EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACTIVINA-A EN EL MEDIO DE MADURACIÓN Y DEL CULTIVO *IN VITRO* SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PIVE EN OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Hammami, S., Morató, R., Catalá, M.G., Paramio, M.T. y Izquierdo, D.
Dpt. Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona). Dolors.Izquierdo@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, distintos grupos de investigación se han centrado en el perfeccionamiento de cada una de las técnicas implicadas en la Producción *In Vitro* de Embriones (PIVE), usando ovocitos de hembras adultas o prepúberes, con el fin de mejorar la técnica, acercar y reproducir *in vitro* los mecanismos fisiológicos que rigen la función reproductiva. Sin embargo, los ovocitos de hembras prepúberes presentan un menor desarrollo embrionario que los procedentes de hembras adultas. *In vivo,* el ambiente folicular proporciona un entorno óptimo para la maduración del ovocito y su preparación para la fecundación después de la ovulación (Armstrong y Webb., 1997).

En los estudios de PIVE, se han utilizado muchas sustancias promotoras del crecimiento para suplementar el medio de cultivo como por ejemplo gonadotropinas, esteroides y factores de crecimiento (Lonergan et al., 2008). La activina-A, un complejo proteico de la superfamilia de proteínas TGF-β (Mather et al., 1997), añadida al medio de maduración *in vitro* en varias especies como la bovina (Izadyar et al., 1996; Silva y Knigh.,1998), humana (Alak et al., 1998) o porcina (Coskun et al., 1994), se ha visto que incrementa el reinicio de la meiosis de los Complejos Ovocitos Células del Cúmulus (COCs) y su posterior desarrollo embrionario. Por otra parte, la adición de activina-A al medio de cultivo *in vitro* ayuda a mejorar el porcentaje de blastocistos bovinos (Trigal et al., 2011). En cabras adultas se ha identificado la activina-A y sus receptores en los ovocitos y en las células del cúmulus en diferentes fases de desarrollo folicular (Silva et al., 2004).

Como en nuestro laboratorio utilizamos ovocitos de cabras prepúberes, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la suplementación de los medios de maduración *in vitro* (MIV) y cultivo *in vitro* (CIV) con 10 ng/ml de activina-A mejoraba la producción de embriones y la calidad de los blastocistos obtenidos a partir de ovocitos procedentes de cabras prepúberes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cabras prepúberes (aproximadamente de 2 meses de edad) fueron recogidos en un matadero comercial de Barcelona y transportados al laboratorio en PBS (P-4417, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 38 ºC en un contenedor isotérmico. Una vez en el laboratorio, se seleccionaron los ovarios con mejor desarrollo folicular y se desecharon los que presentaban formaciones quísticas o una morfología anormal. Los (COCs) se obtuvieron mediante el método de *slicing* de los folículos utilizando una hoja de bisturí en una placa de petri que contenía medio TCM-199 (M-2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL $NaHCO_3$ (S-3817) y 5 μL/mL de gentamicina (G1272). Se seleccionaron los COCs con más de tres capas compactas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo y se pusieron a madurar durante 24 h en grupos de 25-30 COCs en dos medios de maduración: (a) medio convencional de maduración (MC) (TCM199 (SIGMA-M4530) suplementado con 275 μg/mL de piruvato sódico (SIGMA, P-3662), 50 μg/mL de gentamicina (SIGMA, G1272), 146 μg/mL de L-glutamina (SIGMA, G-5763), 10% de DBS (suero de donante bovino), 10 µg/mL FSH, 10 µg/mL LH, 1 µg/mL 17β-estradiol y 100 µM cisteamina (SIGMA, M9768), y (b) MC + 10 ng/mL activina-A (R&D Systems; Minneapolis, MN, EEUU).Transcurrido el tiempo de maduración los ovocitos se lavaron tres veces en medio TALP y se transfirieron a microgotas de 100 μL del mismo medio al cual se añadió semen fresco capacitado con heparina (concentración final: $4x10^6$ espermatozoides/mL) y se co-cultivaron a 38,5ºC y una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Tras 24 h de co-incubación de los gametos, los presuntos cigotos (10 presuntos cigotos/microgota de 20 µL) se pusieron a cultivar durante 8 días en medio SOF (Takahashi y First., 1992), suplementado o no con 10 ng/mL activina-A, a 38,5 ºC y en una atmósfera con un 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 y saturada de humedad. Así, los 4

grupos experimentales de este trabajo fueron **1) A0A0:** COCs madurados en MC y cultivados en SOF; **2) A0A10**: COCs madurados en MC y cultivados en SOF+10 ng/mL activina-A; **3) A10A0**: COCs madurados en MC+10 ng/mL activina-A y cultivados en SOF; y **4) A10A10:** COCs madurados en MC+10 ng/mL activina-A y cultivados en SOF+10 ng/mL activina-A. Al final del proceso se valoró el desarrollo embrionario mediante la observación en el microscopio estereoscópico y los blastocistos fueron teñidos con la técnica de tinción diferencial (tinción de células de la masa celular interna (ICM) y del trofectodermo (TE)) descrita por Thouas et al. (2001) y observados mediante un microscopio de fluorescencia. Los datos sobre la tasa de división y el desarrollo embrionario hasta blastocisto de cada uno de los grupos experimentales fueron comparados mediante ANOVA usando el procedimiento de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados de división embrionaria y desarrollo hasta el estadio de blastocisto. El porcentaje de división embrionaria fue similar entre los 4 grupos experimentales. En cuanto a la tasa de producción de blastocistos con respecto a los ovocitos puestos a fecundar, fue significativamente más alta en el grupo de ovocitos MIV en ausencia de activina-A pero CIV en su presencia (A0A10) que en el grupo control (A0A0) (18,71% vs 12,58%, $P<0.05$). En bovino, Trigal et al. (2011) obtuvieron resultados similares de desarrollo hasta blastocisto, ya que observaron un incremento significativo en la tasa de producción de blastocistos al cultivar a los embriones en presencia de activina-A a partir del 3er día de cultivo.

Respecto al número de células de los blastocistos (Tabla 2), éste no se vio afectado por la presencia de activina-A, ya que se encontró una proporción similar de células del TE y de la ICM en los blastocistos de los 4 grupos experimentales. Resultados similares se han descrito en blastocistos bovinos producidos en presencia o no de activina-A (Yoshioka et al., 1998; Trigal et al., 2011).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la adición de 10 ng/mL de activina-A durante el cultivo *in vitro* de los embriones favorece el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Armstrong, D.G.& Webb. R. 1997.Rev. Reprod. 2: 139-146. •Lonergan, P. & Fair, T. 2008. Theriogenology. 69(1): 17-22. •Mather, J.P., Moore, A., Li, R.H. 1997. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 215(3). •Izadyar, F., Zeinstra E., Colenbrander B., Vanderstichele H. & Bevers M. 1996. Anim. Reprod. Sci. 45(1-2): 37-45. •Silva, C. & Knight, P. 1998. Biol. Reprod. 58(2): 558-65. •Alak, B., Coskun, S., Friedman, C., Kennard, E., Kim, M. & Seifer, D.1998. Fertil. Steril. 70(6): 1126-30. •Coskun, S. & Lin Y. 1994. Mol. Reprod. Dev. 38(2): 153-9 •Trigal, B., Gomez, E., Diez, C., Caamano, J.N., Martín, D., Carrocera, S. & Muñoz, M. 2011. Theriogenology. 75(3): 584-8. •Silva, J., Van den Hurk, R., Van Tol, H., Roelen, B. & Figueiredo, J.J. 2004. Endocrinol. 183(2):405-15. •Takahashi, Y, & First, N.L. 1992. Theriogenology. 37(5):963-78. •Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M. & Trounson, A.O. 2001. Reprod Biomed Online: 3(1):25-29. •Yoshioka, K., Suzuki, C. & Iwamura, S. 1998. Biol. Reprod: 59(5):1017-22.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2007-60227-CO2-01 y la beca doctoral del programa MAEC-AECID concedida para Sondes Hammami.

Tabla 1. *Resultados de desarrollo embrionario en presencia de 10 ng/mL activina-A durante la MIV de ovocitos de cabras prepúberes y/o el CIV.*

Grupo	N (COCs)	Div/N (%)	Blastocistos N(%)			
			Dia 7*	Dia 8*	Dia 9*	Dia 9**
A0A0	296	151 (51,01)	10 (06,62)	15 (09,93)	19 (12,58) [a]	19 (06,42) [a]
A0A10	283	155 (54,77)	16 (10,32)	22 (14,19)	29 (18,71) [b]	29 (10,25) [b]
A10A0	267	141 (52,81)	10 (07,09)	16 (11,35)	20 (14,18) [ab]	20 (07,49) [a]
A10A10	287	147 (51,22)	13 (08,84)	17 (11,56)	21 (14,28) [ab]	21 (07,32) [a]

N(COCs): nº de complejos ovocito-cúmulus puestos a MIV; Div/N (%): porcentaje de división a las 48 hpi. * Porcentaje de blastocistos respecto a los cigotos.** Porcentaje de blastocistos respecto a los COCs puestos a FIV. [a,b]:P<0,05

Tabla 2. *Número de células de la masa celular interna (MCI) y del trofectodermo (TE) de blastocistos producidos en presencia de 10 ng/mL activina-A durante la MIV de ovocitos de cabras prepúberes y/o el CIV.*

Grupo	No. Blastocistos teñidos	No. de células (media+ESM)			ICM:TE (%)
		Total	TE	ICM	
A0A0	9	72,4±2,69	50,8±2,29	21,7±0,53	0,43±0,01
A0A10	14	79,0±3,76	56,5±2,76	22,5±1,41	0,40±0,02
A10A0	8	76,7±3,68	54,6±2,68	22,1±1,41	0,41±0,02
A10A10	10	73,8±6,25	52,0±4,42	21,8±1,92	0,42±0,01

TE: trofectodermo ICM: masa celular interna ESM: error estándar de la media.

EFFECT OF ACTIVIN-A DURING IVM AND IVC OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES ON BLASTOCYST RATE AND QUALITY

ABSTRACT: The aim was to evaluate the effect of activin-A added to the IVM and IVC media on cleavage rate, embryo development and blastocysts quality of oocytes from prepubertal goat. COCs were randomly allocated into four groups: (1) A0A0: COCs matured in IVM medium and cultured in SOF medium; (2) A0A10: COCs matured in IVM medium and cultured in SOF medium+10ng/mL activin-A; (3) A10A0: COCs matured in IVM medium+10ng/mL activin-A and cultured in SOF medium; and (4) A10A10: COCs matured in IVM medium + 10ng/mL activin-A and cultured in SOF medium+10ng/mL activin-A. Cleavage rate was recorded at 48hpi and blastocysts yield at Days 7, 8 and 9 pi. In order to assess the quality of blastocysts obtained from the treatment groups, cell number and the cellular composition of Day 8 pi blastocysts were evaluated by differential staining of ICM and TE. The cleavage rate did not show differences between treatments, however, blastocysts yield improved with the addition of activin-A. The highest blastocyst rate (18.7%) was obtained when activin-A was added only in IVC medium (A0A10). No differences in blastocyst mean cell number were detected among groups. In conclusion, the presence of activin-A during IVC improves developmental competence of prepubertal goat oocytes.

Keywords: *in vitro* maturation, *in vitro* culture, Inner cell mass, trophoectoderm