MADURACIÓN Y VIABILIDAD IN VIVO DE OVOCITOS PORCINOS MADURADOS IN VITRO EN DOS SISTEMAS DIFERENTES

Romar R, Coy P, Gadea J, Campos I, Sellés E, Ruiz S.
Departamento de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria.
Universidad de Murcia. Fax: 968-364147 e-mail: rromar@fcu.um.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han logrado importantes avances en los sistemas de maduración y fecundación in vitro. Sin embargo, la eficacia en la producción de embriones in vitro en la especie porcina todavía es reducida (Nagai, 1996) debido, fundamentalmente, a dos problemas aún sin resolver. Por un lado el reducido número de ovocitos penetrados que desarrollan pronúcleo masculino y, por otro, la alta incidencia de polispermia característica de esta especie, que determinan un bajo rendimiento del proceso. Entre las posibles causas de estos problemas algunos autores han sugerido la incorrecta maduración in vitro (MIV) de los ovocitos porcinos (Zheng y Sirard, 1992; Niwa, 1993).

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la eficacia de dos sistemas distintos para MIV de ovocitos porcinos, valorando ésta tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Además se comprobó la viabilidad in vivo de los ovocitos madurados in vitro transfiriéndolos a cerdas receptoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios procedentes del sacrificio de cerdas prepúberes y madurados en dos sistemas diferentes empleados comúnmente para MIV porcina. El sistema 1 (S1) corresponde básicamente al descrito por Yoshida et al., (1992) y se caracteriza por el empleo de un medio rico en cisteína (medio Waymouth) suplementado con fluido folicular porcino, PMSG, HCG, estradiol y realizando el cultivo bajo condiciones estáticas. El sistema 2 (S2) se basa en la utilización de medio TCM-199, presencia de fragmentos de pared folicular, LH, FSH y cultivo bajo condiciones no estáticas (Ding et al., 1992). En ambos sistemas se empleó suero fetal bovino (10% v/v) y la MIV se llevó a cabo durante 44 horas en condiciones de 38'5ºC de temperatura y 5% de CO_2 en aire saturado de humedad.

Pasado el periodo de MIV sobre una parte de los ovocitos se valoró la maduración citoplasmática como el contenido intracelular de glutatión (GSH). Este índice ha sido empleado por distintos investigadores como indicador del grado de maduración del citoplasma ya que el GSH está implicado en la descondensación de la cabeza espermática y la posterior formación del pronúcleo masculino (Yoshida et al., 1992; Sawai et al., 1997). Para la medición de GSH se utilizó el método de Funahashi et al. (1994). El resto de los ovocitos de cada replicado se fijaron en etanol/acético y posteriormente se tiñeron con lacmoid al 1% (w/v) examinándose bajo microscopio de contraste de fases a 400x para valorar la maduración nuclear. Se consideraron ovocitos maduros a nivel nuclear aquellos en estadio de metafase II (Met II).

Para comprobar su viabilidad in vivo, los ovocitos sometidos a MIV fueron transferidos a cerdas receptoras sincronizadas que fueron inseminadas artificialmente una hora antes de la intervención. Tras el lavado de los oviductos, para retirar los ovocitos ovulados de forma natural (Coy et al., 1993), a cada cerda le fueron transferidos en cada oviducto 20 ovocitos madurados en el mismo sistema (S1 ó S2). A las cerdas control (grupo C) tras el lavado de oviductos se les transfirieron de nuevo sus propios ovocitos. Una cerda adicional fue intervenida pero sin realizarle lavado oviductal ni transferencia (control quirúrgico). A los 26-28 días postransferencia se realizó el diagnóstico precoz de gestación mediante ultrasonografía, repitiéndose a los 35 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se hallaron diferencias significativas entre los dos sistemas de MIV en cuanto al porcentaje de ovocitos que alcanzó el estadio de Met II y la media del contenido intracelular de GSH (pmol/ovocito). Las medias ± SEM para el porcentaje de Met II fueron de 83'3 ± 3'5 para el sistema 1 versus 86'5 ± 2'5 para el sistema 2; y de 5'2 ± 0'73 en el S1 versus 3'5 ± 0'39 en el S2 para el contenido de GSH. Además, de los datos correspondientes a cada uno de los replicados (Tabla 1), observamos que no hubo relación entre el elevado porcentaje de ovocitos en metafase II tras las 44 horas de cultivo y el alto contenido intracelular de GSH (y viceversa) ni entre los sistemas de MIV. El coeficiente de correlación de Pearson entre estos parámetros no fue significativo (p= 0'55).

Tabla 1. Porcentaje de ovocitos en estadio de metafase II (%Met II) y contenido intracelular de glutatión (GSH) para cada uno de los replicados de los dos sistemas de MIV.

	SISTEMA 1			SISTEMA 2		
	maduración nuclear		maduración citoplasmática	maduración nuclear		maduración citoplasmática
Replicado	n	%Met II	contenido GSH (pmol/ovocito)*	n	%Met II	contenido GSH (pmol/ovocito)*
1	71	70'42	4'48	66	77'27	4'28
2	81	79'03	6'48	68	94'40	2'28
3	90	90'09	7'91	60	81'60	4'38
4	72	86'15	5'59	65	87'73	4'45
5	85	80'00	3'14	87	87'39	2'74
6	69	94'20	3'71	62	90'32	2'90

*: media de 30 ovocitos por sistema y replicado
Coeficiente de correlación de Pearson entre % Met II y contenido de GSH: R= 0'19 (p= 0'55)

Estos resultados nos indicarían una falta de relación entre maduración nuclear y citoplasmática, ambas valoradas en los términos que se han referido. Puesto que es poco probable que el núcleo y el citoplasma de una misma célula progresen de forma independiente, nos inclinamos a pensar que alguno de los índices de maduración seleccionados no es totalmente válido. El estadio de metafase II ha sido empleado hasta el momento como un indicativo válido de maduración nuclear. Sin embargo para medir el grado de maduración del citoplasma se han empleado distintos índices, entre ellos el contenido en GSH (Wang et al., 1997). Por ello pensamos que el contenido intracelular de GSH, por sí solo, no es un buen indicador de maduración citoplasmática.

Por lo que se refiere a la viabilidad in vivo (Tabla 2) respectivamente 3 y 2 cerdas de los grupos S1 y S2, así como el control quirúrgico, resultaron gestantes tras el primer diagnóstico de gestación. Sin embargo, tras el segundo diagnóstico sólo una cerda del grupo S1 y la control quirúrgico permanecían preñadas. Finalmente la cerda del grupo S1 llevó a término la gestación pariendo, a los 113 días de la transferencia de los ovocitos madurados in vitro, 6 lechones hembra y 1 macho completamente sanos.

Tabla 2. Resultados de la transferencia quirúrgica de ovocitos porcinos madurados in vitro a cerdas receptoras.

Cerda	Tipo de ovocitos transferidos	Número de folículos periovulatorios *	Número de ovocitos recogidos	Número de ovocitos transferidos	Diagnóstico de gestación a los 26-28días
1	S1	12	10	39	positivo
2	S1	7	6	37	positivo
3	S1	25	25	34	positivo
4	S1	12	9	39	negativo
5	S2	15	14	40	positivo
6	S2	14	12	37	positivo
7	S2	27	27	40	negativo
8	S2	15	14	40	negativo
9	C	17	16	16	negativo
10	C	14	14	14	negativo

*: Incluyendo los folículos preovulatorios y los puntos de ovulación

De los resultados obtenidos podemos deducir que ambos sistemas de MIV pueden desarrollar ovocitos viables aunque, como muchos de los autores que trabajan en este campo han reseñado (Yoshida et al., 1993), el número final de cerdas preñadas y/o de lechones nacidos suele ser muy bajo. En cuanto a los fallos obtenidos en las gestaciones no creemos probable que se debieran a un inadecuado estado de maduración de los ovocitos, ya que aquéllos madurados in vivo (cerdas control) no dieron lugar a gestaciones. Además, el hecho de que la cerda del control quirúrgico quedara gestante nos indica que la intervención quirúrgica no influyó mayormente sobre los fallos de las gestaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Coy et al. Theriogenology 1993; 40:539-546.
Ding et al. Mol Reprod Dev 1992; 33:59-66.
Funahashi et al. Biol Reprod 1994; 50:1072-1077.
Nagai T. Anim Reprod Sci 1996; 42:153-163.
Niwa KJ. J Reprod Fertil 1993; (supl. 48):49-59.
Sawai et al. Bio Reprod 1997; 57:1-6.
Wang et al. J Reprod Fertil 1997; 111:101-108.
Yoshida et al. Mol Reprod Dev 1992; 31:68-71.
Yoshida et al. Theriogenology 1993; 39:1303-1311.
Zheng y Sirard. Theriogenology 1992; 37:779-790.

Este trabajo ha sido financiado por CICYT (AGF96-1069), Programa Séneca (COM-17/96) y Fondos FEDER (1FD-97-0501).