ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 261-263

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MADURACION *IN VITRO* DE ÓVULOS DE CORDERAS PREPÚBERES

MARCO-JIMENEZ, F., VICENTE, J.S.

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Dep. Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, 46071 Valencia, España.
e-mail: framarj1@etsia.upv.es

INTRODUCCION

Los primeros trabajos sobre maduración *in vitro* en ovejas fueron desarrollados por Crosby (1969) quienes mostraron que la mayor tasa de óvulos metafases II se obtenían entre 25 y 27 horas de maduración. Los trabajos desarrollados con animales prepúberes han permitido obtener descendencia a partir de animales de 2 meses de edad (Lazzari *et. al,*1996), no observándose en la mayoría de los ellos ninguna diferencia en tasas de maduración *in vitro* entre animales prepúberes y adultos (Ledda *et. al,*1997; O'Brient *et. al,*1997; Earl *et. al,*1995,1996), pero sí alcanzando menor tasa de desarrollo hasta blastocistos en animales prepúberes *vs* adultos (Ledda *et. al,*1997; O'Brient *et. al,*1997).

Varios autores han descrito que la capacidad para reanudar y progresar la meiosis se alcanza progresivamente con el incremento del tamaño folicular (Moor & Trouson, 1997; caprino: De Smedt *et. al,*1994: bovino: Lonergan *et. al,*1994). Moor y Gandolfi (1987) indicaron que los ovocitos adquieren la capacidad de progresar hasta metafase I cuando alcanzan el 80% de su tamaño total, pero son incapaces de progresar hasta metafase II, mientras no se haya completado el crecimiento.

El objetivos planteado en este estudio fue analizar el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de ovejas prepúberes y determinar el tamaño medio de la población ovocitaria disponible para su uso en las diferentes técnicas de la biotecnología reproductiva (MIV,FIV, CIV).

MATERIAL Y MÉTODOS

EXPERIENCIA 1

Los ovarios utilizados fueron obtenidos de corderas sacrificadas en un matadero comercial, en su mayor parte de raza manchega con una edad aproximada de 3 meses. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en un recipiente isotérmo en un tiempo inferior a dos horas. La recuperación de los complejos *cumulus*-ovocito (COC) se realizó mediante la aspiración de folículos mayores de 1 mm. El líquido folicular junto con los COC´s se recogió en un tubo Falcon con PBS modificado por la adición de BSA, piruvato sódico, glucosa y gentamicina (PBSm) a 35ºC. El criterio empleado para definir los ovocitos de calidad óptima fue el descrito por Martino *et. al* (1994a,b;1995) para caprino. Tras la selección de los ovocitos y tres lavados en PBS fueron madurados en 500 µl de medio TCM199, suplementado con suero fetal bovino (FBS, 10%), factor de crecimiento epitelial (EGF, 10ηg/ml), hCG (1 UI), 17β-estradiol (1µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml). La maduración *in vitro* se realizó a 38,5ºC en una atmósfera del 5% de CO_2 en aire y saturada de humedad. Se tomó una muestra de ovocitos a las 0h, 22h, 24h, 26h, 28h y 30h de maduración *in vitro*, realizando tres replicas.

FIJACION DE OVOCITOS Y VALORACION

Una vez alcanzado los distintos tiempo de maduración, los COC's fueron transferidos a un eppendorf con citrato sódico (2%) y sometidos a agitación intensa durante 3 minutos en un vortex, con la finalidad de eliminar las células del *cumulus*. Una vez separadas, los óvulos fueron fijados en una solución con paraformaldehido, PBS y NaOH durante una hora y media. Una vez fijada la muestra, los ovocitos fueron tenidos con Hoechst 33342 durante 5 minutos.

La observación de los ovocitos se llevó a cabo en un microscópio de fluorescencia, equipado con una lampara de mercurio de 100 watios. La valoración se realizó observando la progresión meiótica y clasificando los óvulos en cuatro categorias; vesícula germinal (VG), metafase I (MI), metafase II (MII) y no identificados (ND).

EXPERIENCIA 2

Para definir la inmadurez de los óvulos recuperados, un grupo de óvulos inmaduros (n=100), fueron expuestos a una solución con citrato sódico (2%) y sometidos a agitación intensa para eliminar las células del *cumulus*. La medición se realizó mediante un ocular graduado (con una discriminación de 3,2 μm) en un microscópio invertido Leica a 100 aumentos.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante una Chi cuadrado (Statgraphics Plus 4.1).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la tabla 1 se muestra el porcentaje de los estadios nucleares obtenidos en diferentes horas de maduración *in vitro*.

Tabla 1. Progresión meiótica a diferentes horas de MIV tras tinción con Hoechst

		Estadio nuclear			
Horas MIV	**N**	**VG**	**MI**	**MII**	**ND**
0	18	**16** (88,9%)^{a}	0^{d}	0^{d}	2 (11,1%)
22	54	6 (11,1%)^{b}	**39** (72,22%)^{a}	2 (3,7%)^{c}	7 (12,9%)
24	56	8 (14,3%)^{b}	28 (50,0%)^{b}	10 (17,9%)^{b}	10 (17,8%)
26	49	6 (12,2%)^{b}	18 (36,7%)^{b,c}	**20** (40,8%)^{a}	5 (10,2%)
28	44	8 (18,2%)^{b}	14 (31,9%)^{c}	**16** (36,4%)^{a}	6 (13,6%)
30	37	3 (8,1%)^{b}	20 (54,1%)^{b}	10 (27,0%)^{a,b}	4 (10,8%)

^{a,b,c,d} Valores en la columna con diferente superíndice difieren estadísticamente (P<0.05)

El tiempo de maduración *in vitro* idóneo se produjo entre 26 y 28 horas de cultivo, tiempo que coincide con Crosby (1969), pero algo superior al empleado por Ledda *et. al* (1999) y Galli *et. al* (1991), quienes emplean 24 horas y O'Brien *et. al* (1997) con 22 horas. El porcentaje de ovocitos que llegaron hasta metafase II (40%) es inferior a lo mostrado por diferentes autores, debido posiblemente al tamaño folicular aspirado. Así, Moor y Trounson (1977) mostraron que los ovocitos derivados

de folículos menores de 2 mm no eran competentes para lograr el desarrollo meiotico, mientras que Ledda *et. al* (1999), con animales prepúberes, manifestaron que el porcentaje de metafases II, cuando se aspiran folcículos de más de 1mm, fue de un 80%, en cambio si los folículos eran menores a 1mm la progresión meiótica hasta metafase II descendió hasta un 27,2%. En nuestro caso cabe pensar que la discriminación del tamaño folicular no ha sido muy precisa, explicándose así el bajo porcentaje de metafases II obtenidos.

El diámetro medio de los óvulos recuperados fue de 152,9 ± 5,7 μm. Este diámetro está acorde con los datos obtenidos por Ledda *et. al* (1997) quienes mostraron que los ovocitos de las corderas prepúberes tenían diámetros inferiores a 141 ± 2.8 μm (animales de 30-40 días), mientras que los de animales adultos fueron de 158 ± 2.6 μm. Como ya se indico con anterioridad los animales empleados en este trabajo tenían edad de 3 meses.

En conclusión, la maduración *in vitro* de óvulos ovinos recuperados post-mortem a partir de corderas manchegas de 3 meses necesitaran entre 26 y 28 horas. Con el fin de utilizar estos óvulos para la valoración de la capacidad fecundante del semen de la raza ovina Guirra, en un próximo trabajo se estudiará el efecto de la vitrificación sobre el tiempo de maduración.

BIBLIOGRAFIA

- Calli C., Moor RM. (1991) Theriogenology 35 (1083-1093).
- Crosby (1969). M. Agr. Sc. Thesis, University College, Dublin.
- De Smedt V., Crozet N., Gall L. (1994). J. Exp. Zool. 269. 128-139.
- Earl C., Irvine B., Kelly J., Rowe J., Amstrong D. (1995). Theriogenology 43: 230.
- Earl C., Rowe J., Kelly J., Duby K .(1996) Proc 13Th Inter Congr. Anim. Reprod. 18.
- Lazzari G., Duchi R., Landriscina R., Colombo N., Galli C (1996). J. Reprod. Fert. (Abs) 41.
- Ledda S., Bogliolo L., Calvia P., Leoni G., Naitana S. (1997). J. Reprod. Fert. 109 (73-78).
- Ledda S., Bogliolo L., Giovanni L., Naitana S. (1999). Reprod. Nutr. Dev. 39. 503-508.
- Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M., Gordon I (1994). Mol. Reprod. Dev. 37: 48-53.
- Martino A., Mogas T., Palomo M., Paramio M (1994). Theriogenology 42: 859-873.
- Martino A., Mogas T., Palomo M., Paramio M (1995). Theriogenology 43: 473-485.
- Moor R., Gandolfi F. (1987). J. Reprod. Fert. Supplment 34: 55-69.
- Moor R and Trouson A. (1997). J. Reprod. Fert. 49:101-109.
- O'Brien JK., Catt SI., Ireland KA, Maxwell and Evans G. (1997). Theriogenology 47:1433-1443.