FECUNDACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS PORCINOS MADURADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES

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

La elevada polispermia y la baja formación de pronúcleo masculino (PNM) tras la fecundación in vitro (FIV) son problemas referidos continuamente en la especie porcina (Rath, 1992; Coy et al., 1993; Funahashi y Day, 1995). Entre las distintas causas de la polispermia se ha sugerido la incorrecta maduración de los ovocitos que les impediría llevar a cabo la reacción cortical de forma adecuada (Galeati et al., 1991), el excesivo número de espermatozoides que alcanza el ovocito durante la FIV o las condiciones del cocultivo (Nagai, 1996). En cuanto a la formación del PNM normalmente las referencias se centran sobre los factores que afectan al gameto femenino (Funahashi y Day, 1995), aunque han sido descritos otros factores relacionados con el espermatozoide como el efecto del verraco (Xu et al., 1996a).

Por lo anteriormente expuesto el presente estudio ha sido diseñado con el objetivo de estudiar el efecto de dos sistemas distintos de maduración in vitro (MIV), la concentración espermática y el verraco sobre la penetrabilidad del ovocito y su capacidad para formar el pronúcleo masculino.

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.

Las muestras seminales fueron sometidas a un proceso de doble centrifugación (Martínez et al., 1996). El pellet obtenido se diluyó en el medio TCM-199 suplementado para fecundación (Mattioli et al., 1989) y se ajustó a las concentraciones finales requeridas añadiendo volúmenes de 100 µl a las placas de Petri con 2 ml de medio de fecundación y 20 ovocitos maduros. Para evaluar el efecto del verraco se empleó semen procedente de tres machos (A, B, C) de fertilidad probada, utilizándose una concentración espermática de $5x10^5$ espermatozoides/ml para el macho A y de $1x10^6$ espermatozoides/ml para los machos B y C. Estas concentraciones espermáticas se eligieron basándose en experiencias previas de fecundación in vitro para los tres machos que mostraron que las concentraciones empleadas fueron las más adecuadas para cada macho en

términos de penetración/polispermia. Para el estudio de la concentración espermática se empleó semen procedente del macho B a 1, 5, 25 y 50 $x10^4$ espermatozoides/ml.

Después de 18 horas de cocultivo en incubador de CO_2 al 5% y 38'5ºC, los ovocitos fueron fijados en una solución etanol:acético (3:1) y teñidos con una solución de lacmoid al 1% (w/v). A continuación fueron examinados bajo microscopía de contraste de fases a 400x valorándose el porcentaje de ovocitos penetrados, el número medio de espermatozoides por ovocito, las tasas de polispermia y el porcentaje de formación de pronúcleo masculino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran cómo el sistema de maduración utilizado influye sobre la tasa de penetración, obteniéndose valores superiores para los ovocitos madurados en el sistema 2 (Tablas 1 y 2). Por lo que se refiere a la concentración espermática se observa una clara relación entre la concentración empleada y los porcentajes de penetración, número medio de espermatozoides por ovocito y tasa de polispermia ($p<0'001$). Sin embargo, este parámetro no tiene un efecto significativo sobre la formación del pronúcleo masculino ($p=0'621$). Según Xu et al. (1996a) la formación del pronúcleo masculino está afectada por factores ligados al espermatozoide como es el verraco, hipótesis corroborada por los resultados expresados en la tabla 2.

Tabla 1. Porcentaje de penetración espermática (% PEN), número medio de espermatozoides por ovocito (E/O), porcentaje de ovocitos polispérmicos (%POL) y porcentaje de formación de pronúcleo masculino (% PNM) tras la FIV de ovocitos madurados in vitro en dos sistemas (S1 y S2) a diferentes concentraciones espermáticas (espz/ml).

Sistema	espz/ml (x 1000)	n	% PEN	E/O	% POL	% PNM
S1	10	102	20'59±4'02 a	1'42±0'11 a	42'86±11'07 a	57'14±11'07 ab
	50	97	56"7 ±5'06 bc	2'89±0'56 ab	52'73± 6'79 a	61'82± 6'61 ab
	250	97	90'72±2'96 d	2'87±0'22 ab	70'11± 4'94ab	57'47± 5'33 ab
	500	115	99'13±0'87 d	6'33±0'36 c	91'23± 2'66 c	71'93± 4'23 b
S2	10	103	41'75±4'88 b	1'63±0'15 a	44'19± 7'66 a	53'49± 7'7 ab
	50	112	71'43±4'29 c	2'17±0'16 a	57'50± 5'56 a	48'75± 5'62 a
	250	121	94'21±2'13 d	3'85±0'26 b	80'7 ± 3'71bc	64'04± 4'51 ab
	500	121	98'35±1'16 d	7'36±0'48 c	91'6 ± 2'55 c	50'42± 4'6 a
Fuente de variación						
Sistema de maduración			<0'001	0'246	0'261	0'082
espz/ml			<0'001	<0'001	<0'001	0'621
Sistema x espz/ml			0'004	0'093	0'617	0'027

% POL y % PNM a partir de los ovocitos penetrados
a-e: Diferentes superíndices indican valores significativamente diferentes ($p<0'05$)

Por otro lado, el hecho de que la concentración espermática no ejerza un efecto significativo sobre la formación del PNM avalaría la idea de que los ovocitos madurados en cualquiera de los dos sistemas empleados tienen capacidad para transformar al menos un espermatozoide en pronúcleo masculino. Efectivamente,

podemos observar que los porcentajes de ovocitos con al menos un PNM permanecieron alrededor de los mismos valores (del orden de un 50 a un 70%) incluso con un número alto de espermatozoides penetrados, como ocurre con el uso de las concentraciones más elevadas.

Tabla 2. Porcentaje de penetración espermática (% PEN), número medio de espermatozoides por ovocito (E/O), porcentaje de ovocitos polispérmicos (%POL) y porcentaje de formación de pronúcleo masculino (% PNM) tras la FIV de ovocitos madurados in vitro en dos sistemas (S1 y S2) con tres machos diferentes.

Sistema	Macho	n	% PEN	E/O	% POL	% PNM
S1	A	181	91'71± 2'05^{a}	6'82±0'43^{a}	86'14±2'69^{a}	43'37±3'86^{a}
	B	141	97'16± 1'4^{a}	9'83±0'59^{b}	92'7 ±2'23^{ab}	69'34±3'95^{b}
	C	156	41'67± 3'96^{b}	3'16±0'42^{c}	59'38±6'19^{c}	73'21±5'97^{b}
S2	A	141	99'29± 0'71^{a}	12'79±0'62^{d}	97'14±1'41^{b}	34'29±4'03^{a}
	B	167	100^{a}	15'35±0'75^{e}	95'81±1'56^{b}	46'11±3'87^{a}
	C	168	82'74± 2'92^{c}	4'79 ±0'4^{ac}	84'17±3'11^{a}	64'03±4'09^{b}
Fuente de variación						
Sistema de maduración			<0'001	<0'001	<0'001	<0'001
Macho			<0'001	<0'001	<0'001	<0'001
Sistema x macho			<0'001	0'002	<0'001	0'142

% POL y % PNM a partir de los ovocitos penetrados
a-e: Diferentes superíndices indican valores significativamente diferentes (p<0'05)

Aunque el sistema 2 mejora las tasas de penetración, no se alivia sustancialmente el problema de la polispermia. Las posibles soluciones pasarían por adecuar el ratio espermatozoides:ovocito en las placas de cocultivo (Xu et al., 1996b) y modificar las condiciones del sistema de fecundación in vitro que afectan a los procesos de interacción espermatozoide-ovocito acercándolas a condiciones más parecidas a las fisiológicas (Funahashi y Day, 1995).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Coy et al. Theriogenology 1993; 40:539-546.
Ding et al. Mol Reprod Dev 1992; 33:59-66.
Funahashi y Day. J Reprod Fertil 1995; (supl 52) 271-283.
Galeati et al. Mol Reprod Dev 1991; 29:40-46.
Martínez et al. Biol Reprod 1996; 55:134-140.
Mattioli et al. Theriogenology 1989; 31:1201-1207.
Nagai. Anim Reprod Sci 1996; 42:153-163.
Rath. Theriogenology 1992; 37:885-896.
Xu et al. Theriogenology 1996a; 45:745-755.
Xu et al. Theriogenology 1996b; 46:1325-1337.
Yoshida et al. Mol Reprod Dev 1992; 31:68-71.

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