

## DISEÑO DE UN ENSAYO DE PENETRACIÓN HOMÓLOGA EN OVINO USANDO OVOCITOS INMADUROS Y MADURADOS *IN VITRO*

Munuera C.D., Morató R., Osuagwuh U. y Palomo M.J

Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

mariajesus.palomo@uab.cat

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la conservación de recursos genéticos ganaderos está siendo muy significativa (FAO, 2010), desarrollándose bancos de semen de numerosas especies y razas, algunas en peligro de extinción. Por este motivo, la predicción de la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados es de gran interés para la viabilidad de los programas de conservación y mejora de las distintas razas. Muchos de los avances tecnológicos han permitido realizar un análisis más fiable, reproducible y objetivo de las diferentes características de los espermatozoides (Graham, 2001). Ahora, para disponer de un análisis completo del semen descongelado es necesario probar su fertilidad realizando estudios *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, ambos sistemas presentan grandes inconvenientes. Por un lado, la inseminación artificial intrauterina profunda en la oveja supone un alto coste económico y gran especialización, mientras que el principal problema en la fecundación *in vitro* en ovino reside en el uso de suero de oveja en estro (SOE) para la maduración ovocitaria, lo que supone una fuente de variación y un alto riesgo de contaminación (Van der Valk et al., 2010; Hajarjan et al., 2017). Actualmente, no se encuentran estudios en oveja, pero en otras especies como el cerdo, el ensayo de penetración homóloga *in vitro* con ovocitos inmaduros se usa ampliamente y tiene una correlación demostrada con la fertilidad del semen (Martínez et al., 1993). Por lo tanto, nuestro objetivo es diseñar un ensayo de penetración homóloga *in vitro* en ovino con ovocitos inmaduros o madurados *in vitro* mediante medios comerciales libres de suero para conseguir un análisis de la viabilidad del semen descongelado lo más simple, fiable, seguro y reproducible posible.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para ello, se recogieron ovarios de corderas en un matadero comercial cercano, los cuales fueron transportados en PBS suplementado con antibióticos y antimicóticos entre 35.5-38.5°C hasta el laboratorio en la UAB. Seguidamente, se obtuvieron los complejos cúmulus-ovocito (CCOs) mediante la técnica de *slicing* y una vez seleccionados fueron sometidos a 3 tratamientos distintos: **Grupo 1:** los CCOs fueron incubados directamente en grupos de 15 a 20 con espermatozoides ovinos descongelados seleccionados por gradiente de densidad con *Bovipure*® (Nidacon, Suecia) en microgotas de 100 µL de medio de fecundación *BO-IVF*® (IVF Bioscience, UK) suplementado al 2% con SOE a una concentración final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides /mL, cubiertas con aceite mineral a 38.5°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. A las 17 horas del co-cultivo de los gametos, los CCOs se fijaron para su posterior análisis. **Grupo 2:** los CCOs se incubaron también en grupos de 15-20 en gotas de 100 µL de medio de maduración *BO-IVM*® (IVF Bioscience, UK) durante 24 horas. A continuación, una muestra de los ovocitos se fijó para evaluar su progresión nuclear. Seguidamente, el resto de los CCOs se inseminaron bajo las mismas condiciones que los del grupo 1. **Grupo 3:** los CCOs seleccionados se incubaron en las mismas condiciones que los del grupo 2, a excepción del medio de cultivo, el cual (*BO-IVM*®) fue suplementado con un 10% de SOE. Transcurridas 24h, la toma de muestras para evaluar la progresión nuclear, así como la inseminación de los CCOs se realizó siguiendo la misma metodología que la descrita en los grupos anteriores. Los CCOs de las muestras recogidas tras MIV y FIV en los diferentes tratamientos fueron decumulados mecánicamente y fijados en paraformaldehído al 4% (v/v) durante 1 hora. Posteriormente fueron teñidos con Hoechst 3342 durante 15 min. en la oscuridad a 4°C y colocados en portaobjetos para su observación bajo microscopio de epifluorescencia (ZEISS Axioskop 40, Alemania). La maduración nuclear de los ovocitos

fue evaluada como tal cuando los cromosomas se disponían en la placa metafásica y el primer corpúsculo polar estaba extrusionado. Por otro lado, los parámetros evaluados tras la FIV fueron: tasa de penetración (número de ovocitos penetrados por al menos un espermatozoide del total de ovocitos inseminados), tasa de monospermia (número de ovocitos penetrados por un único espermatozoide del total de ovocitos inseminados) y el número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (ZP) por ovocito penetrado. Los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE) y se analizaron mediante un análisis de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras el análisis de la MIV mostraron que únicamente el 5% de los ovocitos incubados (grupo 2; n=43) durante 24h en el medio comercial *BO-IVM*® maduraron nuclearmente, por lo que este sistema no parece cumplir satisfactoriamente las expectativas indicadas por el fabricante como para ser utilizado en esta especie. Este medio comercial está formulado libre de suero y con concentraciones de hormonas gonadotrópicas que desconocemos, por lo que se añadió SOE (10%) al sistema para mejorar los resultados, obteniendo alrededor de una tasa de maduración del 54% (grupo 3; n=60). No obstante, la eficacia de nuestro sistema siguió siendo insuficiente comparada con otros descritos por Cognié et al. (2003) o Palmerini et al. (2014), quienes obtuvieron un 75% y 95,1%, respectivamente, de tasa de maduración de ovocitos también procedentes de animales prepúberes. Esta baja incidencia de maduración en nuestro estudio podría ser debida al suero utilizado, ya que como hemos citado anteriormente el SOE es una fuente de variación muy importante en los resultados (Van der Valk et al., 2010), de ahí que nuestro objetivo sea intentar diseñar un sistema de maduración libre de suero.

Por otro lado, los parámetros de fertilidad evaluados no mostraron ningún efecto significativo del tratamiento de los ovocitos utilizado en el porcentaje de penetración, a pesar de observarse un incremento al suplementar el medio de maduración con SOE (Tabla 1). No obstante, si se encontraron diferencias significativas en la tasa de monospermia en los ovocitos que fueron inseminados inmediatamente después de ser seleccionados sin previa incubación en ningún medio de MIV (grupo 1), lo que puede indicar una falta madurativa de los ovocitos, probablemente de la ZP, ya que en condiciones *in vivo* es la mayor barrera selectiva que el espermatozoide debe atravesar (Waberski et al., 2005). También se observaron diferencias en el número de espermatozoides unidos a la ZP de los ovocitos penetrados, siendo significativamente mayor en aquellos ovocitos que habían sido supuestamente madurados en el medio comercial *BO-IVF*® libre de suero. Se desconoce la causa de esta diferencia, ya que no se han encontrado estudios de FIV con ovocitos inmaduros de oveja. En conclusión, este estudio preliminar para diseñar un ensayo de penetración homóloga a partir de ovocitos inmaduros o supuestamente maduros en medios comerciales libres de suero parece indicar su utilidad potencial para evaluar la viabilidad de los bancos de semen. Sin embargo, se requieren de más estudios para asegurar su uso como una herramienta de análisis fiable, sencilla, rápida y reproducible.

**Tabla 1.** Efecto del sistema de maduración de los ovocitos en un ensayo de penetración homóloga en ovino

Tipo de maduración de los ovocitos	N	Tasa de Penetración	Tasa de Monospermia	% Spz-ZP/oo
Grupo 1	55	67,4 ± 4,3	19,9 ± 3,6 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Grupo 2	107	60,8 ± 25,2	55,5 ± 4,2 <sup>b</sup>	3,5 ± 1,1 <sup>b</sup>
Grupo 3	128	82,6 ± 6,7	48,3 ± 3,3 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>

Grupo 1: Ovocitos inmaduros sin incubación previa a la inseminación; Grupo 2: Ovocitos incubados 24h en medio BO-IVM; Grupo 3: Ovocitos incubados 24h en medio BO-IVM suplementado con SOE; Spz-ZP/oo: número medio de espermatozoides (Spz) unidos a la zona pelúcida (ZP) por ovocito (oo) penetrado.

<sup>a,b</sup>. Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. 2003. *Theriogenology* 59: 171-188.
- FAO. Programas de conservación. Roma, 2010.
- Graham, J.K. 2001. *Anim Reprod* 68: 239-247.
- Hajarian, H., Aghaz, F., Karami, H.S. 2017. *Theriogenology* 92: 144-148.
- Martínez, E., Vázquez, J.M., Matas, C., Roca, J., Coy, P., Gadea, J. 1993. *Theriogenology* 40: 547-557
- Palmerini MG, Nottola SA, Leoni GG, Succu S, Borshi X, Berlinguer F, Naitana S, Bekmukhambetov Y, Macchiarelli G. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12: 115-128.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å.F., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G. 2010. *Toxicology* 24: 1053-1063.
- Waberski, D., Magnus, F., Mendonca, F.F., Petrunkina, A.M., Weitze, K.F., Töpfer-Peterson, E. 2005. *Theriogenology* 63: 470-484.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el INIA (RZP2014-00001-00-00).

### DESIGN OF A HOMOLOGOUS IN VITRO PENETRATION ASSAY IN SHEEP USING IMMATURE AND IN VITRO MATURED OOCYTES

**ABSTRACT:** To design a reliable system to evaluate *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved ram sperm, a homologous penetration test with immature and *in vitro* matured sheep oocytes using commercial serum free media was studied. Oocytes collected from prepubertal ewe were selected. Then, 55 oocytes were co-cultured immediately with thawed sperm, while 107 oocytes were incubated for 24 h in a free serum IVM media and 128 were incubated in the same media plus estrous sheep serum (ESS, 10%). Afterwards, a sample of oocytes were fixed to assess their nuclear status. Then, immature and presumptive matured oocytes were inseminated in an IVF media with 2% ESS at a final concentration of  $2 \times 10^6$  sperm/mL. After 17 h of co-culture, fertility parameters were evaluated. Only 5% of the oocytes incubated in the IVM media ( $n=43$ ) were matured, while the 54% of the oocytes cultured in IVM media with EES ( $n=60$ ) reached nuclear maturation. However, no significant differences were found regarding *in vitro* oocyte penetration, except for monospermy rate and the mean number of sperms attached to the zona pellucida depending on oocyte treatment. In conclusion, more studies are needed to achieve a sperm fertilizing ability assay for ram semen banks.

**Keywords:** homologous; *in vitro* penetration; sheep oocytes; serum free media