, A.R., Paramio, M.T., Anguita, B., Morato, R., Romaguera, R., Mogas, T., Izquierdo, D. 2007. *Theriogenology* 67: 1399–1408.
- Martino, A., Palomo, M.J., Mogas, T., Paramio, M.T. 1994. *Theriogenology* 42: 859–873.
- Peluso, J.J. 1988. *J. Reprod Fert* 84: 239-245.
- Takahashi, Y., First, N. 1992. *Theriogenology* 37: 963-78.
- Tatemoto, H., Ootaki, K., Shigeta, K., Muto, N. 2001. *Biol Reprod* 65: 1800-1806.
- Wu, D., Cheung, Q.C., Wen, L., Li, J. 2006. *Biol Reprod* 75: 547-554.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2007-60227-CO2-01 y la beca doctoral del programa MAEC-AECID concedida para Sondes Hammami.

Tabla 1. Diseño experimental seguido para la MIV en cada grupo de ovocitos

Grupo C; $\geq 125 \mu\text{m}$		MT 24h	
Grupo 1; $<125 \mu\text{m}$		MT 24h	
Grupo 2; $<125 \mu\text{m}$	MC 12h		MT 12h
Grupo 3; $<125 \mu\text{m}$	MTM 12h		MT 12h
Grupo 4; $<125 \mu\text{m}$	MC 12h		MCM 12h

Tabla 2. Resultados de desarrollo embrionario y calidad de los blastocistos a partir de ovocitos de cabras prepúbers

Grupo	\emptyset ovocito (μm)	N (COCs)	Div/N (%)	Blast/Div (%)	Blast/N (%)	Nº células/Blast
Grupo C	≥ 125	294	53,80 ^a	40,35	21,46 ^a	360,20 ^a
Grupo 1	<125	259	41,96 ^b	33,90	14,40 ^b	229,29 ^b
Grupo 2	<125	254	40,45 ^b	27,61	11,03 ^b	222,43 ^b
Grupo 3	<125	250	43,58 ^{ab}	33,34	14,55 ^b	208,60 ^b
Grupo 4	<125	182	37,13 ^b	28,04	10,04 ^b	211,00 ^b

N(COCs): nº de complejos ovocito-cumulus puestos a MIV; Div/N (%): porcentaje de división a las 48hpi; Blast/Div (%): porcentaje de Blastocistos a los 8 días de CIV, respecto de los divididos; Blast/N (%): porcentaje de Blastocistos a los 8 días de CIV, respecto a los COCs puestos a MIV, ^{a,b}:P<0,05

EFFECT OF GROWTH MEDIUM BEFORE *IN VITRO* MATURATION OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES ON BLASTOCYST RATE

ABSTRACT: Developmental competence of prepubertal goat oocyte is low probably due to the large number of small oocytes present in ovary. To overcome this problem, Wu et al. (2006) used growth medium (GM) during first 24h of *in vitro* maturation (IVM) and they improved embryo development of porcine small oocytes. The aim of this study was to test the GM in small prepubertal goat oocytes in order to increase blastocyst yield. Cumulus-oocyte Complexes (COCs) were recovered from prepubertal goat ovaries, selected and classified into two categories based on oocyte diameter: $<125 \mu\text{m}$ and $\geq 125 \mu\text{m}$. Big oocytes were matured in conventional IVM medium (**CM**) and the small oocytes in: **CM**; Growth medium (**GM**); modified conventional IVM medium (**MCM**) and modified growth medium (**MGM**). Oocytes were fertilized for 24h with a sperm concentration of 4×10^6 spz/ml. Presumptive zygotes were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) for 8 days.

Cleavage rate, blastocyst rate and blastocyst mean cell number were influenced by oocyte diameter, presenting the largest oocytes ($\geq 125 \mu\text{m}$) the highest results. However, the culture the culture of small prepubertal goat oocytes in GM, MCM and MGM failed to improve blastocyst rate.

Keywords: prepubertal goat, oocyte, growth medium.