

TÉCNICAS DE FERTILIZACIÓN IN-VITRO DE OOCITOS DE OVINOS

Technics for *in-vitro* fertilization of ovine ovocytes.

Rumualdo González

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad del Zulia
Maracaibo - Venezuela.

RESUMEN

Oocitos recolectados directamente de ovarios de ovejas sacrificadas o por aspiración de folículos a través de endoscopia de animales vivos son madurados *in-vitro* (MIV) en medio de cultivo celular TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y la adición de gonadotropinas (LH 5 $\mu\text{g/ml}$, FSH 2,5 $\mu\text{g/ml}$), y estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$), bajo atmósfera aire-5% CO_2 , alta humedad y temperatura de 39°C durante 24 h. Después de la remoción del cúmulo celular los oocitos madurados son inseminados con espermatozoides capacitados *in-vitro* provenientes de semen fresco o congelado en pellets, seguido de un período de incubación para la fertilización *in-vitro* (FIV) de 15 a 18 h bajo condiciones similares a la MIV. Los cigotes obtenidos son cultivados *in-vitro* (CIV) para su desarrollo utilizando medio TCM-199 suplementado con 10% de SFP y células epiteliales de oviducto. Igualmente, un medio sintético de oviducto modificado (SOFM) y suplementado con 20% de suero humano (SH) inactivado es también utilizado para la CIV. Recientes investigaciones reportan valores promedios de 85%, 55% y 25% de tasa de MIV, FIV y CIV respectivamente de oocitos de ovejas y que finalmente logran desarrollarse hasta la fase de blastocisto. Más recientemente una alta tasa de 81% de embriones de una célula lograron desarrollarse hasta la fase de blastocisto bajo condiciones *in-vitro* empleando el medio SOF-SH.

Palabras claves: Fertilización *in-vitro*, oocitos, ovinos.

ABSTRACT

Collected oocytes from ovaries of slaughtered ovine or endoscopic aspiration of follicles in live are madurated *in-vitro* (MIV) in TCM-199 medium supplemented with 10% bovine fetal serum (SFB) plus addition of gonadotropins (LH, 5 $\mu\text{g/ml}$ FSH 2.5 $\mu\text{g/ml}$ and estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$) under 5% CO_2 -air atmosphere, high humidity and 39°C temperature during 24 hr. After removal of the cellular cumulus from maturated oocytes insemination

with *in-vitro* capacitated sperm from fresh or frozen in pellets semen followed by an incubation period of 15 to 18 h under similar conditions of MIV was performed. The formed cygotes are cultivated *in-vitro* (CIV) for their development using TCM-199 medium supplemented with 10% SFB and oviductal epithelial cells. Oviductal modified synthetic medium (SOFM) supplemented with 20% inactivated human serum (SH) is also used for CIV. Early research have reported mean figures of 85%, 55% and 25% of MIV, FIV and CIV respectively of ovine ovocytes which develop to the blastocyst phase. More recently, a high development rate of 81% was reported with embryos from one cell to blastocyst under *in-vitro* conditions using SOF-SH medium.

Key words: *in-vitro* fertilization, ovocytes, ovine.

INTRODUCCION

Los recientes avances en la tecnología del trasplante de embriones han permitido un importante progreso genético al incrementar la descendencia de las hembras superiores. Aún cuando la técnica ha alcanzado una importante etapa de aplicación todavía existen problemas por superar como es producir embriones en una mayor escala comercial.

La fertilización *in-vitro* (FIV) de oocitos es otra técnica que podría ofrecer una nueva alternativa para obtener embriones destinados a los programas de trasplante y/o investigación.

Aún cuando la FIV fue ensayada en animales mamíferos desde hace más de una centuria, los primeros resultados exitosos de preñez y nacimiento fueron logrados en conejos con oocitos ovulados y fertilizados *in-vitro* [1].

Posteriormente oocitos foliculares de conejos fueron madurados y fertilizados *in-vitro*, resultando también en preñeces [2] en ratones [3], humanos [4] y ovejas [5,6].

Las resultados iniciales de FIV de oocitos de ovinos fueron poco exitosos [7], reportándose cuatro de 78 óvulos fertilizados *in-vitro* con espermatozoides recolectados del útero de ovejas previa inseminación. Utilizando también espermatozoides capacitados en el útero se reportaron cuatro de 23 oocitos fertili-

zados [8], lográndose una tasa de 14% de fertilización *in-vitro* utilizando espermatozoides capacitados *in-vitro* [9]. Estos autores, suplementado con proteínas para soportar la penetración de los espermias lograron un 28% de tasa de FIV [10].

Los éxitos de desarrollo de embriones de ovinos fertilizados *in-vitro* hasta la etapa de mórula o blastocisto habían sido muy limitados, hasta que se logró el desarrollo *in-vitro* de embriones de 6-8 células producidas por la FIV [1]. Más posteriormente se reporta una alta tasa de segmentación (65%) y de estado de mórula (35%) cuando embriones de una sola célula producidas por FIV fueron co-cultivadas en presencia de células epiteliales de oviductos de ovejas [11]. El cultivo con estas células estimula al embrión a desarrollarse impidiendo el bloqueo de la segmentación que regularmente ocurre en los embriones de ovinos cuando alcanzan el desarrollo de 8 células. El mecanismo de co-cultivo que estimula la continuidad del desarrollo del embrión no es conocido. Probablemente, las células epiteliales de oviducto secretan algún factor indispensable para el desarrollo embrionario. Los efectos de estas células sobre los embriones son relativamente específicos. Dicho efecto también ha sido demostrado en el co-cultivo con vesículas trofoblásticas [12]. Recientemente investigaciones han demostrado resultados satisfactorios del medio sintético de oviducto (SOF) suplementado con 20% de suero humano, en el desarrollo *in-vitro* de embriones de ovinos en ausencia del co-cultivo [14,15].

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

1. Recolección de oocitos. Los ovarios de hembras sacrificadas en matadero constituyen una fuente de oocitos. Los ovarios, son trasladados a laboratorio en solución salina fosfato buffersalina (PBS) tibia (30-35%). Los folículos de 0-5 mm de diámetro son aspirados con una jeringa de 5 ml y aguja calibre 18 g x 1". El fluido folicular es depositado en una placa de petri para la identificación y selección microscópica de aquellos oocitos rodeados de un cumulus celular compacto.

En el animal vivo, los oocitos son obtenidos mediante laparoscopia por aspiración de folículos inmaduros o folículos desarrollados luego del tratamiento superovulatorio.

2. Maduración *in-vitro* de oocitos. Los oocitos inmaduros son depositados en microgotas (5µl) de medio de cultivo TCM-199, suplementado con 10%(v/v) de suero fetal inactivado (56°C/30 min), gonadotropinas: (5µg LH/ml, 2.5µg FSH/ml y estradiol 17B (1µg/µl). Células de la granulosa son igualmente adicionadas en una concentración de 5 10 células/ml.

Los oocitos depositados en microgotas (50 µl) de medio de maduración son madurados durante 24-26 horas a 39°C bajo una atmósfera de aire-5% CO₂ y alta humedad (95%).

3. Capacitación de Espermatozoides. El semen fresco, es lavado tres veces (1000 g/4 min) con medio de PBS y luego resuspendido en medio TCM 199 + 20% (v/v) de suero de ove-

ja colectado el segundo día después del estro e inactivado (pH 7.8.9) ajustando a una concentración de 2 x 10 espermias/ml.

La suspensión de espermias es incubada a 20°C por 30-40 min siendo finalmente llevada a una concentración 1 x 10 células/ml. Otros medios básicos son también empleados, como el medio Brackett bufferizado con 10 mM Hepes conteniendo 4.16 mM de bicarbonato de sodio, 122 mM NaCl y 2.25 mM CaCl₂, suplementado con 20% de semen de oveja. Semen congelado en pellets ha proporcionado resultados similares de FIV.

4. Inseminación de oocitos. Después del cultivo, el cumulus expandido alrededor de los oocitos fue removido por pipeteo y lavado en medio PBS. Un total de 10-20 oocitos fueron colocados con la suspensión de espermias e incubados juntos 15-18 h a 39°C bajo humedad controlada y atmósfera condicionada (5% CO₂ en aire).

5. Cultivo *in-vitro* de cigotes. Después de la fertilización, los cigotes cultivados *in-vitro* (CIV) en medio de TCM-199 suplementado con 10% SFB y monocapas (co-cultivo) de células epiteliales de oviducto (CEO) bajo condiciones de laboratorio similar que la MIV. El medio es reemplazado cada 48 horas durante el período del cultivo de 5-6 días. El cultivo de cigotes en fluido sintético de oviducto (SOF), conteniendo 20% de suero humano (SH) y en ausencia de CEO, resultó igualmente efectivo en el desarrollo embrionario hasta la fase blastocisto [13, 14, 15].

DISCUSION

Aún cuando existen numerosos trabajos sobre MIV, FIV y CIV de oocitos de bovinos, los pocos estudios llevados a cabo en la especie ovina, han sido lo suficientemente destacados que han permitido alcanzar resultados satisfactorios y equiparables con los registrados en bovino. Recientemente, han sido reportados valores de 85%, 55% y 25% de tasa de MIV, FIV y CIV de oocitos que finalmente lograron alcanzar la fase de blastocisto bajo condiciones de laboratorio. Igualmente amerita destacar los trabajos recientes de Walker y col [14], quienes lograron una alta tasa (81%) de desarrollo de embriones de una sola célula hasta la fase de blastocisto mediante CIV, empleando únicamente el medio SOF-SH. Las ovejas por su menor costo de inversión y mantenimiento así como por tener una gestación más corta que los bovinos, están siendo mayormente utilizadas en los centros o estaciones experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chang, M.C. Fertilization of rabbit ova *in-vitro* Nature (London) 184:466. 1959.
- [2] Brackett, B.G., Mammalian fertilization *in-vitro* Fed. Proc. 32:2065. 1973.

- [3] Cross, P.C., Brinster, R.L. *In-vitro* development of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 3:298. 1970.
- [4] Steptoe, P.L., Edwards, R.G. Reimplantation of human embryo with subsequent pregnancy. *Lancet* 1:80. 1976.
- [5] Cran, D.G., Drott, H.M., Hay, M.F., Moor, R.M., Trounson A.O. Atresic follicles *in vivo* and *in-vitro*. *Proc. Soc. Study Fertility*, Sheffield, England. 1976.
- [6] Moor, R.M., Trounson, A.D. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in-vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.* 49:101. 1977.
- [7] Thibault, C.M., Dautier, L. Analyse des conditions de la fécondation *in-vitro* de l'oeuf de la lapine. *Ann Biol. Anim. Biochim, Biophys.* 1:277. 1961.
- [8] Kraemer, D.C. A study *in-vitro* fertilization and culture of ovine ova. *Diss Abstr* 27:285. 1966.
- [9] Bondioli, K.R., Wright, R.W. Jr. Influence of culture media on *in-vitro* fertilization of ovine tubal oocytes. *J. Anim. Sci.* 51:660. 1980.
- [10] Bondioli, K.R., Wright, R.W. Jr. *In-vitro* fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. *J. Anim. Sci.* 57:4. 1983.
- [11] Fukui, Y., Glew, A.M., Galdolfi, F., Moor, R.M. *In-vitro* culture of sheep oocytes matured and fertilized *in-vitro*. *Theriogenology*, 29:287. 1988.
- [12] Heyman, Y., Menezes, Y., Chesné, P., Camous, S., Garnier, V. *In-vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:1. 1987.
- [13] Walker, S.K., Quinn, P., Ashman, R.J., Smith, D.H., Seamrek, R.F. Protein supplementation for the culture of one-cell embryos of sheep. *Prod. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 18:9. 1986.
- [14] Walker, S.K., Seamrek, R.F., Quinn, P., Warmes, R.J., Ashman, R. J. Smith D.H., Ancell, P. Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium. In: *Proc. 11th. Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.* 26-30 June, Dublin. 4:483. 1988.
- [15] Thompson, I.G., Simpson, A.G., Pugh, P.A., Tervit, H.R. *In-vitro* development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum or human serum albumin. *Anim. Reprod. Sc.* 29:61. 1992.