

1. PROTOCOLO GENERAL

1.1. OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes, de aproximadamente dos meses de edad, en un matadero comercial y se transportaron hasta el laboratorio en un recipiente isotérmico con PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma, P-4417) + Gentamicina (50 mg/l) a 35-37°C. La duración del proceso, recogida y trayecto, nunca fue superior a 2 horas. Al llegar al laboratorio los ovarios fueron lavados 4 veces en PBS + gentamicina (50 mg/l) a 38,5°C. Todo el proceso de obtención de los ovocitos a partir de los ovarios y la posterior manipulación de los gametos (ovocitos y espermatozoides) y embriones se realizaron en una campana de flujo laminar a una temperatura ambiente de 34-35°C.

El medio utilizado para la recogida y lavado de los ovocitos fue TCM199/HEPES (Sigma, M-2520) suplementado con NaHCO₃ (2,2 mg/ml) y gentamicina (50 µg/ml). El pH del medio fue ajustado a 7,4 y posteriormente se procedió a su esterilización mediante un filtro de membrana de porosidad de 0,22 µm.

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 50 µl de medio de lavado suplementado con 10 µg/ml FSH (Ovagen), 10 µg/ml LH (), 1 µg/ml 17β estradiol y un 20% de suero de cabra en celo (SCC), inactivado mediante calor a 56°C durante 30 minutos, y cubiertas con aceite de parafina (Sigma, M-3516). Las gotas de maduración se prepararon siempre antes de la llegada de los ovarios al laboratorio con la finalidad de equilibrar el medio con la atmósfera del incubador (5% de CO₂ en aire y saturada de humedad) antes del cultivo de los ovocitos.

Los complejos cumulus-ovocito (CCOs) fueron obtenidos a partir de los ovarios mediante la técnica del *slicing*, la cual consiste en realizar repetidos cortes longitudinales y transversales con un bisturí en la superficie de un ovario colocado sobre una placa de petri, liberando así los CCOs al medio. Se seleccionaron ovocitos rodeados por más de una capa completa de

células del cumulus y con el citoplasma homogéneo, los cuales, antes de ser puestos en las gotas de maduración, fueron lavados tres veces en el medio de lavado. Los CCOs se cultivaron en grupos de 9-11 ovocitos/gota durante 27 horas a 38,5°C en una atmósfera del 5% CO₂ en aire y saturada de humedad.

1.2. FECUNDACIÓN IN VITRO

1.2.1. Obtención y preparación de los espermatozoides

Se utilizaron eyaculados frescos procedentes de 2 ó 3 machos cabríos adultos de raza Murciano-Granadina de probada fertilidad, obtenidos mediante la ayuda de una vagina artificial y transportados hasta el laboratorio en un recipiente isotérmico a 38,5°C en menos de 15 minutos. Al llegar al laboratorio, se valoró la motilidad masal de los eyaculados, descartando aquellos que presentaban valores bajos. A continuación, se procedió a la mezcla del resto de eyaculados a partes iguales con el objetivo de minimizar la variación entre machos. La preparación y capacitación de los espermatozoides se realizó en medio mDM (Tabla 1), medio descrito por Brackett y Oliphant (1975) y modificado por Younis y col. (1991), siguiendo el método descrito por Younis y col. (1989). Concretamente, en primer lugar, se realizó el lavado y selección de los espermatozoides más móviles mediante la técnica del *swim-up* (Parrish y col., 1986). Para ello, se colocaron 2 ml de medio de capacitación en seis tubos cónicos y se depositaron 70 µl de la mezcla de eyaculados en el fondo de cada tubo. Tras una hora en el incubador a 38,5°C, se recogieron aproximadamente 0,7 ml del sobrenadante de cada tubo y, tras mezclarlos y coger una muestra para calcular la concentración espermática mediante una cámara Thoma de recuento celular, se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el sedimento resultante se mezcló con un volumen igual de medio de capacitación suplementado con 100 µg/ml de heparina (Sigma, H-3393), obteniendo una concentración final aproximada de espermatozoides de 80×10^6 células/ml. La suspensión de espermatozoides fue incubada durante 45 minutos a 38,5°C, periodo tras el cual se procedió a la inseminación de los ovocitos.

1.2.2. Fecundación in vitro (FIV)

Aproximadamente dos horas antes del inicio del cocultivo de los gametos, se procedió a la preparación de microgotas de 100 μ l de medio de fecundación TALP (Solución Tyrode modificada, descrita por Parrish y col., 1986; ver Tabla 2) suplementado con 1 μ g/ml de hipotaurina (Sigma, H-1384), las cuales fueron cubiertas con aceite de parafina y colocadas en el incubador hasta el momento de su uso para que el medio se equilibrara. Tras 27 horas de maduración, los CCOs fueron lavados en medio de fecundación y depositados cuidadosamente en las gotas de FIV en grupos de 18-22 ovocitos/gota.

Una vez finalizada la incubación de los espermatozoides con la heparina, una alícuota de aproximadamente 5 μ l de dicha suspensión fue introducida en cada una de las gotas de fecundación, siendo la concentración final en la gota de FIV de 3,5-4 10^6 espermatozoides/ml. Los gametos permanecieron en co-cultivo durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Tabla 1: Composición del medio mDM (Brackett y Oliphant, 1975; modificado por Younis y col., 1991)

	gr/l	mM
NaCl	6,550	112,00
KCl	0,300	4,02
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,330	2,25
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,106	0,52
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,113	0,83
Rojo fenol	0,002	
Gentamicina	0,050	
NaHCO ₃	3,104	37,00
Glucosa	2,500	13,90
Piruvato sódico	0,1375	1,56
BSA (Sigma, A-6003)	6,000	
OSMOLARIDAD	305 mOsm/Kg	
pH	7,4	

Tabla 2: Composición de los medios TALP (Solución Tyrode modificada descrita por Parrish y col., 1986) y HEPES/TALP:

<u>Solución madre</u>	gr/l	mM
NaCl	6,660	114,00
KCl	0,238	3,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,294	2,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,051	0,25
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,027	0,20
Penicilina G	0,030	
Rojo Fenol	0,010	

	HEPES/TALP-semen		TALP-fert	
	mg/ml	mM	mg/ml	mM
NaHCO ₃	0,160	22,00	2,100	25,00
Glucosa	0,900	5,00	0,900	5,00
Piruvato sódico	0,112	1,00	0,020	0,20
HEPES	2,380	10,00	-	
BSA(Sigma, A-6003)	6,000		6,000	
Lactato sódico	3,68 ml/ml	4,34	1,7 ml/ml	3,50
OSMOLARIDAD		280-300 mOsm/Kg		
pH		7,4		

1.3. CULTIVO IN VITRO

1.3.1. Medio de cultivo de los embriones

El medio de cultivo utilizado para la preparación de los distintos cultivos de células somáticas y el posterior cultivo in vitro de los embriones fue el medio *TCM199bicarbonate* (Sigma, M-2154) suplementado con 0,55 mg/ml piruvato sódico, 0,146 mg/ml L-glutamina (Sigma, G-5763), 3,5 mg/ml BSA (Sigma, A-4919) y 0,05 mg/ml gentamicina.

1.3.2. Preparación de las monocapas de células del cumulus/granulosa

Simultáneamente a la obtención de ovocitos inmaduros a partir de ovarios procedentes del matadero, se procedió al aislamiento de células del cumulus y de la granulosa a partir de las placas de petri utilizadas para los lavados de los ovocitos. A continuación, dichas células fueron lavadas 3 veces en medio TCM199/HEPES (Sigma, M-2025) y 2 veces en el medio de cultivo descrito anteriormente. Posteriormente, se pusieron a cultivar grupos de células del cumulus y de la granulosa en microgotas de 100µl de medio de cultivo suplementado con un 10% de SCC. Tras 48 horas de incubación a 38,5°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire, las células formaron una monocapa en la base de la gota y se procedió a la colocación, en estas gotas, de los ovocitos inseminados para ser cultivados durante 7 días en ellas. Cada dos días se cambiaron 50 µl del medio de las gotas de cocultivo por 50 µl de medio de cultivo nuevo.

1.3.3. Preparación del cultivo de células epiteliales oviductales (CEOs)

Se obtuvieron oviductos de cabras prepúberes, terneras y/o vacas a partir de animales sacrificados en el matadero y oviductos de cabras adultas mediante una intervención quirúrgica en las instalaciones de la facultad de veterinaria de la UAB. En ambos casos, los oviductos fueron transportados hasta el laboratorio en un recipiente isotérmico con PBS (Sigma, P-4417) + gentamicina (50 mg/l) a 4°C de temperatura, donde se procedió a la separación de los oviductos del tejido conectivo que los envolvía. Posteriormente, los oviductos fueron lavados 3 veces en PBS a 38,5°C y una vez en medio TCM199/HEPES. La mucosa oviductal fue obtenida con la ayuda de un par de pinzas de disección, con las que se presionaron las paredes del oviducto desde el infundíbulo hasta la unión utero-tubárica, por donde se produjo la salida de la mucosa. Las masas de células epiteliales fueron depositadas en una placa de petri que contenía medio TCM199/HEPES y aspiradas y expulsadas varias veces a través de una aguja de 25G unida a una jeringuilla de 2 ml con el objetivo de disgregarlas en grupos de células más pequeños. A continuación, los fragmentos de epitelio oviductal fueron ubicados en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml para lavarlas 3 veces por gravedad con el medio de cultivo TCM199,

transcurriendo 5 minutos entre la adición de medio nuevo y su retirada. Tras el último lavado, se resuspendieron 50 μ l del sedimento en 3 ml de medio de cultivo al que se le había añadido un 10% SCC. Aproximadamente a las 24 horas, se valoró el cultivo con una lupa binocular (x64) y se seleccionaron los grupos de células oviductales que poseían movimiento, los cuales fueron lavados 3 veces con el mismo tipo de medio que se utilizaría posteriormente para el cultivo de los embriones, para eliminar el suero del cultivo, y fueron puestos a cultivar en microgotas de 100 μ l de medio de cultivo, donde se obtuvo un cultivo oviductal mixto de agregados de CEOs que nadaban libremente por el medio y CEOs en monocapa. El cultivo de las CEOs en microgotas se inició 24 horas antes de transferir los embriones a dicho cultivo y cada 48 horas se renovaron 50 μ l del medio de las gotas de co-cultivo con medio fresco.

1.3.4. Cultivo in vitro de los embriones

A las 24 horas de la inseminación se procedió a la separación de las células del cumulus y los espermatozoides adheridos a la superficie de los cigotos mediante el pipeteo repetido de los CCOs. Una vez libres de células, los cigotos fueron lavados varias veces en medio de cultivo TCM199 y depositados, en grupos de 30-40, en microgotas de 100 μ l de medio de cultivo cubiertas con aceite de parafina. El cultivo de los embriones se realizó a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad y un 5% CO₂ en aire y duró 7 días (8º día postinseminación). A las 24 horas del inicio del cultivo (48 horas postinseminación), se examinaron las gotas y se separaron los embriones de los ovocitos o cigotos no divididos para, así, evitar posibles errores en las valoraciones posteriores. Cada dos días desde el inicio del cultivo, parte del medio de las microgotas fue renovado mediante la extracción de 50 μ l y la reposición de dicho volumen con medio de cultivo nuevo.

2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN IN VITRO

Con el objetivo de valorar el estadio nuclear de los ovocitos tras 27 horas en el medio de maduración, se tomó una muestra de 15 a 20 ovocitos, los cuales fueron agitados en un solución de citrato sódico al 3% para denudarlos mecánicamente y fijados en ácido acético (90%) : etanol (3/1, v/v) a 4°C durante, al menos, 24 horas. El colorante utilizado para la tinción fue Lacmoide (Sigma, L-7512) al 1% en una solución de ácido acético al 45%. La observación de los ovocitos se realizó con un microscopio de contraste de fases (x400) y se consideró que un ovocito estaba MADURO cuando se observaba una placa metafásica en el citoplasma y el 1° corpúsculo polar formado, es decir, cuando el ovocito se hallaba en el estadio de metafase II (Figura 1).

2.2. EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN IN VITRO

La penetración de los ovocitos, tras 17 horas de co-cultivo con los espermatozoides, fue valorada mediante la recogida de una muestra de ovocitos de todas las gotas de fecundación, en total unos 15 ovocitos por experiencia, que fue manipulada y fijada del mismo modo que la muestra recogida al final de la maduración.

Los ovocitos, tras ser teñidos con Lacmoide al 1%, fueron considerados PENETRADOS cuando presentaron al menos una cola de espermatozoide en su citoplasma. Estos, a su vez, fueron clasificados como:

a.- **NORMALMENTE FECUNDADOS (2PN+C)** (Figura 2): cuando en el citoplasma de los cigotos se observaron 2 pronúcleos, uno masculino y otro femenino, y una cola de espermatozoide, o bien, una cabeza de espermatozoide descondensándose acompañada de su cola y de un pronúcleo femenino.

b.- **ANORMALES**: en este grupo, los ovocitos fueron penetrados solamente por un espermatozoide, pero se observaba alguna alteración o retraso marcado en la formación de los pronúcleos, como por ejemplo: cabeza del espermatozoide no descondensada, telofase II,...

c.- POLIPLOIDES (>2PN): cigotos en los que se observó más de dos pronúcleos en su citoplasma. Dentro de este grupo, los cigotos fueron considerados POLIESPÉRMICOS (PS) (Figura 3), cuando en el citoplasma se observaron más de dos pronúcleos y los dos corpúsculos polares, más de dos cabezas de espermatozoide descondensándose o más de dos colas, o POLIGÍNICOS (PG) (Figura 4), cuando en el citoplasma se observaban más de dos pronúcleos y una sola cola y no presentaba el segundo corpúsculo polar.

2.3. EVALUACIÓN DE LA DIVISIÓN EMBRIONARIA

A las 24 horas del inicio del co-cultivo (48 horas postinseminación), se procedió al examen de los ovocitos separando los ovocitos y cigotos de los embriones y clasificando a estos últimos en embriones de 2 y de más de 2 células (Figura 5). El porcentaje de división se calculó dividiendo el número total de embriones obtenidos entre el número total de ovocitos inseminados puestos a cultivar.

2.4. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Tras 7 días de cultivo (día 8 postinseminación), todos los embriones fueron observados con una lupa binocular ($\times 64$), y se procedió a la separación de los blastocistos del resto de embriones, para evitar confusiones entre los blastocistos y las mórulas durante su valoración mediante una tinción fluorescente para ADN (Hoechst 33342, Sigma, B-2261). Dicha tinción se utilizó con el fin de determinar el número de células y evaluar el grado de desarrollo de cada embrión y ver hasta que estadio de desarrollo había conseguido llegar. La técnica de tinción utilizada fue la descrita por Pursel y col. (1985). Brevemente, los embriones fueron colocados en una gota de 10 μ l de Azul Tripan (Merck, 11732) disuelto al 0,01% en una solución de citrato sódico (CitNa) al 2,3% e incubados a temperatura ambiente durante 30-60 segundos. Inmediatamente después, los embriones fueron traspasados a una gota de 10 μ l de solución de trabajo Hoechst 33342 (HO), solución preparada el mismo día de su uso mezclando 0,75 ml de CitNa al 2,3% (w/v), 0,25 ml de etanol y 10 μ l de HO stock (1 mg HO/1 ml

de agua), e incubados durante 5 minutos sobre una platina calentable a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró el exceso de colorante con la ayuda de una pipeta de diámetro menor que los embriones, se colocó una gota de glicerol sobre los embriones y estos se cubrieron con un cubreobjetos. Los embriones fueron examinados inmediatamente después de ser teñidos con un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 380-420 nm (x400) y se clasificaron en 5 categorías:

- a.- Embriones de 2 a 8 células.
- b.- Embriones de 9 a 16 células.
- c.- Embriones de 17 a 34 células.
- d.- Mórulas (Figura 6): embriones con más de 34 células en los que no se observó ninguna cavidad en su interior.
- e.- Blastocistos (Figura 7): embriones con más de 69 células en los que se apreció la formación del blastocele.

3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Todos los resultados han sido expresados como frecuencias (o proporciones) y analizados estadísticamente mediante un test Chi-cuadrado. Se ha considerado que existen diferencias significativas entre las frecuencias cuando el valor de probabilidad fue menor del 5% ($p < 0,05$).

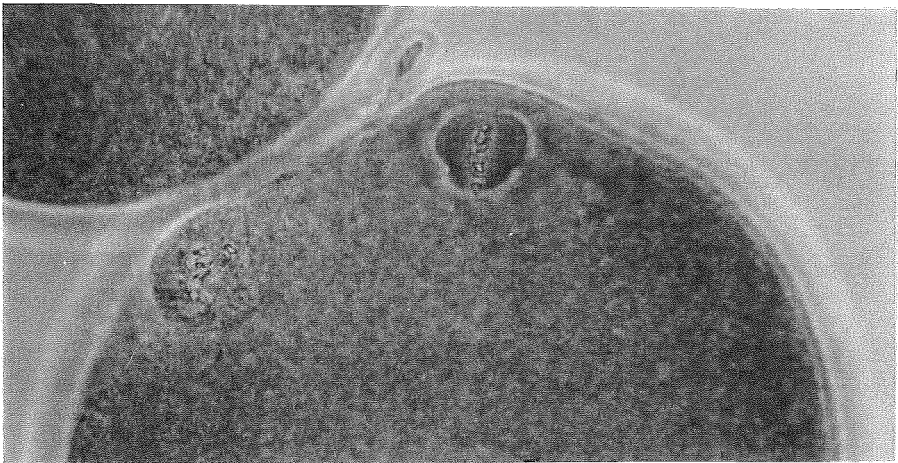


Figura 1: Metafase II

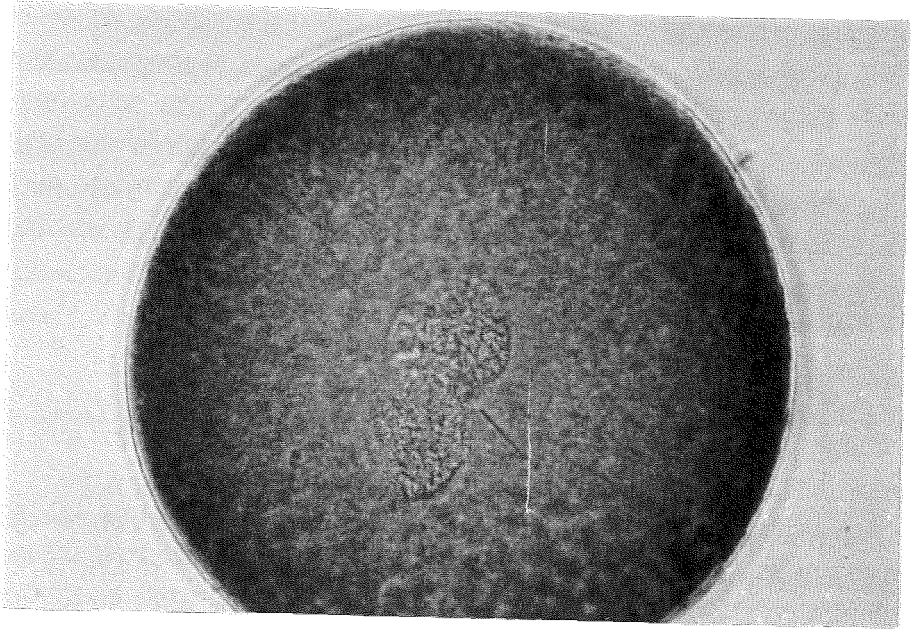


Figura 2: cigoto normalmente fecundado. En él se observan dos pronúcleos totalmente formados y la cola del espermatozoide.

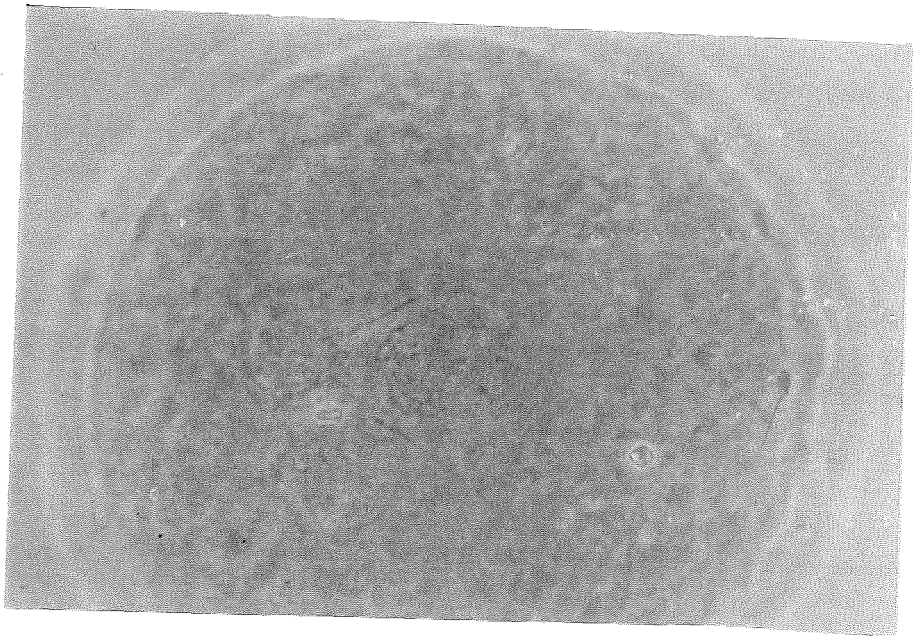


Figura 3: cigoto poliespérmico. Se observan 3 pronúcleos, una cabeza de espermatozoide y dos colas.

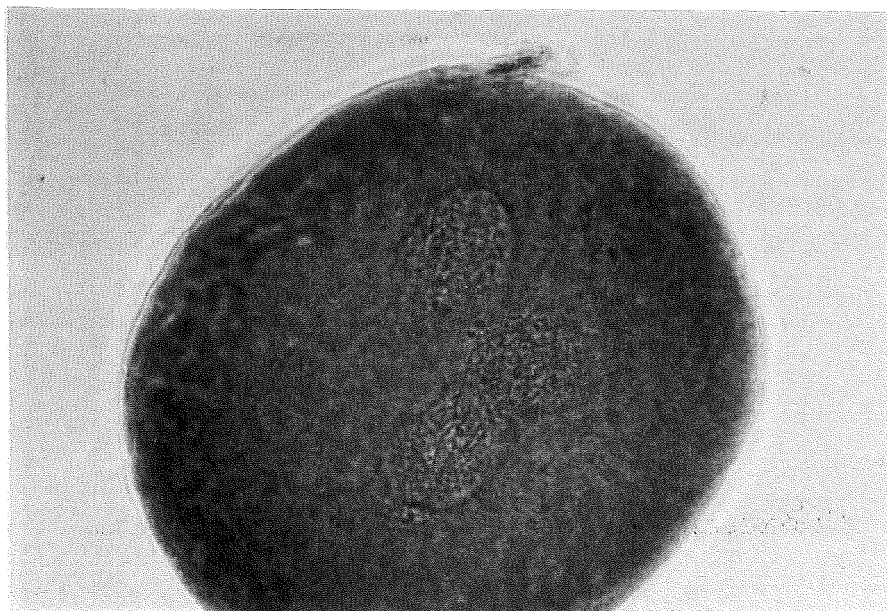


Figura 4: cigoto poligínico. Se observan 3 pronúcleos totalmente formados. La cola del espermatozoides se encuentra en otro plano.

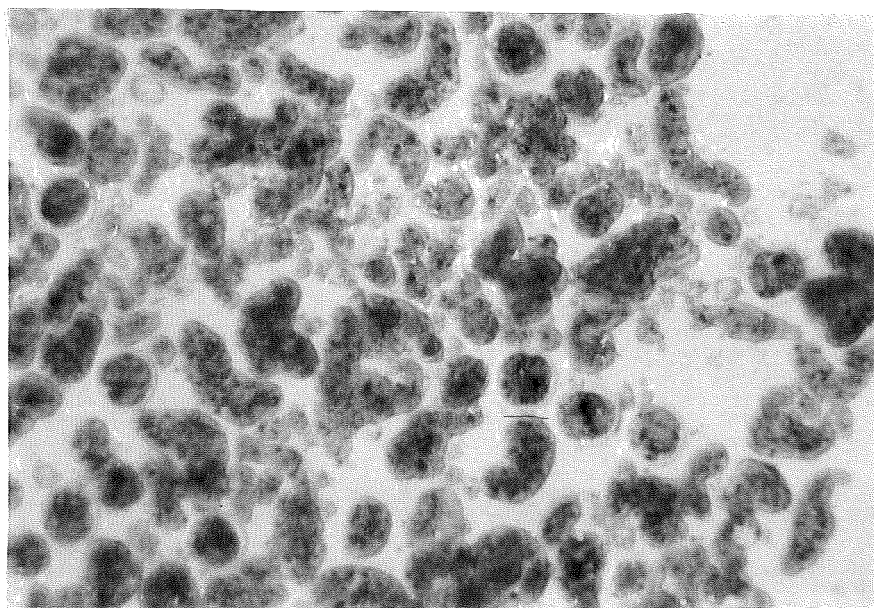


Figura 5: Embriones de cabras prepúberes en los primeros estadios de desarrollo.

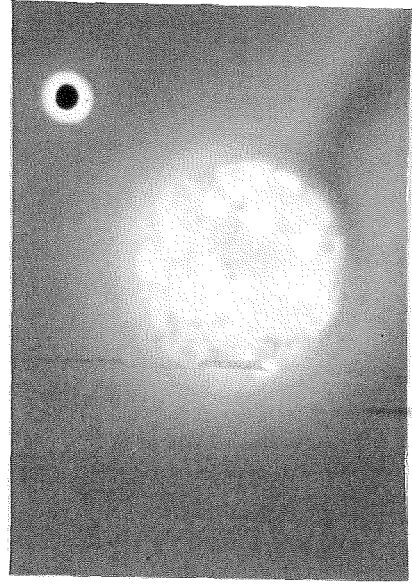
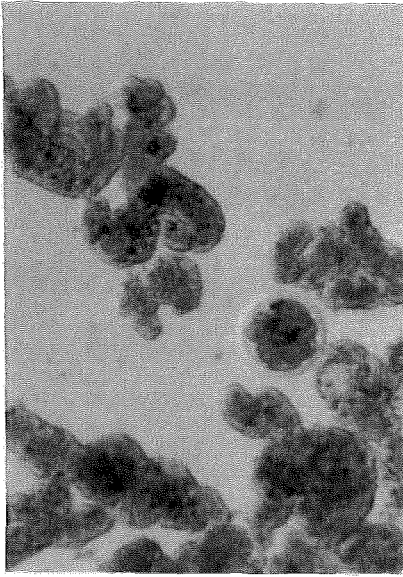


Figura 6: Mórula. (a) lupa binocular y (b) tinción fluorescente Hoechst 33342.

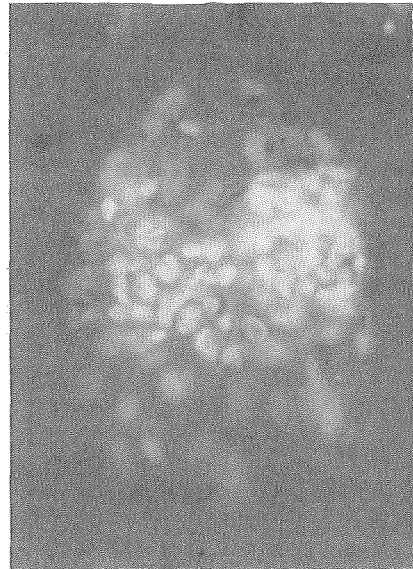
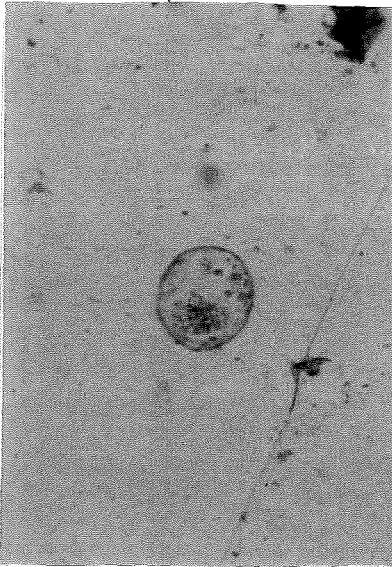


Figura 7: Blastocisto. (a) lupa binocular y (b) tinción fluorescente Hoechst 33342.

CAPÍTULO 4

EFFECTO DEL MEDIO DE CAPACITACIÓN Y FECUNDACIÓN SOBRE LA FIV Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

INTRODUCCIÓN

La fecundación es un proceso complejo que implica la unión de dos gametos, uno masculino y otro femenino, la restitución de la carga cromosómica somática y el inicio del desarrollo de un nuevo individuo. El éxito de la fecundación *in vitro* requiere la preparación adecuada tanto del espermatozoide como del ovocito así como una condiciones de cultivo que sean favorables para la actividad metabólica de ambos gametos. Hasta el momento, diversos autores han descrito el nacimiento de cabritos a partir de ovocitos fecundados *in vitro* (Hanada, 1985; Crozet y col., 1993; Keskinetepe y col., 1994a, 1996; Cognie y col., 1995), indicando la aptitud de los ovocitos de esta especie para ser fecundados en el laboratorio y producir embriones viables.

los medios utilizados para la preparación del semen y la fecundación de los ovocitos han de permitir tanto la capacitación de los espermatozoides y el mantenimiento de su movilidad como la fusión de los espermatozoides con los ovocitos y la primera división de los cigotos formados. En el caprino, los medios de capacitación y fecundación más utilizados son los medios TALP (Cox y col., 1994; Mogas, 1994; Pawshe y col., 1994b; Palomo, 1995), mDM (Younis y col., 1991, 1992; De Smedt y col., 1992; Ling y col., 1992; Crozet y col., 1993; Cognie y col., 1995; Crozet y col., 1995) y TCM199 (Slavik y Fulka, 1992). En todos estos trabajos el medio utilizado para la capacitación fue el mismo que el empleado para la fecundación, sin embargo, en algunos laboratorios se utiliza un medio para cada proceso, ya que las necesidades de ambos gametos no son exactamente las mismas (First y Parrish, 1987). Así, en el caprino, Keskinetepe y col. (1994a, b) han obtenido buenos resultados al utilizar el medio mDM para capacitar y el medio TALP para el co-cultivo de los gametos.

Las necesidades para la capacitación de los espermatozoides de mamífero han sido investigadas de forma extensa y se ha observado que la heparina es el glucosaminoglicano presente en el oviducto que posee una mayor implicación en la capacitación fisiológica de los espermatozoides, por lo que se suele utilizar sistemáticamente en los laboratorios de FIV en rumiantes (First y Parrish, 1988; Yanagimachi, 1994). Además de la

capacitación, la motilidad espermática parece ser un factor importante que influye en la tasa de fecundación. En muchos laboratorios, además de realizar la selección de los espermatozoides más móviles, estos son tratados con sustancias estimulantes de la motilidad espermática, como por ejemplo la cafeína y la PHE (revisado por Gordon, 1994). El uso de cafeína, además de incrementar la motilidad, parece prevenir la interacción negativa entre la heparina y la glucosa presente en el medio (Uguz y col., 1992) y podría actuar sinérgicamente con la heparina para acelerar los procesos de capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides tanto congelados-descongelados (Niwa y Ohgoda, 1988; Niwa y col., 1988; Park y col., 1989) como frescos (Totey y col., 1992). Diversos investigadores (Younis y col., 1992; Keskinetepe y col., 1994a,b) utilizan rutinariamente la incubación de semen fresco de macho cabrío con heparina y cafeína antes de inseminar ovocitos de cabra. Sin embargo, el efecto positivo de la cafeína parece depender del medio utilizado. Concretamente, en el caprino y con eyaculados frescos, la adición de cafeína al medio mDM con heparina parece ser positiva (Younis y col., 1991) mientras que al utilizarla con medio TALP+heparina no mejora los resultados con respecto al uso únicamente de heparina (Younis y col., 1991; Cox y col., 1994).

Actualmente, en muchos laboratorios también se está utilizando un combinado de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE), para suplementar el medio de fecundación, ya que se ha observado que esta mezcla también estimula la motilidad de los espermatozoides y mejora la penetración de los ovocitos (Susko-Parrish y col., 1990; Gordon y Lu, 1990; Vergos, 1990). Cuando los espermatozoides son capacitados con heparina, algunos autores (Miller y col., 1992, 1994) han observado un incremento en las tasas de penetración y división de los ovocitos al añadir al medio de FIV la mezcla PHE, mientras que para otros (Long y col., 1993, 1994) la presencia de esta combinación no varía dichos resultados.

Como consecuencia de esta falta de estandarización en los protocolos de fecundación de los ovocitos caprinos, el objetivo de este trabajo fue determinar un sistema de fecundación propicio para nuestras condiciones de trabajo. Para ello, se comparó el efecto del uso de 3 medios (mDM, TALP y TCM199) para capacitar y fecundar (experiencia 1) o solamente

para capacitar y realizando siempre la fecundación en medio TALP (experiencia 2) y la utilización de agentes químicos estimulantes de la motilidad, como la cafeína y la PHE (experiencia 3), sobre la fecundación de ovocitos procedentes de cabras prepúberes, la división de estos a las 48 horas postinseminación y su desarrollo embrionario después de siete días de cultivo in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y maduración in vitro de ovocitos foliculares de cabras prepúberes

La obtención de los ovocitos y su posterior maduración in vitro se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Preparación de los espermatozoides para la fecundación

Experiencias 1 y 2

En estas experiencias la mezcla de eyaculados fue dividida en 3 partes y se utilizó en cada una de ellas, un medio distinto para la preparación de los espermatozoides. Los 3 medios fueron los siguientes:

a.- medio Tyrode's (Bavister y Yanagimachi, 1977) modificado por Parrish y col. (1986) y designado en este trabajo con el nombre de TALP/H (Tabla 2 del apartado general de material y métodos).

b.- Medio Definido (Brackett y Oliphant, 1975) modificado por Younis y col. (1991) (Tabla 1 del apartado general de material y métodos) denominado aquí como mDM.

c.- TCM199 (Sigma, M-2520) suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, 0,11 mg/ml piruvato sódico, 6 mg/ml BSA (Sigma, A-6003) y 0,05 mg/ml gentamicina, que ha sido llamado mH-M199.

Todo el proceso de preparación de los espermatozoides para la FIV se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Experiencia 3

En esta experiencia el medio utilizado para el tratamiento del semen fue el medio mDM. Tras la centrifugación de los sobrenadantes de los tubos de swim-up, el sedimento resultante fue dividido en 2 alícuotas, con 160×10^6 espermatozoides/ml cada una, que fueron resuspendidas (1:1) con medio mDM que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina o 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina y 0,76 mg/ml de cafeína (4 mM). Los espermatozoides tratados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de heparina fueron incubados a 38,5°C durante 45 minutos mientras que los tratados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de heparina y 0,38 mg/ml de cafeína (2 mM) solo estuvieron 30 minutos. Transcurridos dichos tiempos se procedió a la inseminación de los ovocitos.

Fecundación in vitro de los ovocitos

Experiencia 1

En este grupo de experimentos las gotas de fecundación fueron preparadas con 3 medios: TALP-fert, mDM y mH-M199 suplementados todos con 1 $\mu\text{g/ml}$ de hipotaurina y siguiendo la metodología general. Los ovocitos madurados in vitro fueron colocados al azar en uno de los tres medios e inseminados con espermatozoides que habían sido incubados en el mismo medio utilizado para la fecundación.

Experiencia 2

Todas las gotas de fecundación fueron preparadas con medio TALP-fert, descrito en la Tabla 2 del apartado general de material y métodos, al que se le añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ de hipotaurina, tal y como se describe en el apartado general. La inseminación de los ovocitos se realizó espermatozoides que habían sido preparados con los distintos medios utilizados para el tratamiento del semen (TALP/H, mDM y mH-M199).

Experiencia 3

Preparación de la mezcla PHE : La mezcla de la PHE se preparó siguiendo el procedimiento descrito por Miller y col. (1994). Se preparó una solución de Penicilamina, añadiendo 3 mg de penicilamina (Sigma, P-4875) a 10 ml de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%), y una solución de Hipotaurina mezclando 1,09 mg de hipotaurina (Sigma, H-1384) a 10 ml de solución salina fisiológica. Para preparar la solución de Epinefrina fue necesario elaborar previamente dos soluciones, una que contenía 18,5 mg de epinefrina (Sigma, E-1635) en 10 ml de solución salina fisiológica, a la que se la denominó solución A, y otra, a la que se llamó solución B, que fue preparada añadiendo 165 mg de lactato sódico al 60% y 50 mg de meta-bisulfito sódico a 50 ml de agua bidestilada y posteriormente ajustando su pH a 4. La solución de epinefrina se preparó añadiendo 1 ml de la solución A en 39 ml de la solución B. La mezcla de PHE fue preparada añadiendo 250 μ l de la solución de Penicilamina, 250 μ l de la de Hipotaurina y 200 μ l de la de Epinefrina a 300 μ l de solución salina fisiológica. Una vez realizada la mezcla ésta se esterilizó con un filtro de membrana de porosidad 0,22 μ m y se dividió en viales de 120 μ l que fueron protegidos de la luz con papel de aluminio y almacenados en el congelador a -20°C.

Antes de la preparación de las gotas de fecundación se descongeló un vial y se añadió 40 μ l de la solución PHE a 960 μ l de medio TALP-fert para la preparación de las microgotas de FIV. El medio de fecundación contenía una concentración final de Penicilamina de 20 μ M, de Hipotaurina de 10 μ M y de Epinefrina de 2 μ M.

En esta experiencia los ovocitos madurados fueron transferidos al azar a microgotas de medio a) TALP-fert solo, b) control: TALP-fert + hipotaurina (1 μ g/ml) o c) TALP-fert + PHE. Los ovocitos que se encontraban en las gotas de medio sin hipotaurina fueron inseminados con espermatozoides previamente tratados con heparina y caféina, mientras que las gotas de FIV que contenían hipotaurina o PHE fueron inseminadas con espermatozoides incubados solamente con heparina.

Cultivo in vitro de los embriones

A las 24 horas de la inseminación, los cigotos fueron separados de los espermatozoides y trasplantados a un cultivo en monocapa de células del cumulus que había sido preparado 48 horas antes siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos. El co-cultivo de los embriones se mantuvo durante 7 días.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos y cigotos como la evaluación del número de células de los embriones y el tratamiento estadístico de los resultados se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado general de material y métodos.

RESULTADOS

Experiencia 1

El porcentaje de maduración medio de todas las experiencias fue de un 66,3% (65/98).

Los resultados de fecundación y cultivo presentados en las Tablas 1 y 2 revelan diferencias significativas en las tasas de penetración, división y desarrollo de los embriones en función de las distintas condiciones de fecundación. Tras 17 horas de co-cultivo de los gametos (Tabla 1), los niveles de penetración y poliespermia fueron significativamente ($p < 0,05$) menores en el grupo de ovocitos fecundados en medio mH-M199, aunque los porcentajes de fecundación normal y de cigotos poligínicos obtenidos en este tratamiento no difirieron de los obtenidos al utilizar medio TALP-fert. El medio mDM y el medio TALP-fert dieron porcentajes parecidos de penetración, fecundación normal y poliploidías.

A las 48 horas de la inseminación (Tabla 2), los ovocitos que habían sido tratados con mH-M199 se dividieron en menor grado ($p < 0,05$) que los inseminados en mDM o TALP-fert, pero al comparar el número de embriones de más de 2 células sobre el total de embriones obtenidos no hubo diferencias

entre este tratamiento y el resto (48,8%, 57,5% y 63,1%, medios mH-M199, TALP y mDM, respectivamente). Después de 7 días de cultivo en una monocapa de células del cumulus (Tabla 2), los embriones que procedían del grupo de ovocitos inseminados en medio mH-M199 superaron el bloqueo de las 8 células en un porcentaje significativamente ($p < 0,05$) mayor que el resto de embriones. En cuanto al porcentaje de mórulas y blastocistos, no hubo diferencias entre los tratamientos.

Experiencia 2

El porcentaje de maduración medio de todas las experiencias fue de un 68,5% (85/124).

Los resultados de fecundación obtenidos a las 17 horas de la inseminación están reflejados en la Tabla 3. El uso de medio mDM para la selección y capacitación de los espermatozoides dio porcentajes de penetración y fecundación normal significativamente ($p < 0,05$) superiores a los obtenidos al utilizar medio TALP/H o mH-M199 para este fin, además, el medio mDM no dio un porcentaje de poliploidías, tanto de poliespérmicos como de poligínicos, distinto a los otros dos medios.

Los resultados de división y desarrollo embrionario se muestran en la Tabla 4. En una replica, durante el periodo de cultivo con células del cumulus, la mayoría de las gotas de cultivo se contaminaron, por lo que, de esta experiencia solamente se utilizaron los resultados de fecundación y división a las 48 horas postinseminación y en los resultados de desarrollo embrionario hay 4 réplicas en vez de 5. A las 24 horas del inicio del co-cultivo con células del cumulus, el medio utilizado para la incubación del semen no influyó en el número de embriones obtenidos, ya que no hubieron diferencias entre los tratamientos ni en los porcentajes de división ni en los de embriones de más de 2 células, tanto sobre los ovocitos puestos a inseminar como sobre el total de embriones (57,5%, 56,8% y 60,7%, TALP/H, mDM y mH-M199, respectivamente).

En cuanto al desarrollo de estos embriones, sí se observó que los que procedían del grupo inseminado con espermatozoides incubados en medio

mDM superaron en mayor ($p < 0,05$) número el estadio de las 8 células que los que habían sido inseminados con espermatozoides en medio TALP/H; el grupo inseminado con mH-M199 no difirió significativamente de ninguno de los anteriores. Estas diferencias no fueron observadas al comparar los porcentajes de mórulas y blastocistos obtenidos en los distintos tratamientos.

Experiencia 3

El porcentaje de maduración obtenido en estas experiencias fue de un 66,3% (65/98).

Los resultados de este estudio se muestran en las Tablas 5 y 6. La adición de PHE a las gotas de fecundación dio peores ($p < 0,05$) porcentajes de penetración y fecundación normal que el tratamiento control, en el que solo había hipotaurina en el medio. El uso de cafeína y heparina para la capacitación de los espermatozoides proporcionó tasas de fecundación total y normal similares a los obtenidos en los otros dos tratamientos. Los mayores porcentajes de penetración y fecundación normal se obtuvo en el tratamiento control, el cual no difirió de los otros tratamientos en el grado de poliploidías.

A las 48 horas de la inseminación (Tabla 6), el porcentaje de división obtenido en el grupo de ovocitos inseminados en gotas suplementadas con PHE fue significativamente ($p < 0,05$) menor al observado en los otros dos tratamientos, aunque al comparar los porcentajes de embriones de más de 2 células sobre el total de ovocitos puestos a inseminar, no se hallaron diferencias significativas entre este grupo y el tratado con cafeína y, cuando el número de embriones de más de 2 células se expresó sobre el total de embriones obtenidos en cada grupo (67,9%, 66,3% y 72,9% para el grupo control, con cafeína y PHE respectivamente), los porcentajes fueron similares para los 3 tratamientos.

Tras 7 días de cultivo (Tabla 6), el mayor porcentaje de embriones que habían superado el estadio de las 8 células se obtuvo en el grupo de la PHE, aunque solo difirió ($p < 0,05$) significativamente del obtenido en el grupo tratado con cafeína; el porcentaje obtenido en el grupo control no difirió significativamente del observado en los otros dos tratamientos. En cuanto a la tasa de embriones

Tabla 1: Efecto de los medios de capacitación y fecundación utilizados sobre los resultados de FIV (réplicas = 4).

	n° ovoc	%Penetr (n°)	%2PN+C (n°)	%PS (n°)	%Poligin (n°)	%Poliplo (n°)
TALP/TALP	69	59,4 ^a (41)	33,3 ^{ab} (23)	15,9 ^a (11)	5,8 ^{ab} (4)	21,7 ^a (15)
mDM/mDM	76	65,8 ^a (50)	40,8 ^a (31)	11,8 ^a (9)	11,8 ^a (9)	23,7 ^a (18)
M199/M199	75	25,3 ^b (19)	20,0 ^b (15)	0,0 ^b (0)	2,7 ^b (2)	2,7 ^b (2)

^{a, b}: distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (χ^2 , $p < 0,05$). 2PN+C: 2 pronucleos+cola del espermatozoide; PS: poliespérmicos; Poligin: poligínicos; Poliplo: poliespérmicos + poligínicos.

Tabla 2: Influencia del medio de fecundación sobre los resultados de división de los ovocitos y posterior desarrollo embrionario (réplicas = 4).

	48 horas post-inseminación				día 8 post-inseminación		
	n° ovoc.	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	n° embr	%>8céls (n°)	%M+B (n°)
TALP/TALP	265	21,5 ^a (57)	29,1 ^a (77)	50,6 ^a (134)	92	15,2 ^a (14)	5,4 (5)
mDM/mDM	226	16,8 ^{ab} (38)	28,8 ^a (65)	45,6 ^a (103)	57	15,8 ^a (9)	12,3 (7)
M199/M199	190	11,6 ^b (22)	11,1 ^b (21)	22,6 ^b (43)	40	37,5 ^b (15)	12,5 (5)

^{a, b}: los valores en una misma columna con distinto superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). n°ovoc: número de ovocitos inseminados; n° embr: embriones cultivados durante 7 días; %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

Tabla 3: Efecto del medio utilizado para el tratamiento del semen sobre la FIV. (réplicas = 5).

Capacitación /fecundación	n° ovoc	%Penetr (n°)	%2PN+C (n°)	%PS (n°)	%Poligin (n°)	%Poliplo (n°)
TALP/TALP	81	60,5 ^b (49)	33,3 ^{ab} (27)	16,0 (13)	7,4 (6)	23,5 (19)
mDM/TALP	98	79,6 ^a (78)	55,1 ^a (54)	10,2 (10)	13,3 (13)	23,5 (23)
M199/M199	95	55,8 ^b (53)	34,7 ^b (33)	14,7 (14)	6,3 (6)	21,1 (20)

^{a,b}: distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas (χ^2 , $p < 0,05$); 2PN+C: 2 pronucleos + cola del espermatozoide; PS: poliespérmicos; Poligin: poligínicos; Poliploides: poliespérmicos + poligínicos.

Tabla 4: Desarrollo embrionario de ovocitos inseminados con espermatozoides tratados en TALP/H, mDM y mH-M199 (réplicas = 5).

	48 horas post-inseminación				día 8 post-inseminación		
	n°ovo	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	n° embr (n°)	%>8céls (n°)	%M+B (n°)
TALP	265	21,5 (57)	29,1 (77)	50,6 (134)	89	9,0 ^a (8)	5,6 (5)
mDM	249	22,9 (57)	30,1 (75)	53 (132)	57	21,0 ^b (12)	12,3 (7)
M199	220	19,1 (42)	29,5 (65)	48,6 (107)	92	15,2 ^{ab} (14)	5,4 (5)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 ; $p < 0,05$). n°ovoc: número de ovocitos inseminados; n° embr: número de embriones cultivados durante 7 días; M+B: mórulas y blastocistos juntos.

Tabla 5: Resultados de penetración a las 17 horas post-inseminación (réplicas = 5).

	n° ovoc	%Penetrac (n°)	%2PN+C (n°)	%PS (n°)	%Poligin (n°)	%Poliplo (n°)
Control	113	48,7 ^a (55)	37,2 ^a (42)	4,4 (5)	4,4 (5)	8,8 (10)
Cafeína	112	44,6 ^{ab} (50)	31,2 ^{ab} (35)	6,2 (7)	6,2 (7)	12,5 (14)
PHE	107	31,8 ^b (34)	20,6 ^b (22)	4,7 (5)	5,6 (6)	10,3 (11)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). 2PN+C: 2 pronucleos + cola del espermatozoide; PS: poliespérmicos ; Poligin: poligínicos; Poliploides: poliespérmicos + poligínicos.

Tabla 6: Influencia de la cafeína y la PHE sobre la división y posterior desarrollo embrionario (réplicas = 5)

	48 horas post-inseminación				día 8 post-inseminación		
	n°ovo	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	n° embr (n°)	%>8céls (n°)	%M+B (n°)
Contr	308	11,7 ^a (36)	24,7 ^a (76)	36,4 ^a (112)	110	38,2 ^{ab} (42)	9,1 (10)
Cafe	312	11,2 ^a (35)	22,1 ^{ab} (69)	33,3 ^a (104)	90	31,1 ^a (28)	4,4 (4)
PHE	271	5,9 ^b (16)	15,9 ^b (43)	21,8 ^b (59)	40	52,5 ^b (21)	12,5 (5)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). n°ovoc.: número de ovocitos inseminados; n° embr: número de embriones cultivados durante 7 días. %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

DISCUSIÓN

En nuestras condiciones, el uso de un medio simple, como el mDM y el TALP, para los procesos de capacitación de los espermatozoides y fecundación de los ovocitos, proporciona mejores tasas de penetración y división embrionaria que un medio más complejo como es el mH-M199. No obstante, si en este estudio el medio TALP proporcionó una tasa de penetración superior que el medio mH-M199 fue debido a su mayor tasa de poliespermia. En los medios mDM y mH-M199 las tasas de división fueron similares a las de fecundación normal. En el medio TALP, el porcentaje de división fue muy superior al de fecundación normal. Diversos autores (Iwasaki y col., 1989; Long y col., 1993) han descrito el posible desarrollo preimplantacional de los cigotos poliploides, por lo que no se puede descartar la idea de que parte de los embriones desarrollados con este sistema sean de este tipo y, por tanto, no viables para convertirse en un ser vivo. El empleo de medio mH-M199 para la capacitación y fecundación, a pesar de proporcionar las menores tasas de fecundación y división de los ovocitos, los embriones procedentes de este tratamiento se desarrollaron en un mayor grado durante los primeros 4 ciclos celulares que los procedentes de los medios simples. Esto podría ser debido al hecho de que en este tratamiento todo el proceso de MIV/FIV/CIV fue realizado en el mismo tipo de medio y, por tanto, los ovocitos no han sufrido ningún cambio brusco en la composición de su entorno a lo largo del proceso.

El medio mDM posee una concentración de glucosa muy superior a la existente en los otros dos medios utilizados, concretamente el mDM contiene una concentración de 14 mM, mientras que el TALP y el mH-M199 contienen 5 mM y 5,6 mM de glucosa, respectivamente. Contrariamente a lo indicado por Moore y Bondioli (1990) y Ledda y col. (1992), para los cuales la presencia de glucosa podría ser detrimental para el inicio del desarrollo embrionario, en este trabajo, este efecto negativo parece no manifestarse, ya que el mDM proporcionó un porcentaje de división de los ovocitos tras 48 horas de la inseminación similar al medio TALP y superior al medio mH-M199.

En rumiantes, los trabajos realizados con el objeto de comparar distintos medios utilizados para la capacitación y la fecundación son escasos y no han

dado resultados concluyentes debido al uso de distintos protocolos de capacitación de los espermatozoides y fecundación de los ovocitos. En discrepancia con nuestros resultados, Younis y col. (1991), en un estudio realizado en el caprino comparando el uso de estos 3 medios para el tratamiento del semen y la fecundación, el mDM proporcionó mejores porcentajes de fecundación y división a las 48 hpi que los medios mH-M199 y TALP. Sin embargo, estas diferencias pudieron ser debidas a las distintas condiciones utilizadas para la capacitación de los espermatozoides según el medio utilizado, ya que mientras que al TALP y al mH-M199 se les añadió heparina, el mDM fue suplementado con cafeína y heparina. Otros investigadores (Totey y col., 1992) también han observado la superioridad del medio mDM sobre el medio TALP, cuando se suplementaron ambos medios con heparina y, además, se añadió cafeína al medio mDM. Contrariamente, para diversos autores los medios mDM y M199 proporcionan resultados similares de fecundación y desarrollo embrionario al utilizar ambos medios suplementados con heparina y cafeína (Suzuki y col., 1991) o utilizando distintos sistemas de capacitación según el medio empleado, HIS para el mDM y heparina para el M199, (Kauffold y col., 1988).

Respecto a la influencia del medio utilizado para la capacitación de los espermatozoides sobre la fecundación de los ovocitos en medio TALP-fert, los resultados obtenidos en la experiencia 2 indican que el medio mDM es el más eficaz, ya que proporcionó tasas de fecundación total y normal muy superiores a las obtenidas con TALP o mH-M199. Además, aunque no se han observado diferencias entre las tasas de división a las 48 horas de la inseminación de los 3 tratamientos, el medio mDM proporcionó un porcentaje de división muy parecido al de penetración normal y muy inferior al de penetración total, mientras que al capacitar a los espermatozoides en TALP o mH-M199, las tasas de división fueron superiores a las de penetración normal, como si al utilizar el medio mDM solo se dividieran los cigotos normalmente fecundados en tanto que al emplear los medios TALP o mH-M199 también se desarrollaran algunos embriones poliploides. No obstante, estos embriones anormales parecen no avanzar más allá del tercer ciclo celular, ya que, tras 7 días de cultivo con células del cumulus, la proporción de embriones que habían superado el estadio de las 8 células fue superior en el grupo inseminado con espermatozoides en medio mDM. En cuanto al porcentaje de mórulas y

blastocistos, no hemos observado diferencias entre los 3 tratamientos debido, probablemente, al bajo número de embriones obtenidos.

Las causas de la superioridad del uso de medio mDM para capacitar espermatozoides caprinos en nuestras condiciones de trabajo no las conocemos, aunque podrían estar relacionadas con el hecho de que el mDM posea una concentración de calcio mayor que los medios TALP y mH-M199. Se ha descrito que la reacción acrosómica (Yanagimachi y Usui, 1974; Hunter, 1987; Crozet, 1991a) y la hiperactivación (Hunter, 1987; Fraser y Ahuja, 1988) son procesos dependientes del calcio. Además, este ion parece influir en la acción de la heparina sobre la capacitación de los espermatozoides (First y Parrish, 1987; Handrow y col., 1989; Miller y Ax, 1990) y se ha observado que la disminución de la concentración de calcio en el medio produce un incremento en el tiempo necesario para que la heparina induzca la capacitación (Mahmoud y Parrish, 1996). Otro de los compuestos del medio que también interactúa con la heparina y posee un efecto sobre la capacitación espermática es la glucosa (Parrish y col., 1985a). Como se ha indicado anteriormente, el medio mDM también posee una mayor concentración de glucosa que el TALP y el mH-M199. Parrish y col. (1985a) han indicado que la presencia de glucosa bloquea la capacitación de los espermatozoides, aunque, posteriormente, este mismo equipo también ha observado que dicho bloqueo puede ser superado incrementando el tiempo de incubación de los espermatozoides con la heparina (Parrish y col., 1989a). En este trabajo el tiempo de incubación utilizado parece neutralizar el efecto negativo del exceso de glucosa del medio mDM. Se ha de tener en cuenta que, además de los 45 minutos de incubación de los espermatozoides con heparina, tras la inseminación, en la gota de fecundación había una concentración aproximada de heparina de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ que estuvo en contacto con los espermatozoides durante 24 horas.

Con la utilización de sustancias estimuladoras de la motilidad espermática, como la caféina y la mezcla de PHE, durante el proceso de FIV, no hemos observado ningún efecto beneficioso sobre los resultados de fecundación y desarrollo embrionario. En este trabajo, los peores resultados obtenidos con la PHE respecto al control podrían ser debidos al efecto negativo de la penicilamina o la epinefrina en el medio de fecundación, ya que la hipotaurina

estaba presente en el lote control y ambos tratamientos fueron inseminados con el mismo semen, o al hecho de que la concentración utilizada ha sido la descrita por Miller y col. (1994) para el bovino, lo que no nos asegura que sea la adecuada para el caprino.

Según diversos autores (Ball y col., 1983; Critser y col., 1984), la cafeína podría aumentar la motilidad espermática en los eyaculados de mala calidad pero parece no poseer casi efecto en los de buena calidad, por lo que los resultados obtenidos con su uso son claramente dependientes del macho donante de espermatozoides y del tipo de semen utilizado. Con semen congelado bovino, algunos investigadores (Niwa y Ohgoda, 1988; Park y col., 1989) han indicado que la cafeína podría actuar sinérgicamente con la heparina para capacitar a los espermatozoides, incrementando significativamente la tasa de penetración. En el caprino y con eyaculados frescos, Cox y col. (1994) obtuvieron resultados de penetración similares al añadir o no cafeína al medio, aunque la presencia de cafeína proporcionó niveles más elevados de poliespermia que su ausencia. Para Younis y col. (1991), el tratamiento de semen fresco de macho cabrío con heparina y cafeína en medio mDM proporciona mejores resultados que el medio TALP con heparina y sin cafeína. Sin embargo, en este trabajo no se utilizó medio mDM suplementado únicamente con mDM y estos mismos autores también indican que la adición de cafeína al medio TALP con heparina no mejora los resultados. Por otro lado, el efecto de la cafeína sobre la penetración de los espermatozoides caprinos parece ser claramente dependiente de la concentración utilizada (Cox y col., 1994; Sinha y col., 1995) por lo que el uso de una concentración inadecuada podría ser detrimental para los gametos y producir la disminución de los resultados de fecundación. Concretamente, según Sinha y col. (1995) para el semen congelado es mejor utilizar una concentración de cafeína de 2 mM que de 5 mM y, con semen caprino fresco, Cox y col. (1994) indican que esta concentración ha de ser como máximo de 10 mM.

Respecto al uso de la mezcla de PHE, los resultados publicados hasta el momento son contradictorios. Utilizando medio TALP con heparina para capacitar espermatozoides descongelados, Miller y col. (1992, 1994) han observado mayores porcentajes de división y desarrollo a las 48 horas de la inseminación cuando la PHE estaba presente en la gota de fecundación que en

su ausencia, mientras que Long y col. (1993) no han obtenido ningún efecto con su adición. Estos últimos autores tampoco han observado una mejora con su uso en medio CR1aa (Long y col., 1994), como si la falta de acción de la mezcla de PHE no dependiera del medio utilizado. Para Susko-Parrish y col. (1990) existe un efecto sinérgico entre los componentes de la PHE y, la adición de esta mezcla acorta el tiempo de penetración, aunque no incrementa el porcentaje de ovocitos penetrados cuando se utiliza un tiempo prolongado de incubación de los gametos. Uno de los inconvenientes de la PHE es su preparación, almacenaje y uso, ya que la epinefrina es una catecolamina que se oxida muy fácilmente produciendo sustancias citotóxicas y la luz acelera este proceso (Bavister, 1989), por lo que esta sustancia debería ser manipular prácticamente a oscuras y esto dificulta enormemente su utilización.

Según Long y col. (1994), el efecto positivo de las sustancias estimuladoras de la motilidad podría solamente ser observado en los sistemas de fecundación que proporcionan niveles bajos de penetración. Además,

En este trabajo, la falta de efecto de la presencia de cafeína o PHE sobre la tasa de fecundación podría ser debida (1) a la gran calidad de los eyaculados frescos utilizados, ya que todos poseían una motilidad mínima del 70% y una concentración de espermatozoides aproximada de $4 * 10^9$ células/ml, y/o (2) a la presencia de hipotaurina en el tratamiento control. La hipotaurina también parece incrementar la motilidad de los espermatozoides y la penetración de los ovocitos (Leibrified y Bavister, 1982; Ball y col., 1984; Ahuja, 1985), siempre y cuando se utilice un periodo de incubación prolongado (7-8 horas) (Saeki y col., 1991), por lo que ha sido recomendado añadirla al medio de fecundación en vez de incubar previamente a los espermatozoides con ella (Gordon y Lu, 1990; Schellender y col., 1990).

En conclusión, bajo nuestras condiciones, la combinación del medio mDM para la capacitación del semen y el medio TALP para la fecundación es el protocolo que proporciona mejores resultados de fecundación y desarrollo. Por otro lado, la utilización de sustancias estimuladoras de la motilidad espermática, como la cafeína y la mezcla de PHE, no han mejorado los resultados de penetración y desarrollo embrionario comparado con la

utilización únicamente de heparina para el tratamiento de los espermatozoides frescos de macho cabrío.

BIBLIOGRAFÍA

Ahuja KK. Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am J Anat* 1985; 114: 207-225.

Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28: 717-725.

Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2775-2785.

Bavister BD. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of Golden Hamster eggs. *Gamete Research* 1989; 23: 139-158.

Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1977; 16: 228-237.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.

Cognie Y, Poulin N, Pignon P, Sulon J, Beckers JF, Guerin Y. Does heparin affect developmental ability of IVF goat oocytes?. *Proc 11e Réunion A.E.T.E., Hannover* 1995; p. 146.

Cox JF, Avila J, Saravia F, Santa María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology* 1994; 41: 1621-1629.

Critser ES, Leibfried ML, First NL. The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1984; 21: 625-631.

Crozet N. La Fécondation in vivo et in vitro. In: Le reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur MC (eds.). INRA-Editions Marketing, Paris 1991a. Cap 17 pp 315-337.

Crozet N, De Smedt V, Ahmed-Ali M, Sevellec C. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology* 1993; 39: 206.

Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fert* 1995; 103: 293-298.

De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognié Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 1992; 37: 1049-1060

First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fert* 1987; 34: 151-165.

First NL, Parrish JJ. Sperm maturation and in vitro fertilization. 11th Int Congr Anim Reprod & AI; Dublin 1988. pp 161-168.

Fraser LR, Ahuja KK. Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res* 1988; 20 : 491-519.

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International: University Press, Cambridge 1994.

Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production *Theriogenology* 1990; 33:77-87.

Hanada A. In vitro fertilization in goats. *Jpn J Anim Prod* 1985a; 31: 21-26.

Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *Journal of Experimental Zoology* 1989; 252: 174-182.

Hunter RHF. The timing of capacitation in mammalian spermatozoa- a reinterpretation. *Research in Reproduction* 1987; 19(2): 3.

Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T. Incidence of chromosomes anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Gamete Research* 1989; 22: 83-91.

Kauffold P, Torner H, Schmidt D, Blottner S, Rommel P. Fertilization in vitro of bovine oocytes matured in vivo. *Theriogenology* 1988; 29: 266.

Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994a; 42: 527-535.

Keskintepe L, Darwish GM, Younis AI, Brackett BG. In vitro development of morulae from immature caprine oocytes. *Zygote* 1994b; 2: 97-102.

Keskintepe L, Luvoni GC, Bassiony MM, Brackett BG. Procedural improvements for in vitro production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Research* 1996; 20: 247-254.

Ledda S, Loi P, Cappai P, Naitana S. Absence of glucose in early cleavage improves the development of ovine embryos cultured in a simple medium. *Proc. 12th Int Congr Anim Reprod; The Hague* 1992. Vol. 3: 381 (3 pp.).

Leibfried ML, Bavister BD. Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. *J Reprod Fert* 1982; 66: 87-93.

Ling L, Jufen Q, Yong Z. In vitro fertilization of goat ovarian oocytes. *Theriogenology* 1992; 37: 347.

Long CR, Chase CN, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameters and development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 1993; 39: 261.

Long CR, Damiani P, Pinto-Correia C, MacLean RA, Duby RT, Robl JM. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fert* 1994; 102: 361-369.

Mahmoud AI, Parrish JJ. The role of extracellular calcium during capacitation of bovine sperm by heparin. *Theriogenology* 1996; 45: 315.

Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. *Molecular Reprod Dev* 1990; 26: 184-198.

Miller GF, Gliedt DW, Lester TD, Pierson JN, Rakes JM, Rorie RW. Addition of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1992; 37: 259.

Miller GF, Gliedt DW, Rakes JM, Rorie RW. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine or bovine oviductal epithelial cells alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1994; 41: 689-696.

Mogas T. Producció in vitro d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona 1994.

Moore K, Bondioli KR. Altering metabolic substrates of culture media enhances bovine IVM/IVF embryo development beyond the eight cell block. *Biol Reprod* 1990; 42: 55.

Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparine on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1988; 30: 733-741.

Niwa K, Ohgoda O, Yuhara M. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in vitro penetration of cattle oocytes. *Proc 11th Int Congr Anim Reoprod AI*; Dublin, 1988; 3: 346.

Palomo MJ. Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación in vitro en el caprino. Universitat Autònoma de Barcelona 1995.

Park CK, Ohgoda O, Niwa K. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod Fert* 1989; 86: 577-582.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and Fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985a; 24: 537-549.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine In vitro Fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591-600.

Parrish J, Susko-Parrish J, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 1989a; 41:683-699.

Pawshe CH, Totey SM, Jain SK. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994b; 42: 117-125.

Saeki K, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1991; 35: 1051-1058.

Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H, Schleger W. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 1990; 33: 477-485.

Sinha MO, Sinha AK, Singh BK. Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenology* 1995; 44: 907-914.

Slavík T, Fulka J. In vitro fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 38: 721-726.

Susko-Parrish JL, Wheeler MB, Ax RL, First NL, Parrish JJ. The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 1990; 33: 333.

Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Nishitaka Y, Okamoto K, Tsukihara T. Effect of media on fertilization and development rates of in vitro fertilized embryos, and of age and freezing of embryos on pregnancy rates. *Theriogenology* 1991; 35: 278.

Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH, Talwar GP. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). J Reprod Fert 1992; 95: 597-607.

Uguz C, Susko-Parrish JL, Parrish JJ. Cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) is elevated during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. Theriogenology 1992; 37: 311.

Vergos E. In vitro fertilization and embryo culture in cattle. PhD Thesis, National University of Ireland. Dublin 1990.

Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: The Physiology of Reproduction (2^a ed.). Knobil E and Neill JD (eds.). Raven Press, Ltd., New York 1994. Cap 5: 189-317

Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res 1974; 89: 161-174.

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. In vitro fertilization of goat oocytes. Biol Reprod 1991; 44: 1177-1182.

Younis AI, Keskintepe L, Mackie K, Brackett BG. In vitro maturation and fertilization of Toggenburg goat oocytes. Theriogenology 1992; 37: 330.

CAPÍTULO 5

CULTIVO IN VITRO E IN VIVO DE EMBRIONES CAPRINOS

INTRODUCCIÓN

Actualmente ya se han obtenido nacimientos de cabritos a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados hasta la etapa de blastocisto in vitro (Cognie y col., 1995; Keskinetepe y col., 1996). Sin embargo, unas condiciones de cultivo inadecuadas pueden producir el bloqueo del desarrollo embrionario, que en la especie caprina suele suceder en el estadio de 8-16 células (Bavister, 1988), o una disminución en la viabilidad de estos embriones. En la bibliografía, los sistemas utilizados para superar este bloqueo son numerosos, habiéndose utilizado: la transferencia de los embriones al oviducto de hembras intermediarias (Boland, 1984), distintos medios de cultivo in vitro suplementados con suero y/o con diversos tipos de células y medios acondicionados por células somáticas (Gordon, 1994; Bavister, 1995; Thompson, 1996). El perfeccionamiento de los sistemas de cultivo es muy anhelado, en términos de producción de embriones hasta un estadio preimplantacional deseado, tanto para los estudios biotecnológicos como para la industria de transferencia de embriones.

Se ha demostrado que el co-cultivo con células somáticas puede mantener el desarrollo de los embriones desde la etapa de cigoto hasta la de blastocisto (Eyestone y First, 1988, 1989; Rexroad, 1989) y en la actualidad es el sistema más utilizado para cultivar embriones in vitro. Muchos autores han observado que el co-cultivo de los embriones producidos in vitro con cualquier tipo de células somáticas suele mejorar el desarrollo al compararlo con el cultivo en medio sin células (Gandolfi y Moor, 1987; Eyestone y First, 1989; Aoyagi y col., 1990; Ellington y col., 1990c; Nakao y Nakatsuji, 1990; Pavasuthipaisit y col., 1994; Rehman y col., 1994), aunque otros no han observado ningún aumento de la tasa de blastocistos con su presencia (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Bavister y col., 1992; Shamsuddin y col., 1993b; Carolan y col., 1995). Hay evidencias de que el efecto beneficioso del co-cultivo está relacionado con polipéptidos producidos por las células somáticas que actuarían como factores embriotróficos (Gandolfi y Moor, 1987; Gandolfi y col., 1989). Son diversos los trabajos indicando o revisando las posibles causas de este efecto positivo sobre el desarrollo embrionario (Bavister 1988, 1995; Rexroad, 1989; Bongso y Fong, 1991; Kane y col., 1992). Según estos

autores, las células somáticas actuarían: (a) produciendo sustancias mitógenas para el embrión, (b) sintetizando y liberando al medio metabolitos utilizables por el embrión, como aminoácidos, lactato y piruvato; y (c) eliminando sustancias embriotóxicas o inhibitorias del desarrollo embrionario, como el amoniaco, iones de metales pesados, metabolitos del oxígeno y glucosa .

Un factor a tener en cuenta durante el cultivo de los embriones es la atmósfera del incubador, y más concretamente, la concentración de oxígeno utilizada. Diversos autores han indicado que una concentración de oxígeno cercana a la atmosférica (20%) posee un efecto adverso sobre el desarrollo de los embriones caprinos (Batt y col., 1991), ovinos (Wright y col., 1976; Thompson y col., 1990) y bovinos (Nakao y Nakatsuji, 1990; Thompson y col., 1990; Trounson, 1992; Nagao y col., 1994). Los embriones cultivados en ausencia de células somáticas parecen desarrollarse mucho mejor en una atmósfera con una concentración de oxígeno del 5% que con un 20% de O₂ (Fujitani y col., 1996). La presencia de células somáticas en el cultivo parece contrarrestar este efecto negativo, ya que cuando se utiliza un co-cultivo la concentración óptima de O₂ en el incubador aumenta debido a las necesidades de las células de soporte (Voelkel y Hu, 1992). Así, diversos autores han observado que los embriones en co-cultivo toleran una concentración de oxígeno mayor que los cultivados en ausencia de células de soporte (Fukui y col., 1991; Poulin y col., 1994; Nagao y col., 1994), ya que, debido al consumo de oxígeno por parte de las células, la concentración de este gas alrededor del embrión es menor que en la atmósfera, por lo que disminuye su efecto tóxico (Gordon, 1994).

Algunos autores han sugerido que los efectos beneficiosos de los co-cultivo no son estrictamente ni tejido- ni especie-específicos (Marquant-Le Guienne, 1991; Goto y col., 1992; Pavasuthipaisit y col., 1994). En el caprino, se han utilizado co-cultivos tanto de células del cumulus/granulosa (Younis y col., 1991, 1992; Keskintepe y col., 1994b, 1996) como de células del epitelio oviductal (Sakkas y col., 1989; Prichard y col., 1990, 1991; Buggin-Daubié y col., 1992; Crozet y col., 1995) y ambos tipos celulares han proporcionado buenos resultados de desarrollo embrionario.

El uso de células del cumulus/granulosa tiene una ventaja obvia sobre las células oviductales y es el hecho de que ellas pueden ser rápidamente obtenidas durante el proceso rutinario de obtención de los ovocitos para la MIV. Sin embargo, al comparar su efecto con el de la presencia de células del epitelio oviductal (CEO) se han obtenido resultados dispares. Así, mientras que algunos autores han descrito la superioridad de las células del cumulus sobre las CEO en el mantenimiento del desarrollo preimplantacional de embriones de rumiante (Berg y Brem, 1989; Keskinetepe y col., 1994a), otros, no han observado diferencias entre ambos tipos celulares (Jiang y col., 1991; Behboodi y col., 1992; Goto y col., 1992) y, finalmente, numerosos estudios han indicado que el co-cultivo con CEO es más efectivo que el uso de células del cumulus/granulosa (Fukui y col., 1988b; Aoyagi y col., 1990; Wiemer y col., 1991; Shamsuddin y col., 1993b; Rorie y col., 1994a; Feng y col., 1996), de lo que se puede deducir que el tipo de células más óptimo dependería de las condiciones de cultivo utilizadas (origen de los gametos, atmósfera gaseosa, medio de cultivo,...).

Respecto a la no especie-especificidad de los co-cultivos, en el caprino, algunos autores han indicado que las CEO de origen bovino son igual de útiles para cultivar embriones caprinos que las CEO de esta especie (Buggin-Daubié y col., 1992), sin embargo, para Keskinetepe y col. (1994a), aunque los co-cultivos de los embriones caprinos con células de distintas especies pueden permitir el desarrollo embrionario, las células del cumulus y las CEO de origen bovino proporcionan peores resultados de desarrollo que las de origen caprino.

El suero es uno de los compuestos más utilizados para suplementar los medios de cultivo para embriones. El suero contiene proteínas séricas, aminoácidos, carbohidratos, elementos traza, hormonas, factores de crecimiento y factores indefinidos (Takagi y col., 1991). Su composición y la concentración de sus componentes varían en función del animal donante y el momento de su recogida, por lo que su adición al medio de cultivo, además de alterar la composición original del medio (Bavister, 1995), es una fuente de variación muy importante (Ellington y col., 1990c). Para Pinyopummintr y Bavister (1991) cuando se utiliza un co-cultivo con

células somáticas, se ha de añadir suero al medio para aumentar significativamente la proporción de blastocistos obtenida, ya que, posiblemente, el medio de cultivo sin suero no es suficiente para mantener la actividad normal de las células oviductales y, por lo tanto, impide su efecto beneficioso. El efecto positivo del suero sobre el desarrollo embrionario también ha sido observado en otros estudios (Chen-Lu y Lu, 1990; Takagi y col., 1991; Pinyopummintr y Bavister, 1994; Salamone y col., 1995). No obstante, otros investigadores no han observado este efecto ni con medios sin células (Carolan y col., 1995; Eckert y Niemann, 1995), ni con células (Lim y col., 1996a), ni en medios acondicionados (Mermillod y col., 1992c, 1993b).

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones forman un amplio rango que va desde los medios con una formulación muy sencilla, formados por sales inorgánicas y algunas fuentes energéticas y proteicas, hasta medios muy complejos que contienen sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, substratos energéticos y otros componentes. Algunos de estos ingredientes podrían ser innecesarios e, incluso, perjudiciales para la división y desarrollo de los embriones preimplantacionales, como por ejemplo algunas vitaminas y la glucosa (Takahashi y First 1992; Rorie y col., 1994a). En algunos estudios realizados con embriones de rumiante en co-cultivo con CEO, los medios simples, como el CZB (Ellington y col., 1990b, 1990c; Ledda y col., 1992, 1994) o el SOF (Rorie y col., 1994a), han proporcionado buenos resultados. Concretamente, Ellington y col. (1990c) han obtenido mejores resultados al utilizar CZB que con un medio mucho más complejo como es el Ham's F10, y para Rorie y col. (1994a) el medio SOF es más útil que el medio M199. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Wright y col. (1976) al comparar diversos medios, ya que para ellos los medios SOF, M199 y Ham's F10 son igual de efectivos, o por Vansteenbrugge y col. (1996) para los cuales los medios SOF y M199 proporcionan resultados similares de desarrollo. Parece ser que el medio de cultivo, las condiciones de cultivo y el uso de distintos tipos celulares para el co-cultivo están muy relacionados y el éxito del proceso depende de la combinación utilizada (Fukui y col., 1991; Bavister, 1995).

El uso de un medio acondicionado mediante células oviductales parece promover el desarrollo de los embriones, ayudándolos a superar el bloqueo de las 8-16 células y su avance hasta blastocisto (Eyestone y col., 1990, 1991; Boccart y col., 1991; Mermillod y col., 1993b), indicando que en este tipo de medios están presentes algunos factores embriotróficos sintetizados por las CEO. El uso de medio acondicionado presenta varias ventajas sobre el co-cultivo, como son (a) la disminución del riesgo de contaminación del cultivo, (b) la eliminación del efecto confuso de la presencia de tejidos adicionales en los estudios sobre el metabolismo embrionario y (c) la posibilidad de ser almacenado y que no sea necesario prepararlo en cada experiencia, como sucede con el uso de los cultivos celulares primarios (Eyestone y col., 1991; Bavister y col., 1992; Mermillod y col., 1993b). No obstante, aunque para algunos autores la presencia de estas células somáticas durante el cultivo de los embriones no es necesaria, puesto que no observan diferencias en los resultados al utilizar un co-cultivo o medio acondicionado (Eyestone y First, 1988, 1989; McCaffrey y Screenan, 1991; Vergos y col., 1991; Mermillod y col., 1992c; Cognie y col., 1994), otros han indicado que el contacto físico entre el embrión y las células oviductales podría ser esencial para el desarrollo de dichos embriones, ya que los embriones co-cultivados con estas células se desarrollan en una mayor proporción que los cultivados con medio acondicionado (Rexroad y Powell, 1988b; Bongso y col., 1990; Ellington y col., 1990c; Boccart y col., 1991; Naqvi y col., 1992; Rieger y col., 1992, 1995; Trounson y col., 1994; Hernandez-Ledezma y col., 1995).

El bloqueo del desarrollo de los embriones en la fase de 8-16 células suele ser considerado como un problema del cultivo *in vitro*. Una forma de comprobar la validez del cultivo *in vitro* es compararlo con el cultivo en el oviducto de una hembra receptora intermediaria. Los embriones de rumiante han sido cultivados temporalmente en oviductos de oveja (bovino: Eyestone y col., 1987; Fukui y col., 1989; ovino: Czlonkowska y col., 1991) y coneja (bovino: Lawson y col., 1972a; Aoyagi y col., 1988; Fukui y col., 1989; Ellington y col., 1990a; Utsumi y col. 1991; ovino: Lawson y col., 1972b; Crozet y col., 1987a).

Se ha observado que los embriones caprinos se hallan entre los estadios de 8 y de 16 células a los 3 ó 4 días de la inseminación, momento en el que se produce el paso de los embriones del oviducto al útero (Harper, 1982; Sakkas y col., 1989). En el ovino, Lawson y col. (1972b) han observado que la viabilidad de los embriones cultivados durante 3 días en el oviducto de conejas es mayor que la de los cultivados durante 5 ó 7 días. Lo mismo ha sido descrito por Polge y Rowson (1975) en el bovino, ya que el cultivo durante más de 3 días en el oviducto de coneja disminuía la calidad y la viabilidad de los embriones.

El objetivo de este trabajo fue comparar distintos sistemas de cultivo con el propósito de determinar el más adecuado para cultivar *in vitro* embriones procedentes de ovocitos de cabras prepúberes madurados y fecundados *in vitro*. Para ello se estudió el efecto: (a) del tipo y origen de las células somáticas utilizadas para el co-cultivo, comparando para ello células del cumulus/granulosa y células del epitelio oviductal (CEO) de origen caprino o bovino; (b) de la presencia de suero en el co-cultivo; (c) del tipo de medio utilizado, comparándose dos medios relativamente simples (CZB y SOF) con dos medios complejos (TCM199 y Ham's F10); y (d) del medio acondicionado por células oviductales caprinas. Además, (e) se comparó la efectividad del cultivo *in vitro* para ayudar a los embriones a superar el bloqueo del desarrollo en el cuarto ciclo celular con la del cultivo *in vivo* en el oviducto de coneja durante 3 tiempos distintos (24h, 48h y 72h de cultivo *in vivo*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos foliculares de cabras prepúberes

La obtención de los ovocitos y su posterior maduración *in vitro* se realizó tal como se indica en el apartado general de material y métodos.

Capacitación espermática y fecundación de los ovocitos

En este grupo de experiencias se utilizó medio mDM con heparina para capacitar a los espermatozoides y medio TALP con hipotaurina para la fecundación, siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Preparación de los distintos cultivos celulares

Los ovarios y oviductos de cabras prepúberes y vacas de ciclo estral desconocido se obtuvieron en un matadero comercial y fueron transportados hasta el laboratorio tal y como se especifica en el capítulo general.

Ya en el laboratorio, las células del cumulus y de la granulosa caprinas (CCc) se aislaron de las placas de petri utilizadas para el lavado de los CCOs, mientras que las bovinas (CCb) fueron obtenidas mediante la aspiración con una aguja de 21G conectada a una jeringa de 2 ml, de aquellos folículos que presentaban menos signos de atresia.

La elaboración de los cultivos, tanto de células del cumulus como de células del epitelio oviductal, se realizó siguiendo la metodología indicada en el apartado general de material y métodos.

Preparación del medio de cultivo acondicionado mediante células del epitelio oviductal

Tras la obtención de las células epiteliales de oviductos de cabras prepúberes, éstas fueron incubadas en medio TCM199 con un 10% de SCC. Transcurridas 24 horas, las células cultivadas fueron centrifugadas a 200*g durante 10 minutos y el sedimento celular fue lavado en medio de cultivo sin suero, resuspendido (0,25 ml de sedimento/10 ml de medio de cultivo) y utilizado para acondicionar, durante 48 horas, medio TCM199bicarbonate (Sigma, M-2154) al que se le había añadido 0,55 mg/ml piruvato sódico, 0,146 mg/ml L-glutamina, 3,5 mg/ml BSA y 0,05

mg/ml gentamicina. Al finalizar este segundo periodo de incubación, la suspensión tisular fue centrifugada (200*g durante 10 minutos) y el sobrenadante fue esterilizado, mediante la filtración a través de un filtro de membrana de porosidad 0.22 μm y almacenado a 4°C hasta el momento de su utilización.

Cultivo in vitro de los embriones

En todas las experiencias el cultivo de los embriones duró 7 días y se llevó a cabo en una atmósfera con un 5% CO₂ en aire y saturada de humedad a 38,5°C. Aproximadamente cada 48 horas se procedió al cambio de 50 μl del medio de las gotas de cultivo por medio nuevo.

Experiencia 1

En esta experiencia se estudió el efecto de dos tipos celulares, células del cumulus/granulosa y CEO, de dos especies distintas, caprina o bovina, sobre el desarrollo embrionario.

Transcurridas 24 horas desde el inicio de la fecundación, los ovocitos fueron liberados de las células del cumulus y de los espermatozoides que se encontraban adheridos a su superficie mediante una pipeta de pequeño diámetro y colocados al azar en microgotas de medio de cultivo suplementado con un 10% de SCC (a) sin células somáticas (M199+SCC) o con uno de los siguientes co-cultivos celulares: (b) monocapa de células del cumulus de cabras prepúberes (CCc+SCC), (c) monocapa de células del cumulus bovinas (CCb+SCC), (d) agregados de células epiteliales de oviductos de cabra prepúber (CEOc+SCC) o (e) agregados de células oviductales bovinas (CEOb+SCC).

Experiencia 2

En este segundo estudio se intentó determinar el efecto de la presencia de suero y/o células oviductales en el medio de cultivo sobre el desarrollo de

los embriones. Para ello se realizó un diseño experimental del tipo factorial 2×2 con la presencia de células y la de suero como factores. Así, los tratamientos utilizados fueron: (a) medio de cultivo sin suero ni células (M199), (b) medio de cultivo suplementado con un 10% SCC (M199+SCC), (c) medio de cultivo con células oviductales de cabras prepúberes (CEOc) y (d) medio con CEOc y un 10% SCC (CEOc+SCC). A las 24 horas postinseminación los cigotos fueron transferidos al azar a uno de estos 4 tratamientos.

Experiencia 3

Se utilizaron 4 medios de cultivo distintos para la preparación de las CEOc y el posterior cultivo de los embriones. Concretamente, estos 4 medios fueron: (a) TCM-199 *bicarbonate* + 0,55 mg/ml de piruvato sódico + 0,146 mg/ml L-glutamina + 3,5 mg/ml de BSA + 0,05 mg/ml de gentamicina, (b) Fluido Oviductal Sintético modificado (mSOF) descrito por Tervit y col. (1972) y modificado posteriormente por Takahashi y First (1992) y cuya composición se muestra en la tabla 1, (c) medio Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) (Chatot y col., 1989) descrito también en la tabla 1, y (d) Ham's F-10 (Sigma, N-6013) al que se le añadió piruvato sódico (0,55 mg/ml), L-glutamina (0,146 mg/ml), BSA (3,5 mg/ml) y gentamicina (0,05 mg/ml). Todos los medios fueron ajustados a un pH de 7,4, esterilizados mediante la filtración a través de una membrana de porosidad 0,22 µm. Las gotas de cultivo fueron preparadas, como mínimo, una hora antes de transferirles los agregados de células oviductales y, durante este tiempo, permanecieron equilibrándose en el incubador a 38,5°C en una atmósfera con un 5% CO₂ en aire y saturada de humedad.

Experiencia 4

En estas experiencias, tras la fecundación los cigotos fueron cultivados en: (a) medio TCM-199 sin células y sin acondicionar, (b) en medio de cultivo con una suspensión de células del epitelio oviductal, o (c) en medio acondicionado mediante células oviductales (MC) elaborado tal y como se ha descrito anteriormente.

Experiencia 5

A las 24 horas de la inseminación, los cigotos fueron depositados en microgotas de medio M-199 con células del epitelio oviductal de cabras prepúberes. A las 40-42 horas postinseminación, un grupo de embriones permaneció en el co-cultivo hasta el 7º día, utilizándose como tratamiento control, y el resto fueron transferidos a oviductos de coneja.

Para la transferencia se utilizaron 9 conejas adultas (> 5 meses de edad) de raza Neozelandesa como hembras receptoras temporales. La inducción de la ovulación y de la pseudogestación se realizó mediante la administración por vía intravenosa de una dosis única de 50 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Phyxex-Leo®, Lab. Leo, Madrid) 20-24 horas antes de la transferencia. Para la intervención quirúrgica, las conejas fueron anestesiadas con una mezcla de 150 mg/Kg PV de clorhidrato de ketamina (Imalgene®, Rhone Mérieux, Lyon, France) y 30 mg/Kg PV de clorhidrato de tilazina (Rompun®, Bayer, Barcelona) administrada por vía intramuscular. El acceso a la cavidad abdominal se realizó mediante una laparotomía ventral media. Tras el examen visual de los ovarios para comprobar la existencia de estigmas foliculares que aseguren la condición de pseudogestación de la coneja, se procedió a la transferencia de los embriones a ambos oviductos. Los embriones fueron cargados con una micropipeta en grupos de 10 a 30 embriones en un volumen aproximado de 20 µl de medio de cultivo y depositados en la ampolla, aproximadamente a 1,5 cm del orificio abdominal. Al finalizar la transferencia se lavaron las vísceras con solución salina atemperada (25-50 ml) y finalmente se suturó la herida por capas. Hasta la recuperación de los embriones se siguió una antibioterapia sistémica mediante una solución de enrofloxacina al 2,5% (Baytril®, Bayer AG, Leverkusen, Alemania).

La recuperación de los embriones se realizó tras 24 (3 conejas), 48 (3 conejas) ó 72 (3 conejas) horas de la transferencia. Tras sacrificar a las conejas se procedió a la extracción de su aparato reproductor. Los oviductos y cuernos uterinos fueron disecados y, tras seccionar la unión uterotubárica, se lavaron por separado con 10-15 ml de medio

TCM199/HEPES. Los embriones recuperados fueron evaluados y puestos a cultivar en microgotas de medio de cultivo con células oviductales hasta el día 8 postinseminación.

Tabla 1: Composición de los medios mSOF (Fluido oviductal sintético modificado, Takahashi y First, 1992) y CZB (Chatot y col., 1989).

	mSOF		CZB	
	gr/l	mM	gr/l	mM
NaCl	6,299	107,7	4,769	81,7
KCl	0,534	7,2	0,360	4,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,251	1,7	0,249	1,7
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,099	0,5	-	
MgSO ₄ .7H ₂ O	-		0,294	1,2
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,324	1,2	0,322	1,2
Rojo fenol	0,001		-	
Gentamicina	0,050		0,050	
NaHCO ₃	2,104	25,1	2,110	25,1
EDTA	-		0,041	
Lactato sódico	0,370	3,3	3,508	31,3
Piruvato	0,033	0,3	0,029	0,3
L-glutamina	-		0,146	1,0
BSA	3		5	

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos y cigotos como la evaluación del número de células de los embriones se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos. El tratamiento estadístico de los resultados también fue el descrito en el mismo apartado.

RESULTADOS

Experiencia 1

Comportamiento de las células somáticas utilizadas para el co-cultivo

Los agregados de células del cumulus/granulosa, tras permanecer 48 horas en las gotas de medio de cultivo, se habían adherido a la base de la placa y formado una monocapa.

En el momento de la recogida, los fragmentos de epitelio oviductal formaban láminas de distintos tamaños. Tras una noche de cultivo, muchas células, aparentemente muertas, se habían desprendido del epitelio y habían precipitado, mientras que las láminas epiteliales viables habían formado unas estructuras parecidas a un gusano debido a su forma y al movimiento activo producido por el bateo de los cilios de las células vivas. Durante los dos primeros días de cultivo de las CEO en las microgotas de cultivo, los agregados celulares empezaron a formar unas estructuras vesiculares, algunas de las cuales fueron aumentando de tamaño hasta llegar a ser esféricas, mientras que otros fragmentos tisulares y células aisladas se adhirieron a la placa y formaron una monocapa. Transcurridos 9 días desde su recogida todavía se podían ver estructuras vesiculares moviéndose por la gota de cultivo.

Maduración, fecundación y desarrollo embrionario

El porcentaje de maduración nuclear medio de todas las experiencias, tras 27 horas de MIV, fue de un 71,9% (64/89).

A las 17 horas de la inseminación (hpi), las tasas de penetración y de fecundación normal fueron de un 42,7% (38/89) y un 29,2% (26/89), respectivamente.

Los porcentajes de división a las 48 hpi, fueron similares en todos los sistemas (Tabla 2), aunque el porcentaje de embriones que habían superado el estadio de las 2 células sobre el total de embriones fue significativamente ($p < 0,05$) inferior