ITEA (2005), Vol. **Extra N.º 26.** Tomo I, 392-394

PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES CAPRINOS MEDIANTE LA TÉCNICA ICSI (INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES).

Ana Raquel Jiménez-Macedo, Begoña Anguita, Dolors Izquierdo,
Maria Teresa Paramio
Dpto. Ciència Animal i dels aliments. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona)

INTRODUCCIÓN

La inyección intracitoplasmática de espermatoides (ICSI) es utilizada como una técnica alternativa a la FIV. Desde que en 1997, Uehara y Yanagimachi obtuvieran nacimientos de hámster mediante ICSI, se han descrito nacimientos a partir de ICSI en otras especies domésticas (vacas: Keefer y col, 1990, cerdo: Kolbe y Holtz, 1999, oveja: Gómez y col, 1998 y caballo: Alm y col, 2001). Para la producción de un embrión mediante ICSI es necesario que, una vez inyectado el espermatozoide, el ovocito se active iniciando la mitosis que dará lugar al embrión. En ciertas especies, como en la cerda y en el hámster, la propia estimulación mecánica de la inyección es suficiente por sí misma para activar al ovocito (Kim y col, 1999). En cambio, en especies como la vaca se necesita de la ayuda de una activación química del ovocito para iniciar la división embrionaria (Keefer y col, 1990). En el caprino, se han obtenido blastocistos mediante ICSI utilizando semen congelado y sin activación química (Keskintepe y col, 1997). Wang y col (2003), consiguieron el nacimiento de cabritos utilizando para la ICSI un sistema de pipetas *piezo-drill* (pulsos repetidos sobre el ovocito). En ambos grupos los ovocitos provenían de cabras adultas.

Debido al escaso porcentaje de ovocitos fecundados mediante FIV, la ICSI puede mejorar los resultados de producción in vitro de embriones al permitir la fecundación de todos los ovocitos.

El objetivo de este estudio es comparar los resultados de producción de embriones utilizando ovocitos de cabras prepúberes mediante 3 formas distintas de fecundación: a) sistema convencional de FIV, b) Utilización de ICSI más estimulación química de los ovocitos mediante ionomicina y DMAP, siguiendo el protocolo en vacuno de Ongeri y col (2001) y c) utilización de ICSI sin activación química pero realizando una capacitación del espermatozoide inyectado más fuerte mediante la combinación de heparina e ionomicina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes (1 a 2 meses) de un matadero. Los ovocitos se obtuvieron por *slicing* y se seleccionaron según el aspecto de las células del cúmulus (COC) y la homogeneidad del citoplasma. Los ovocitos maduraron en medio TMC199 más hormonas, suero y cistemina (Rodríguez y col, 2003) y se incubaron en un 5% CO2 en aire a 38.5º C durante 27 horas. La fecundación se realizó con semen fresco, seleccionando los espermatozoides más mótiles por *swim-up* durante 1 hora. El sobrenadante se centrifugó a 500 rpm durante 8 minutos y el pellet se diluyó 1:1 en mDM (Younis y col, 1991) y la solución de capacitación.

Una vez madurados, los ovocitos se separaron en tres grupos:

a) Grupo FIV: los ovocitos se inseminaron con espermatozoides capacitados con una solución de 50 μg/ml de heparina en mDM durante 45 minutos a una concentración de 4.10^6 spz/ml .

b) Grupo ICSI + activación: previamente a la ICSI los espermatozoides se capacitaron en una solución de 50 μg/ml de heparina en mDM durante 45 minutos. Los ovocitos se denudaron y fueron colocados individualmente en gotas de 5μl de medio TALP. Los espermatozoides, una vez capacitados se colocaron en gotas de5 μl de PBS con un 10% de PVP y se les rompió la cola por golpe con la pipeta de inyección y se absorbieron por la cola. Se colocó el ovocito con el corpúsculo polar a las 12 o a las 6 sujeto con la pipeta de mantenimiento y se inyectó un espermatozoide por las 3. Posteriormente se incubaron los ovocitos en 5 μM de ionomicina en TCM199 con 10 % FBS durante 5 minutos y después en 2 mM 6-DMAP en TCM199 con 10% FBS durante 4 h (Ongeri y col, 2001).
c) Grupo ICSI: previamente a la ICSI los espermatozoides se capacitaron con 200nM de ionomicina y 10 μg/ml de heparina durante 15 minutos (Wang y col, 2002). Los ovocitos fueron denudados y fecundados por ICSI.

Todos los ovocitos se colocaron después en medio de FIV (TALP: Parrish y col, 1986) y se incubaron después durante 24 horas. Los supuestos embriones se cultivaron durante 192 horas en medio SOF con suero fetal bovino al 1% en un 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2 a 38.5ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados del estadio nuclear de los ovocitos a las 17 horas de cultivo en medio de FIV.

Los porcentajes obtenidos de 2PN son significativamente mayores cuando se fecundaron por ICSI respecto a los FIV (40 y 37.2 vs 25.2% respectivamente). Cuando en la ICSI hubo activación, el porcentaje de fecundación anormal (1PN) fue significativamente mayor que en la FIV (14.3 vs. 0.4% respectivamente). Éstos son resultados que cabrían esperar, ya que con la técnica de ICSI, al inyectar directamente el espermatozoide en el citoplasma del ovocito, se saltan todos los pasos y reacciones de penetración del espermatozoide que podrían comprometer la fecundación en la FIV. Además, para realizar la ICSI se seleccionan únicamente los ovocitos con el primer corpúsculo polar, es decir, los que han madurado correctamente, aumentando la probabilidad de ser fecundados.

Tabla 1. Análisis del estadio nuclear de ovocitos de cabra prepúber a las 17 horas post-inseminación/ inyección/ activación.

	N	*2PN*	*1PN*	*3PN*
FIV	270	68 (25.2)b	1 (0.4)b	11 (4.1)
ICSI+I+DMAP	70	28 (40.0)a	10 (14.3)a	2 (2.8)
ICSI	94	35 (37.2)a	6 (6.4)ab	3 (3.2)

a,b Valores con diferentes letras tienen resultados estadísticamente significativos (P< 0.05).

En la tabla 2 se muestran los resultados de desarrollo de los embriones para los tres tratamientos estudiados.

Se han obtenido unos porcentajes de división a las 48 hpi mayores en los dos grupos fecundados por ICSI respecto a los de FIV (ICSI+I+DMAP: 70.1, ICSI: 54.6

vs. FIV: 27.3%). Nuestros resultados en los dos grupos de ICSI y de FIV son similares a los que obtiene Keskintepe y col (1997) con cabras adultas.

Al contrario que con cabras adultas (Keskintepe y col, 1997), no se han obtenido resultados de desarrollo embrionario avanzado para el grupo de ICSI+I+DMAP. En cambio, el grupo de ICSI con espermatozoides capacitados con ionomicina, tiene un porcentaje de mórulas y blastocistos significativamente mayor que los de FIV (13.4 vs. 5.2%, respectivamente). Estos resultados de división concuerdan con los que se obtuvieron de fecundación a las 17hpi. En cuanto al grupo ICSI+I+DMAP, se observa un porcentaje de división muy alto (70.1%) pero sin llegar a obtener mórulas. Este resultado podría explicarse porque parte de los ovocitos podrían estar activados partenogenéticamente.

Tabla 2. Análisis del desarrollo embrionario de ovocitos de cabra prepúber a las 192 horas de cultivo en medio de SOF.

	N	*Divididos 48h*	*2-7 Cels*	*8-16 Cels*	*Morula+ Blastocisto*
FIV	271	74 (27.3)c	38 (14.0)c	22 (8.1)b	14 (5.2)b
ICSI+I+DMAP	144	101 (70.1)a	77 (53.5)a	24 (16.7)a	
ICSI	97	53 (54.6)b	23 (23.7)b	17 (17.5)a	13 (13.4)a

a,b,c Valores con diferentes letras tienen resultados estadísticamente significativos ($P< 0.05$).

Según los resultados obtenidos en los tres experimentos realizados en este trabajo, podemos concluir que el protocolo de ICSI más idóneo para ovocitos de cabra prepúber es el realizado con espermatozoides capacitados con la combinación de ionomicina y heparina sin activación química adicional posterior a la ICSI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alm H, et al. 2001. Theriogenology 56: 817-829.
2. Gómez MC, et al. 1998. Theriogenology 49: 1143-1154.
3. Keefer CL, et al. 1990. Mol Reprod Dev 25: 265-276.
4. Keskintepe L, et al. 1997. Zygote 5, 261-265.
5. Kim N, et al. 1999. Mol Repr Dev 53:84-91.
6. Kolbe T, y Holtz. 1999.Theriogenology 52: 671-682.
7. Ongeri EM, et al. 2001. Theriogenology 55: 1933-1945.
8. Parrish JJ, et al. 1986. Theriogenology 25: 591-600.
9. Rodriguez E, et al. 2003. Reprod Nutr Dev 43:179-187
10. Uehara T, et al. 1977. Biol Reprod 16: 315-321
11. Wang B, et al. 2002. Mol Repr Dev. 63: 437-443.
12. Wang B, et al 2003. Zygote. 2003 Aug;11(3):219-27
13. Younis AI, et al. 1991. Biol Reprod 44: 1177-1182.