EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS UNIDOS A LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA) SOBRE LA FECUNDACIÓN "IN VITRO" (FIV) Y POSTERIOR DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Izquierdo, M.D., Palomo, M.J., Mogas, M.T. y Paramio, M.T.
Departament de Patologia i Producció Animal. Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

INTRODUCCIÓN

El efecto de los distintos componentes (nutritivos, hormonales,...) presentes en los medios de maduración y fecundación "in vitro" tienen consecuencias importantes sobre el éxito de la fecundación y el posterior desarrollo de los embriones. La albúmina sérica bovina (BSA) es una proteína altamente ligadora de lípidos que capta los ácidos grasos y el colesterol de las membranas celulares, desestabilizándolas (Fournier-Delpech y Thibault, 1991) e interviene en el transporte de determinadas sustancias a través de la membrana. La importancia del papel de la albúmina queda demostrada por la variación de los resultados de desarrollo embrionario que se obtienen en función de su pureza (Madison y col., 1990). En nuestro laboratorio, el protocolo utilizado por Martino (Tesis doctoral) incorporaba BSA fracción V no purificada de ácidos grasos para el medio de fecundación. Sin embargo Younis y col. (1989) especifican que la BSA tiene que ser libre de ácidos grasos tanto para el medio de capacitación de los espermatozoides como para el de fecundación.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de los ácidos grasos contaminantes de la BSA, en los medios de capacitación del semen y de fecundación, sobre la FIV de ovocitos de cabras prepúberes y posterior desarrollo de los embriones "in vitro".

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en una solución salina tamponada estéril a 37ºC. Los ovocitos se obtuvieron cortando repetidamente los ovarios en medio 199/Hepes suplementado con 2.2 mg/ml de bicarbonato sódico y 50 µg/ml de penicilina. Los ovocitos con el cumulus compacto y el citoplasma homogéneo fueron seleccionados y puestos a madurar en microgotas de 50 µl de medio TCM199 suplementado con un 20% de suero de cabra en celo + 10µg/ml FSH + 10µg/ml LH + 1µg/ml 17ß-estradiol a 38.5ºC en una atmósfera del 5% de CO_2 en aire.

El semen utilizado fue un mezcla de eyaculados de 2 machos adultos de raza Murciano-Granadina de fertilidad conocida. La preparación del semen se realizó siguiendo la metodología descrita por Younis y col. (1989) pero usando una concentración de heparina de 100µg/ml y un tiempo de incubación de 45 minutos.

Tanto el "swim-up" como la incubación del semen se realizó en HmTALP (medio Tyrode modificado con Hepes) (Parish y col., 1986), al cual se incorporó:

S-: 6mg/ml de BSA fracción V libre de ácidos grasos (Sigma, ref. A-6003).

S+: 6mg/ml de BSA fracción V (Sigma, ref. A-9647).

Los ovocitos, después de madurar durante 27 horas, fueron transferidos a gotas de 100µl de medio de fecundación mTALP-fert. (Parrish y col., 1986) con hipotaurina (1µg/ml) y:

F-: 6mg/ml de BSA fracción V libre de ácidos grasos (Sigma, ref. A-6003).

F+: 6mg/ml de BSA fracción V (Sigma, ref. A-9647).

y fecundados con una concentración final en la gota de 2-5 10^6 espermatozoides/ml.

El diseño de este trabajo es un modelo factorial 2×2 con los siguientes tratamientos:

S+ F+: Medios de capacitación y fecundación con grasa .

S+ F-: Medio de capacitación con grasa y medio de fecundación sin grasa.

S- F+: Medio de capacitación sin grasa y medio de fecundación con grasa.

S- F-: Medios de capacitación y fecundación sin grasa.

A las 27 horas del inicio de la maduración y a las 17 horas post-inseminación se recogieron muestras de ovocitos para evaluar la maduración y la penetración espermática respectivamente. Todas las muestras fueron fijadas en ácido acético:etanol (1:3, v/v) y posteriormente teñidas con Lacmoid 4% y observadas al microscopio óptico.

A las 24 horas de la inseminación, el resto de los embriones fueron transferidos a una monocapa de células de la granulosa en medio 199/Hepes suplementado con 2.2 mg/ml de bicarbonato sódico, 50µg/ml de piruvato sódico, 50 µg/ml de penicilina y un 10% de suero de cabra en celo. A les 48 horas de la inseminación se evaluó la división de los embriones y solo se dejaron en las monocapas los embriones divididos. Cada dos días se valoraron los embriones y se cambiaba el medio de cultivo. A los 8 días post-inseminación los embriones fueron teñidos con Hoechst 33342 (Pursel y col., 1985) para conocer el estadio de desarrollo en el que se encontraban.

Los resultados fueron analizados estadísticamente con una χ^2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de maduración medio de todas las experiencias fue un 73.34% (55/75).

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos de fecundación y de desarrollo embrionario.

En nuestras condiciones, los mejores resultados de penetración total a las 17 horas de la inseminación se obtuvieron al añadir BSA con ácidos grasos tanto en el medio utilizado para el procesado del semen como en las gotas de fecundación (S+ F+), aunque solo difiere significativamente del tratamiento en el cual se usó BSA con ácidos grasos solo en el medio de fecundación (S- F+). Estas diferencias significativas también se observaron en la penetración normal (2PN+C).

Tabla 1: Resultados de fecundación de ovocitos de cabras prepúberes a las 17 horas post-inseminación

	nº ovoc.	%ovoc. Penetrados (nº)	%2PN+C (nº)	%Poliespérmicos (nº)
S- F-	48	35,4 ab (17)	25 a (12)	10,4 (5)
S- F+	42	23,8 a (10)	4,8 b (2)	11,9 (5)
S+ F-	45	37,8 ab (17)	24,4a (11)	11 (5)
S+ F+	47	53,2 b (25)	23,4a (11)	23,4 (11)

a,b: valores de la misma columna con letras distintas difieren significativamente ($p<0,05$)
2PN+C: 2 pronúcleos + cola de espermatozoide.

En cuanto al porcentaje de división total a las 48 horas de la inseminación, el uso de BSA libre de ácidos grasos en el medio de capacitación del semen presentó valores significativamente inferiores a los que se obtuvieron al capacitar el semen en un medio con ácidos grasos, independientemente de la pureza de la BSA utilizada en el medio de fecundación. Estas diferencias ya no se observaron en los embriones que superaron el estadio de 8 células a los 8 días de la inseminación. El numero de blastocistos obtenidos aún difiere mucho de los porcentajes obtenidos en otras especies, aunque en nuestras condiciones la capacitación del semen con BSA no purificada dio los mejores resultados.
En conclusión, no se observa ningún efecto negativo de la utilización de BSA no purificada sobre la fecundación y el posterior desarrollo embrionario de ovocitos de cabras prepúberes.

Tabla 2: Resultados de división y desarrollo de los embriones

	48 horas post-inseminación				día 8 post-inseminación		
	nºovo.	%2céls	%>2céls	%Divis.	nº Embr.	%>8céls	%Blast.
S- F-	161	12,42%ab (20)	8,70%a (14)	21,11%a (34)	26	11.54% (3)	0% (0)
S- F+	171	8,77%a (15)	12,86%ab (22)	21,64%a (37)	30	13.33% (4)	0% (0)
S+ F-	161	16,15%b (26)	18,01%b (29)	34,16%b (55)	26	15.39% (4)	3.85% (1)
S+ F+	165	18,18%b (30)	13,94%ab (23)	32,12%b (53)	32	15.63% (5)	3.12% (1)

a,b: valores de la misma columna con letras distintas difieren significativamente ($p<0.05$)
nºovo.: total ovocitos puestos a inseminar.

BIBLIOGRAFÍA

Fournier-Delpech S. et Thibault C. (1991) Acquisition de la fécondance du spermatozoïde. A: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C. et Levasseur M.C. (eds.) INRA- Editions Marketing, Paris, pp. 251-272.

Madison V., Greve T., Avery B. and Mortensen V. (1990) The effect of BSA quality on embryonic development in vitro. 4th Franco-Czechoslovak Meeting, Prague, V, p. 17.

Martino A. (1992) Maduración y fecundación in vitro de ovocitos de cabra prepúber. Tesis doctoral

Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H. and First N.L. (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 25: 591-600.

Pursel V.G., Wall R.J., Rexroad C.E. Jr., Hammer R.E. and Brinster R.L. (1985) A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24: 687-691.

Younis A.I., Brackett B.G. and Fayrer-Hosken R.A. (1989) Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Gamete Res. 23: 189-201.