EFECTO DE LA PREMADURACIÓN CON ROSCOVITINA Y DE LA CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES CON IONOMICINA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES.

Jiménez-Macedo A.R. , Izquierdo D. , Urdaneta A. , Paramio MT.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados con ovocitos de cabras prepúberes han demostrado que aunque existe un porcentaje alto de maduración nuclear (Martino et al, 1994), las tasas de fecundación y desarrollo embrionario hasta blastocisto (Izquierdo et al., 1998) son menores que con ovocitos de cabras adultas. Las bajas tasas de fecundación pueden estar relacionadas con una deficiente capacitación del espermatozoide y el bajo desarrollo embrionario a una incompleta maduración citoplasmática. La premaduración consiste en mantener en cultivo los ovocitos parados en vesícula germinal (VG) permitiéndoles adquirir la maduración citoplasmática con el objetivo de incrementar el porcentaje de blastocistos. La roscovitina es una purina que inhibe específicamente la actividad kinasa del MPF manteniendo el ovocito en VG (Mermillod et al., 2000).Estudios recientes (Wang et al., 2002) han demostrado que en ovocitos de cabras prépuberes la capacitación de los espermatozoides con sustancias ionóforas incrementan significativamente las tasas de fecundación en comparación con la utilización de heparina, sustancia utilizada de forma rutinaria en los estudios de FIV en caprino (Younis et al, 1991).

El objetivo de este trabajo es el estudio de la inhibición de la meiosis con roscovitina y su efecto en la FIV y la utilización de ionomicina como capacitante de los espermatozoides caprinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cabras prepúberes (1 a 2 meses) se recogieron de un matadero. Los ovocitos se obtuvieron por slicing y se seleccionaron según el aspecto de las células del cúmulus (COC). La premaduración se realizó según Mermillod et al (2000) en TCM-199 con diferentes concentraciones de roscovitina 0, 12.5 and 25 μM, durante 24 horas a 38.5 °C. Inmediatamente después, una muestra de ovocitos se tiñe para analizar su estado nuclear y el resto de los ovocitos se pasan al medio de maduración (MIV) durante otras 27 horas. En los grupos control los ovocitos son exclusivamente sometidos a la MIV. La fecundación se realizó con semen fresco, seleccionando los espermatozoides mas mótiles por swim-up durante 1 hora al 5% CO2 y a 38.5º C. El sobrenadante se centrifugó a 500 rpm durante 8 minutos. El pellet se diluyó 1:1 en mDM (Younis et al, 1991) formando dos grupos según las sustancias capacitantes utilizadas: a) mDM con 200nM de ionomicina y 10 de μg/ml heparina incubado durante 15 minutos en 5% CO2 a 38.5ºC y b) mDM con 50 μg/ml de heparina incubado durante 45 minutos en 5% CO2 y 38.5ºC. Después de 24 horas de coincubación con los espermatozoides, los ovocitos se cultivaron durante 7 días en medio SOF con suero fetal bovino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se indican los resultados de bloqueo de la meiosis durante la premaduración con roscovitina y su reinicio durante la MIV. La roscovitina no ha bloqueado la meiosis en ovocitos de cabras prepúberes, contrariamente a lo observado con ovocitos de vacas (Mermillod et al., 2000) y cerdas (Krischek y Meinecke, 2001). Después de la MIV se observa que los ovocitos del grupo control han alcanzado el estado de MII significativamente más que los grupos cultivados durante 51 horas.
En el cuadro 2 se observan los resultados de FIV de los distintos grupos analizados. Comparando los grupos control: Ionomicina vs.heparina se observa que el grupo de ionomicina presenta mayores porcentajes de fecundación total y normal que el grupo heparina. La premaduración con roscovitina no ha afectado el porcentaje de fecundación total ni el porcentaje de fecundación normal (ovocitos con 2PN) en relación a sus respectivos grupo control, indicando que ovocitos cultivados durante 51 h no han sufrido

efectos degenerativos en comparación con los ovocitos cultivados durante 27 h previo a la fecundación.

Cuadro1. Efecto de la premaduración con Roscovitina (ROS) sobre la inhibición de la meiosis y sus consecuencias sobre la maduración in vitro de los ovocitos de cabras prepúberes

	PREMADURACIÓN					MADURACIÓN				
Tratamiento	N° total ovocitos	VG (%)	VGBD (%)	MI (%)	MII (%)	N° total ovocitos	VG (%)	VGBD (%)	MI (%)	MII (%)
Control	120	8 (6.6)	5 (4.1)	50 (41.7)	56 (46.7)	121 124	1 (0.8) 2 (1.6)	2 (1.6) 2 (1.6)	28 (23.1) 49 (39.5)	90 (74.4)a 68 (54.8)b
ROS 0 μM + MIV	119	9 (7.5)	4 (3.4)	47 (39.5)	59 (49.6)	136	6 (4.6)	6 (4.6)	39 (28.7)	85 (62.5)b
ROS12'5μM + MIV	130	17 (13.1)	3 (2.3)	54 (41.5)	56 (43.1)	125	12 (9.6)	18 (14.4)	31 (24.8)	65 (52.0)b
ROS 25μM +MIV										

Cuadro 2. Efecto de la premaduración con roscovitina de los ovocitos de cabras prepúbers y el tratamiento de capacitación de los espermatozoides sobre la fecundación in vitro.

TRATAMIENTO	N° total Ovocitos inseminados	2PN (%)	PS (%)	ASINC (%)	Total Fecundados (%)
Control Iono +Hep	73	33 (45.2)a	6 (8.2)	3 (4.1)	42 (57.5)a
ROS 0 μM + iono + hep	67	23 (34.3)acd	5 (7.4)	9 (14.9)	37 (55.2)a
ROS 12' 5 μM +iono + hep	64	25 (39.2)ac	7 (10.9)	1 (1.6)	33 (51.6)a
ROS 25 μM +iono + hep	76	36 (47.4)a	9 (11.8)	3 (3.9)	48 (63.1)a
Control Hep	69	17 (24.6)bc	2 (2.9)	0	19 (27.5)b
ROS 0 μM + hep	66	16 (24.2)b	13 (19.6)	3 (4.5)	32 (48.5)ac
ROS 12' 5 μM + hep	70	13 (18.6)b	4 (5.7)	0	17 (24.3)b
ROS 25 μM + hep	76	19 (25. 0)bd	3 (3.9)	5 (6.6)	27 (35.5)bc

El cuadro 3 representa los resultados de desarrollo embrionario después de 7 días de cultivo in vitro. El porcentaje de embriones obtenidos a las 48 h de cultivo es significativamente mayor en los grupos inseminados con semen tratado con ionomicina que los inseminados con heparina. La roscovitina (12 y 25) ha influido negativamente sobre la producción de embriones en relación a los grupos control, sin embargo el grupo 0 de roscovitina con 51 h de maduración no ha afectado el porcentaje de embriones producidos en relación a los grupos control (27h de MIV). El porcentaje de mórulas y blastocistos obtenidos no ha estado afectado ni por el tratamiento de premaduración ni

por el tratamiento de capacitación del semen lo que indica las deficiencias citoplasmáticas de los ovocitos de hembras prepúberes para poder desarrollarse hasta blastocisto. Nuevos estudios son necesarios para determinar las características moleculares de estos ovocitos con el objeto de diseñar las condiciones de cultivo adecuadas que permitan su desarrollo a blastocistos viables.

Cuadro 3. Efecto de la premaduración con roscovitina y el tratamiento de capacitación de los espermatozoides sobre el desarrollo embrionario de los ovocitos de cabras prepúbers

TRATAMIENTO	Ovocitos inseminados	48h (%)	2-7 cels (%)	8-16 cels (%)	Mórula (%)	blastocisto
Control Iono +Hep	112	45 (40.2)a	46 (41. 1)	7 (6.0)	1 (0. 8)	
ROS 0 μM + iono + hep	170	56 (32.9)ad	84 (49.4)	9 (5. 3)	0	0
ROS 12'5 μM +iono + hep	169	47 (27.8)cd	66 (39. 0)	5 (2.9)	0	0
ROS 25 μM +iono + hep	178	56 (31.5)a	68 (38.2)	13 (7. 3)	1 (0. 5)	0
Control Hep	114	21 (18.4)b	27 (23.7)	3 (2. 6)	1 (0. 9)	0
ROS 0 μM + hep	113	26 (23.0)bd	27 (17. 8)	2	0	0
ROS 12' 5 μM + hep	181	31 (17.1)b	38 (20.9)	1 (0. 5)	0	0
ROS 25 μM + hep	167	27 (16.2)b	35 (20.9)	2 (1. 2)	1 (0.6)	0

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Izquierdo D, Villamediana P, Palomo MJ, Mogas, Paramio MT. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. Theriogenology 49: 1501-1513
2. Krischek y Meinecke 2001. Roscovitine,a specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases,reversibly inhibits chromatin condensation during in vitro maduration of porcine oocytes.Zygote 9:309-316
3. Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 41:969-980
4. Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. 2000. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. Molecular reproduction and development 55: 89-95
5. Wang B, Baldassarre H, Tao T, Gauthier M, Neveu N, Zhou JF, Leduc M, Duguay F,Bilodeau AS, Lazaris A, KeeferC, Karatzas CN. 2002. Transgenic goats by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes. Molecular reproduction and development. 63: 437-443
6. Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brakett BG. 1991. In vitro fertilization of goat oocytes. Biol. Reprod 44: 1177-1182