

DOI: 10.2436/20.1501.02.64

Biologia de la reproducció
(Mercè Durfort i Francesca Vidal, ed.)

Treballs de la SCB. Vol. 59 (2008) 151-163

PRODUCCIÓ *IN VIVO* VERSUS *IN VITRO* D'EMBRIONS CAPRINS

MARÍA TERESA PARAMIO I DOLORS IZQUIERDO

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: María Teresa Paramio. Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, edifici V. 08193 Bellaterra. Adreça electrònica: teresa.paramio@uab.es.

RESUM

Les tecnologies per a la reproducció assistida, com són la inseminació artificial i l'ovulació múltiple i la posterior transferència embrionària (MOET), s'han utilitzat en el cabrum per incrementar l'eficiència reproductiva dels mascles i accelerar el guany genètic de les femelles. No obstant això, el MOET presenta una sèrie de limitacions a causa de: *a*) variabilitat en la resposta de les femelles al tractament hormonal, *b*) fecundacions fallides i *c*) regressió prematura dels cossos lútics. La producció *in vitro* d'embrions (PIVE) permet superar les limitacions de la tecnologia MOET. La PIVE involucra tres processos: la maduració *in vitro* dels oòcits, la fecundació *in vitro* amb espermatozoides capacitats i el cultiu *in vitro* dels embrions fins a l'estadi de blastocist, moment en què poden ser transferits a cabres receptores o crioconservats per a futurs usos. A més, la recuperació d'oòcits de femelles vives selectes mitjançant laparoscòpia i la reproducció de femelles prepúbères permeten una elevada difusió de les cabres d'alt valor. Així, la PIVE en el cabrum és una font excel·lent i de baix cost d'embrions, que es podran utilitzar tant per a la recerca bàsica en la biologia del desenvolupament com per a aplicacions comercials per produir transgènics i clònics.

Paraules clau: cabrum, inseminació artificial, MOET, PIVE, prepúber.

IN VIVO VERSUS *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION IN GOATS

SUMMARY

Assisted reproductive technologies (ART) such as artificial insemination (AI) and multiple ovulation and embryo transfer (MOET) have been used to increase reproductive efficiency and accelerate genetic gain in male and females, respectively. The current limitations of MOET are due to: i) female variability response to hormonal treatment, ii) fertilization failures and iii) premature regression of *corpora luteum*. The *in vitro* produc-

tion (IVP) of embryos offers the possibility of overcoming MOET limitations. The method of IVP of embryos involves three main steps: *in vitro* maturation of oocytes (IVM), *in vitro* fertilization of oocytes (IVF) with capacitated sperm and *in vitro* culture (IVC) of embryos until blastocyst stage that can be transferred to recipient females or cryopreserved for future use. Recovering oocytes from live selected females by laparoscopic ovum pick-up (LOPU), and breeding prepubertal females by juvenile *in vitro* embryo technology (JIVET) will allow a high diffusion of valuable goats. Also, IVP of goat embryos will provide an excellent source of low cost.

Key words: goat, artificial insemination, MOET, IVP, prepubertal.

INTRODUCCIÓ

El desenvolupament en el cabrum de les tecnologies per alterar o manipular el material genètic i, així, millorar l'estructura genètica dels animals, necessita les metodologies que permeten produir embrions tant *in vivo*, mitjançant l'ovulació múltiple i la transferència embrionària (*multioovulation embryo transfer*, MOET), com *in vitro* (PIVE). Fins ara, la tècnica reproductiva més utilitzada per accelerar el guany genètic ha estat la inseminació artificial (IA). No obstant això, encara que la tècnica MOET no pot substituir la IA, si s'escullen correctament les femelles utilitzades, aquesta tècnica permet obtenir un guany genètic extra, via materna, que s'afegeix al dels mascles utilitzats per a la IA.

Respecte a la producció *in vitro* d'embrions (PIVE), en el cabrum aquesta metodologia és important, tant pel que fa a la producció animal clàssica com en la producció de noves biotecnologies, ja que:

a) La PIVE permet incrementar significativament la producció d'embrions a partir de femelles d'alt valor genètic i, a més, els oòcits poden ser recuperats de femelles prepubèrs, prenyades o, fins i tot, mortes.

b) És una font excel·lent i barata d'oòcits i d'embrions per a la recerca bàsica, la realització d'estudis biotecnològics (transferència nuclear, transgènesi, sexatge, cèl·lules mare...) i per a qualsevol tipus de recerca

que necessiti un gran nombre d'embrions per ser manipulats.

c) A més, la PIVE és utilitzada com una estratègia per recuperar races o, fins i tot, espècies d'animals en perill d'extinció mitjançant la transferència interespecífica d'embrions.

D'altra banda, la crioconservació d'embrions permet el moviment i la comercialització del germoplasma de cabrum, i fa més segur el moviment mundial de bestiar.

PRODUCCIÓ *IN VIVO* D'EMBRIONS

La producció *in vivo* d'embrions ja fa força anys que s'estudia. No obstant això, els resultats encara no són conclouents, ja que hi ha una gran variabilitat tant en els tractaments hormonals com en la resposta de les cabres a aquests, i també problemes, com errades en la fecundació i la regressió prematura dels cossos lúts, que s'han de resoldre (Cognie *et al.*, 2003). Els protocols tradicionals de superestimulació impliquen un tractament perllongat (de dotze a divuit dies) amb progestàgens i, quan manquen d'un a tres dies per acabar aquest tractament, l'administració de dues dosis diàries de FSH durant tres o quatre dies, normalment en dosis decreixents. Aquests tractaments proporcionen de mitjana entre vuit i setze ovulacions, encara que la variabilitat individual és immensa (revisat per Holtz,

2005). D'altra banda, s'han realitzat alguns estudis per reduir la laboriositat d'aquests protocols durant el període d'aplicació de la FSH. Així, Pintado *et al.* (1998) no han obtingut diferències entre els resultats obtinguts en subministrar sis dosis de FSH i els obtinguts quan se substitueixen les últimes tres dosis de FSH per una dosi única de 200 IU de gonadotrofina coriònica equina (eCG).

Quan es realitza la inseminació a temps fix o es volen recollir oòcits o embrions en un estadi de desenvolupament determinat, és important que l'ovulació es produeixi en un moment concret. Això es pot aconseguir administrant a la femella LH, gonadotrofina coriònica humana (hCG) o un agonista de la GnRH. Normalment 12 h després de retirar l'esponja de progestàgens s'administra GnRH i 24 h després 3 mg de LH. No obstant això, per a la superovulació de les cabres, Baril *et al.* (1996) van observar que la GnRH no és eficient per sincronitzar l'ovulació, tret que l'administració vagi precedida d'un tractament previ amb un antagonista de la GnRH. L'antagonista suprimeix temporalment l'alliberació de la FSH i la LH i, així, prevé l'aparició d'un fol·licle dominant. Gonzalez-Bulnes *et al.* (2004), injectant antagonistes de la GnRH, van observar una disminució del creixement dels fol·licles dominants associada a un augment del doble en el nombre de fol·licles més petits. La presència d'un fol·licle molt gran al començament del protocol tradicional d'estimulació sembla que contribueix a la gran variabilitat dels resultats obtinguts amb els programes MOET en el cabrum. Algunes estratègies s'han centrat en el començament del tractament superovulatori, moment en què comença una ona de creixement i no existeix un fol·licle dominant. Rubianes i Menchaca (2003) recomanen iniciar el tractament de superovulació concomitant amb l'emergència de la primera ona de creixement fol·licular després de l'ovulació (dia 0).

Just després de l'ovulació, emergeix la primera ona de creixement i hi ha una cohort homogènia de petits fol·licles en creixement. Així, en el dia 0 del protocol, s'iniciaria el tractament amb FSH coincidint amb l'emergència de l'ona de creixement 1. Aquest protocol ha proporcionat majors taxes d'ovulació i d'embrions que el protocol tradicional (Menchaca *et al.*, 2007). Finalment, l'èxit de la fecundació no depèn únicament de la sincronització de l'ovulació sinó també del protocol d'inseminació. La inseminació es realitza entre 40 i 50 h després de la retirada del tractament amb progestàgens. Quan s'utilitza semen fresc aquesta es realitza en el cèrvix via vaginal, mentre que si s'usa semen congelat, aquest es diposita dins l'úter mitjançant laparoscòpia.

Respecte a la recollida dels embrions, es pot realitzar via laparotomia 6-8 dies després de la inseminació, rentant les banyes uterines amb medi per poder recuperar-los. Aquest procés permet fer de dues a tres recollides per cabra, ja que és freqüent l'aparició d'adherències a causa de la intervenció. La recuperació d'embrions via laparoscòpia és menys invasiva però comporta l'anestèsia total de l'animal i necessita un equipament sofisticat i una pràctica considerable de la tècnica. No obstant això, si s'utilitza aquesta via per realitzar la recuperació dels embrions les cabres es poden utilitzar com a donants fins a set vegades (Baril *et al.*, 1996). Quan la recollida es realitza utilitzant un catèter rígid via cervical, 24 h abans de la recuperació es tracten les cabres amb una dosi luteolítica de prostaglandina $F_{2\alpha}$ per facilitar la contractilitat uterina en el moment del rentatge uterí o *flushing*. Seguint el protocol descrit per Sohnrey i Holtz (2000), utilitzant aquest sistema de recollida es poden recuperar entre un 60 i un 80 % dels embrions existents.

Resumint, en el cabrum, quan s'aplica un programa MOET amb èxit es pot aconseguir

una mitjana de sis a vuit embrions transferibles per donant (Baril *et al.*, 1993; Cownie, 1999; Cownie *et al.*, 2003). No obstant això, aquests resultats depenen de molts factors, incloent-hi el tipus de cria, l'edat i la nutrició de la femella, que proporcionen una elevada variabilitat en els resultats. Així, el nombre d'embrions transferibles es troba en un rang molt ampli que va de zero a trenta embrions per donant, amb un 25-50 % de les femelles en què no es recupera cap embrió a causa de problemes en la fecundació o una regressió precoç dels cossos lútics.

PRODUCCIÓ *IN VITRO* D'EMBRIONS (PIVE)

La PIVE inclou tres processos principals, com són: la maduració *in vitro* dels oòcits (MIV), la fecundació *in vitro* dels oòcits (FIV) amb espermatozoides capacitats i el cultiu *in vitro* (CIV) dels embrions fins a l'estadi de blastocist, etapa en la qual poden ser transferits a femelles receptores o criocconservats per a usos futurs.

Recollida dels oòcits

La recollida d'oòcits de bona qualitat és el primer pas per a la PIVE. Els mètodes utilitzats en el cabrum són:

a) Recollida d'oòcits a partir de femelles d'escorxador: en aquest cas els oòcits són recuperats dels fol·licles per aspiració, *slicing* (talls repetits a la superfície de l'ovari fets amb una fulla de bisturí) o després de fer dissecció fol·licular. Quan els ovaris provenen de cabres adultes, els oòcits normalment es recuperen aspirant, amb una agulla de 18 a 20 g, el contingut dels fol·licles amb un diàmetre superior als 3 mm. En el cas dels ovaris de cabretes prepúbères s'ha vist que la tècnica utilitzada per a la reco-

llida dels oòcits afecta tant la quantitat com la qualitat dels oòcits obtinguts (Martino *et al.*, 1994b). Així, la tècnica que proporciona un major nombre d'oòcits per ovari és el *slicing* (6,05), seguida de la dissecció fol·licular (1,71) i de l'aspiració (1,27). No obstant això, els oòcits recuperats per *slicing* conformen una població molt heterogènia i els resultats de fecundació que proporcionen són inferiors als produïts pels oòcits recuperats després de realitzar la dissecció dels fol·licles (Martino *et al.*, 1994b). De totes maneres, com que la dissecció és una tècnica que comporta una gran despesa de temps i l'aspiració és difícil, ja que els ovaris de cabretes són tous i fràgils i la majoria del seus fol·licles fan menys de 2 mm de grandària, la tècnica d'elecció per recuperar els oòcits dels ovaris de cabres prepúbères és el *slicing*.

b) Oòcits recuperats de cabres vives: en aquest cas els oòcits són aspirats dels fol·licles després d'exterioritzar els ovaris mitjançant una laparotomia o via laparoscòpia (*laparoscopic ovum pick up*, LOPU). Per poder aconseguir un major nombre d'oòcits, prèviament a la recollida se sincronitzen els zels de les cabres donants i s'estimulen amb gonadotrofines. La sincronització de zels normalment es realitza utilitzant esponges intravaginals impregnades amb 30 mg d'acetat de fluorogestona, que es col·locaran durant deu dies abans de la recollida, i l'administració de 125 µg de cloprostenol dos dies abans de la retirada de l'esponja. Per a l'estimulació ovàrica nosaltres utilitzem 125 UI de pFSH en quatre dosis decreixents administrades a intervals de 12 h. L'última injecció de pFSH s'administra 20 h abans de la retirada de l'esponja. Les esponges són retirades en el moment de la recollida dels oòcits. Baldassarre i Karatzas (2004) utilitzen un tractament d'estimulació amb una única injecció de 80 NIH-FSH-P1 i 300 IU d'eCG 36 h abans de realitzar la LOPU. En

cabres prepúbbers, com és lògic, no es realitza el tractament de sincronització de zels i per promoure l'estimulació del creixement fol·licular s'utilitza el mateix tractament que en les adultes, però les dosis hormonals s'ajusten al pes viu de les femelles. Koman *et al.* (2003) van observar que el nombre d'òcits recuperats a partir d'ovaris de cabres prepúbbers era major que en les adultes i els resultats depenien del nombre de sessions de recollida realitzades.

En els petits remugants, l'ús de la laparotomia per a la recollida dels òcits està sent progressivament substituït per la laparoscòpia, ja que aquesta tècnica és relativament simple i eficient. Aquest procés és més ràpid, menys costós i pot ser realitzat diverses vegades en el mateix animal sense les complicacions que té la laparotomia. En cabres superestimulades (Baldassarre i Karatzas, 2004), la laparoscòpia proporciona taxes de recuperació (òcits/fol·licles) entre el 75 i el 85 % i el seu rendiment mitjà és de 13,5 òcits per animal. El major problema d'aquesta tècnica, si es compara amb la recollida mitjançant laparotomia, és la pèrdua d'un major nombre de capes de cèl·lules del cúmulus, ja que, quan els òcits són aspirats, aquests han de passar a través d'un tub conductor fins a arribar al tub de recollida.

L'aspiració transvaginal guiada per ultrasonografia (*transvaginal ultrasound-guided aspiration*, TUGA) és una alternativa pràctica i segura a la recollida quirúrgica d'òcits. Aquesta tècnica és utilitzada rutinàriament en les dones i el boví. La seva aplicació en el cabrum ha estat detalladament descrita per Graff *et al.* (1999), encara que no és una tècnica molt estesa.

Efecte de la grandària del fol·licle i de l'òcit

Diversos estudis en diferents espècies han conclòs que el diàmetre oocitari és directament proporcional al diàmetre del fol·licle. L'increment dels diàmetres fol·licular i oocitari milloren el desenvolupament embrionari (revisat per Gandolfi *et al.*, 2005). En cabres adultes, Crozet *et al.* (1995) van obtenir diferències significatives en el percentatge de blastocists obtinguts a partir d'òcits recuperats de fol·licles de 2-3 mm (6 %), de fol·licles de 3,1-5 mm (12 %), de fol·licles de més de 5 mm (26 %) i d'òcits ovulats (41 %). En les cabretes prepúbbers la majoria dels òcits provenen de fol·licles entre 2 i 3 mm. En el nostre laboratori hem estudiat la relació entre el diàmetre fol·licular i la competència oocitària i hem observat que en cabres prepúbbers, quan els òcits provenen de fol·licles de menys de 3 mm, el percentatge de blastocists és del 3,85 %, mentre que quan els òcits provenen de fol·licles de més de 3 mm aquest percentatge augmenta fins al 18,5 %. Com ja s'ha indicat anteriorment, en els ovaris de cabres prepúbbers és difícil recuperar els òcits mitjançant l'aspiració dels fol·licles, i per això aquesta recuperació es realitza fent *slicing* als ovaris i, posteriorment, els òcits són seleccionats segons el seu diàmetre i la morfologia del cúmulus que l'envolta. Així, hem realitzat un estudi per definir quin és el diàmetre oocitari mínim per obtenir el major percentatge de desenvolupament embrionari i hem obtingut que, quan la fecundació es realitza mitjançant el protocol de FIV convencional, els òcits amb una mida superior a les 135 µm proporcionen un percentatge de blastocists significativament superior als òcits de grandària compresa entre 125 i 135 µm (12,5 % i 1,95 %, respectivament) (Anguita *et al.*, 2007). No obstant això, quan els òcits es fecunden per ICSI, les diferències

de desenvolupament entre aquestes dues categories d'òcits desapareixen, i s'obté un 11,1 % de blastocists a partir dels òcits majors de 135 μm i un 15,9 % amb els òcits entre 125 i 135 μm de grandària (Jimenez-Macedo *et al.*, 2006).

Edat de la cabra donant

Diversos estudis han observat que els òcits procedents de femelles prepúbères proporcionen embrions amb una menor competència per al desenvolupament que els òcits de femelles adultes (revisat per Armstrong, 2001). Aquest fet també ha estat descrit en el cabrum i, encara que no s'han observat diferències en els nivells de maduració nuclear entre els òcits de cabretes prepúbères i els d'adultes (Martino *et al.*, 1994a), sí que els resultats de desenvolupament obtinguts amb els òcits d'adults són superiors als obtinguts quan aquests són de prepúbères. Així, utilitzant òcits de cabres adultes, Cognie *et al.* (2003) han obtingut un 36 % de blastocists, Crozet *et al.* (1995) un 26 % i Keskintepe *et al.* (1998) un 32 %, mentre que quan els òcits procedeixen de cabretes prepúbères aquest desenvolupament s'ha vist dràsticament disminuït fins a un 10 % en obtenir els òcits de cabretes de dos mesos d'edat sacrificades a l'escorxador (Izquierdo *et al.*, 2002), o d'un 8 % quan els òcits van ser recuperats per LOPU de cabretes de 2-5 mesos estimulades hormonalment (Koeman *et al.*, 2003). A més, Baldassarre i Karatzas (2004) van fer un estudi comparant els òcits de cabres adultes amb els de prepúbères, en ambdós casos recuperats mitjançant la tècnica de LOPU després d'un tractament d'estimulació fol·licular, i en aquest estudi els òcits d'adults van proporcionar nivells significativament superiors de producció d'embrions i de gestacions.

Com ja s'ha indicat en l'apartat anterior, l'equip de Crozet (1995) ha suggerit que només una petita proporció dels òcits recuperats dels fol·licles amb 2-3 mm de diàmetre poden suportar el desenvolupament embrionari, ja que la capacitat de l'òcit de completar la maduració citoplasmàtica es desenvolupa més enllà de l'adquisició de la competència meiótica. Així, ells han vist que la producció de blastocists era del voltant del 6 % quan els òcits de cabres adultes procedeixen de fol·licles de 2-3 mm de diàmetre. En els ovaris de les cabres prepúbères (Martino *et al.*, 1994a), el nombre de fol·licles amb un diàmetre major de 3 mm és d'1,1 per ovari i pràcticament no existeixen fol·licles de més de 5 mm de grandària.

En conclusió, no sabem si el baix desenvolupament embrionari obtingut amb els òcits procedents de cabres prepúbères és degut a les condicions fisiològiques d'aquestes femelles o si és la conseqüència del petit nombre d'òcits recuperats de fol·licles de més de 3 mm. En el nostre laboratori hem realitzat estudis en què es comparen els òcits de les cabres prepúbères amb els de les adultes i hem observat que els procedents de les prepúbères presenten una disminució en la formació del pronucli masculí (Mogas *et al.*, 1997b) i proporcionen nivells més elevats tant de zigots haploides (Villamediana *et al.*, 2001) com de poliploides, a causa de fecundacions polispermiques (Mogas *et al.*, 1997b). A més, el patró de distribució dels grànuls corticals (Velilla *et al.*, 2004) i dels mitocondris (Velilla *et al.*, 2006) és diferent entre ambdós tipus d'òcits. D'altra banda, l'addició de compostos tiols als medis de maduració *in vitro* (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003b) i de fecundació *in vitro* (Urdaneta *et al.*, 2004) han fet disminuir les anomalies en la fecundació i han millorat la formació del pronucli masculí i la producció d'embrions a partir dels òcits de les prepúbères.

Maduració *in vitro* dels oòcits

El desenvolupament embrionari està influït pels esdeveniments que succeeixen durant la maduració de l'oòcit. Perquè la MIV tingui èxit és necessari que l'oòcit maduri tant en el nucli com en el citoplasma. Normalment els oòcits de cabrum es maduren en medi TCM-199 tamponat, al qual s'afegeixen 146 µg/ml de L-glutamina, 275 µM de piruvat sòdic, 100 µM de cisteamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10 % de sèrum fetal boví (FCS), 10 µg/ml de LH, 10 µg/ml de FSH i 1 µg/ml 17β d'estradiol. En aquestes condicions, el percentatge d'oòcits de cabrum que maduren nuclearment és elevat, i s'aconsegueix que entre el 70 i el 90 % arribin a l'estadi de metafase II.

Amb els oòcits de cabres prepúbères, l'addició de gonadotrofines (FSH i LH) i de 17β d'estradiol al medi de maduració millora els nivells de maduració i de divisió embrionària (Mogas *et al.*, 1997a). A més, normalment s'afegeix un 10-20 % de sèrum desactivat amb calor (56 °C durant 30 min) als medis de MIV. El sèrum proporciona nutrients a les cèl·lules del complex cúmulus-oòcit (COC) i prevé l'enduriment de la zona pellúcida. En el cabrum, molts laboratoris utilitzen rutinàriament sèrum de cabra en zel (EGS) i sèrum d'ovella en zel (ESS) (Cognie *et al.*, 2003). No obstant això, Tajik i Esfandabadi (2003) van comparar l'efecte de diversos tipus de sèrum i no van trobar diferències entre els resultats obtinguts en utilitzar EGS, ESS i FCS. En el nostre laboratori també hem comparat l'efecte de l'EGS (recuperat en diferents moments de l'estre), de l'FCS i del sèrum de mascle boví castrat (SS), i no hem trobat diferències significatives ni pel que fa a la maduració ni quant a la producció d'embrions. D'altra banda, s'ha descrit que l'addició al medi de maduració de fluid fol·licular (FF) procedent de fol·licles no atrèsics majors de 4 mm propor-

ciona bons resultats. No obstant això, tant el sèrum de femella en zel com el fluid fol·licular s'han de provar abans d'integrar-los en el protocol de PIVE, ja que ambdós productes s'han de preparar al laboratori i existeixen grans variacions entre la composició i l'efecte de les diferents mostres. Així, nosaltres utilitzem FCS i SS, ja que aquests sèrums es troben comercialment i són químicament més homogenis que els sèrums de femella en zel i l'FF.

L'addició de diferents components del grup dels tiols (cistina, cisteïna, cisteamina, glutatió, β-mercaptoetanol) al medi de MIV incrementa la concentració intracitoplasmàtica de glutatió (GSH), protegeix les cèl·lules de l'estrès oxidatiu i millora la formació del pronucli masculí i la posterior producció d'embrions. En el cabrum, Zhou *et al.* (2008) han trobat una acció sinèrgica entre la cisteamina, la cistina i les cèl·lules del cúmulus, ja que la presència d'aquests tiols en el medi de MIV d'oòcits denudats de femelles adultes fa que aquests presentin nivells de GSH i una capacitat de desenvolupament similars als oòcits envoltats pel cúmulus, és a dir, no denudats. En el cas dels oòcits de cabres prepúbères, la cisteamina és el tiol que s'utilitza en la PIVE, ja que és el que proporciona el major increment del nivell de GSH intracel·lular (Rodríguez-González *et al.*, 2003b). Així, l'addició de 100 µM de cisteamina al medi de maduració millora la producció d'embrions, tant quan els oòcits provenen de cabres prepúbères (Rodríguez-González *et al.*, 2003a; Urdaneta *et al.*, 2003) com d'adultes (Cognie *et al.*, 2003).

Respecte a les condicions de cultiu en la MIV, els oòcits de cabrum es mantenen durant 27 h a 38,5 °C en una atmosfera d'un 5 % de CO₂ en aire i saturada d'humitat. Si la durada del cultiu és de 24 h en lloc de les 27 h, la proporció d'oòcits que arriba a la metafase II disminueix (Rho *et al.*, 2001).

Fecundació *in vitro*

Abans de la fecundació s'han de preparar les ejaculacions de boc per poder inseminar els oòcits. Així, el primer pas que s'ha de realitzar, tant si s'utilitza semen fresc com descongelat, és la selecció dels espermatozoides més mòbils i viables. Per a això, les principals tècniques utilitzades són: el *swim-up* i la centrifugació en un gradient de densitat de Percoll o de Ficoll. Quan es comparen aquestes tres tècniques de selecció, el *swim-up* és la que proporciona una major quantitat d'espermatozoides mòbils, encara que no s'han obtingut diferències pel que fa a la penetració oocitària i a la divisió en seleccionar els espermatozoides d'ejaculacions fresques amb aquestes tres tècniques (Palomo *et al.*, 1999). No obstant això, la tècnica de selecció convencionalment utilitzada quan s'usa semen congelat-descongelat és la centrifugació del semen en un gradient discontinu de Percoll (45-90 %) durant 10 min a 500 g i a temperatura ambient.

El segon pas és la capacitat dels espermatozoides. En aquesta etapa s'intenten provocar en l'espermatozoide els canvis morfològics i bioquímics que es produeixen en el tracte genital femení. Així, després de seleccionar els espermatozoides més mòbils i viables, aquests es poden capacitar posant-los en un medi amb heparina o amb sèrum de femella en zel (20 % en el semen fresc i 2 % en el descongelat). Segons Cognie *et al.* (2003), els espermatozoides descongelats de boc es poden capacitar en medi SOF amb un 10 % (*v/v*) de sèrum d'ovella en zel i 0,5 µg/ml d'heparina, en el qual restaran durant 1 h.

En el nostre laboratori, després de seleccionar els espermatozoides mòbils de les ejaculacions fresques de boc mitjançant la tècnica de *swim-up*, es recuperen els sobrenedants dels tubs i se centrifuguen a 170 g durant tres minuts. Després, el sediment es

resuspèn en medi mDM (1:1 *v/v*) amb heparina (50 µg/ml de concentració final) i s'incuba durant 45 min en una atmosfera amb un 5 % de CO₂ en aire i humitat màxima a 38,5 °C. Transcorregut aquest temps, i coincidint amb la finalització de les 27 h de la MIV, els oòcits són transferits en grups de 20-25 a gotes de 100 µl de medi Tyrode modificat (TALP, Parrish *et al.*, 1986) al qual s'ha afegit 1 µg/ml d'hipotaurina i 0,3 mg/ml de glutatió. Llavors es procedeix a inseminar la gota amb els espermatozoides capacitats, que es trobaran a una concentració final de 3 × 10⁶ espermatozoides/ml (Urdaneta *et al.*, 2004). Amb oòcits de cabres adultes, Cognie *et al.* (2003) utilitzen una concentració final d'1 × 10⁶ espermatozoides/ml. Normalment la durada de la coïncubació dels gàmetes és de 24 h, ja que coïncubacions més curtes redueixen els nivells de fecundació (Mogas *et al.*, 1997b).

Respecte als medis de FIV, nosaltres hem provat diferents combinacions de medis per a la capacitat dels espermatozoides i la fecundació dels oòcits i els millors resultats els hem obtingut utilitzant medi DM per a la capacitat i TALP per a la fecundació (Izquierdo *et al.*, 1999). Els laboratoris que treballen amb oòcits de cabrum utilitzen diversos medis de FIV, com per exemple el medi BO (Crozet *et al.*, 1995; Ongeri *et al.*, 2001), el SOF (Rho *et al.*, 2001) i el TALP-fert (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002). D'altra banda, encara que la presència d'heparina en el medi de FIV millora la producció d'embrions, diversos estudis han observat que el desenvolupament embrionari i el percentatge de gestacions es veu disminuït a causa, possiblement, d'un increment en la taxa de fecundacions polispermiques (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2004; Poulin *et al.*, 1996). En conclusió, l'heparina és un bon agent capacitant dels espermatozoides però és necessari definir-ne la concentració i el temps d'incu-

bació per a cada mascle per evitar la polispermia.

Injecció intracitoplasmàtica de l'espermatozoide (ICSI)

Aquesta tècnica s'ha introduït com una alternativa a la FIV convencional. En la reproducció assistida dels animals, una de les principals aplicacions de la ICSI és la de garantir la producció d'animals, tant salvatges com domèstics, a partir dels gàmetes d'individus d'important valor genètic. A més, la ICSI es pot utilitzar per a la producció d'animals transgènics usant l'espermatozoide com a vector, i per fecundar oòcits amb espermatozoides immòbils i, fins i tot, liofilitzats. El 2003 Wang *et al.* van publicar el naixement del primer cabrit concebut mitjançant una ICSI. En el nostre laboratori el protocol d'ICSI utilitzat és el següent (Jimenez-Macedo *et al.*, 2006, 2005): es col·loca un oòcit MIV, en el qual hem observat el primer corpuscle polar, en una gota de 5 ml de medi d'injecció (TCM 199) cobert d'oli mineral. S'afegeix un petit volum (1 µl) d'espermatozoides en suspensió a una gota de 5 ml de medi amb un 10 % de polivinilpirrolidona (PVP); llavors, s'immobilitza un espermatozoide per la cua mitjançant la pipeta d'injecció i s'aspira per injectar-lo posteriorment, amb un mínim volum de medi (< 5 pl), dins de l'ooplasma i com més allunyat possible de la localització del corpuscle polar. El diàmetre de la pipeta de subjecció ha de ser de 20 a 30 mm i el de la d'injecció de 7 a 9 mm. Quan l'espermatozoide utilitzat prové d'una ejaculació fresca i ha estat capacitat amb heparina hem vist que després de realitzar la ICSI és necessari activar l'oòcit posant-lo durant 5 min en medi TCM199 amb 5 mM de ionomicina i un 10 % de FBS, i després 4 h en medi TCM199 amb 2 mM 6-DMAP i un 10 % de

FBS. No obstant això, aquesta activació no és necessària quan els espermatozoides es capaciten amb heparina i ionomicina (concentració final de 10 µM i 200 nM, respectivament) i així s'evita la producció d'embrions partenogenètics. El percentatge de blastocists obtinguts utilitzant aquesta tècnica amb els oòcits de cabres prepúbères ha estat del 16 %, mentre que amb oòcits de cabres adultes Keskintepe *et al.* (1997) han obtingut un 18 % i Wang *et al.* (2003) un 32 % de blastocists.

Cultiu *in vitro* dels embrions

Quan els embrions de cabrum es cultiven *in vitro* en els medis de cultiu tradicionals, molts aturen el seu desenvolupament en l'estadi de 8-16 cèl·lules, període en el qual es produeix l'activació del genoma embrionari. Per prevenir aquest bloqueig se solen afegir cèl·lules o sèrum al medi de cultiu. En el cabrum, els presumptes zigots se solen passar al medi de cultiu a les 24 h de la inseminació (FIV o ICSI).

El tipus d'atmosfera utilitzada condicionarà el sistema de cultiu emprat, i així, quan el cultiu es realitza en aerobiosi (5 % CO₂ en aire) és important la presència de cèl·lules somàtiques, mentre que si aquest és anaeròbic (atmosfera amb un 5 % CO₂, 5 % O₂ i un 90 % N₂ o amb percentatges similars) aquestes ja no són necessàries.

Respecte a l'ús de cèl·lules en el medi de cultiu, la presència de cèl·lules de la granulosa en el medi de cultiu millora el desenvolupament dels embrions de cabrum si comparem els resultats amb els obtinguts en cultivar-los en medi sol. No obstant això, per cocultivar embrions de cabrum és millor utilitzar cèl·lules de l'epiteli de l'oviducte (CEO) que cèl·lules de la granulosa (Izquierdo *et al.*, 1999). A més, aquest efecte positiu de les CEO sobre el desenvolupament dels

embrions de cabra no és específic d'espècie, ja que no s'han trobat diferències entre l'ús de CEO de cabrum i bovins (Izquierdo *et al.*, 1999) i entre les CEO de cabrum i les de búfal (Yadav *et al.*, 1998). D'altra banda, s'han obtingut percentatges de blastocists similars a partir d'oòcits de cabres adultes i de prepúbbers quan ambdós tipus d'embrions es cocultiven amb CEO de cabrum (Izquierdo *et al.*, 2002). Respecte als oòcits de cabres adultes, amb embrions cultivats en un ambient aeròbic, Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2004) han obtingut una producció de blastocists del 37 % en cocultivar els embrions en medi B₂ amb CEO de femelles no sincronitzades i Pawshe *et al.* (1996) un 40 % de blastocists utilitzant medi TCM199 amb CEO, insulina, transferrina, seleni i EGF.

De totes maneres, la presència de cèl·lules somàtiques en el medi de CIV és una important font de contaminació i proporciona resultats no previsibles a causa del desconeixement de l'estat fisiològic de les cèl·lules. Així, actualment la majoria de laboratoris cultiven els embrions de cabrum en condicions anaeròbiques. Els medis més utilitzats poden ser seqüencials, com els medis G1.2/G2.2 (Jimenez-Macedo *et al.*, 2005; Koeman *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) o un únic medi durant tot el període de cultiu, com per exemple el medi SOF (Anguita *et al.*, 2007; Cognie *et al.*, 2003; Jimenez-Macedo *et al.*, 2006; Keskinetepe i Brackett, 1996; Rodriguez-Dorta *et al.*, 2007) i el TCM199 (Izquierdo *et al.*, 1999). Rodriguez-Dorta *et al.* (2007) han obtingut un major percentatge de blastocists en cultivar embrions de cabrum en medi SOF (28 %) que en cocultivar els embrions amb CEO (20 %). No obstant això, després de vitrificar ambdós tipus d'embrions, els que havien estat cocultivats amb CEO van proporcionar nivells significativament superiors de supervivència embrionària, de gestacions i de naixements de cabrits sans.

Actualment, en el nostre laboratori el cultiu es realitza en gotes de medi SOF (1 µl per embrió), al qual s'afegeix 0,1 µl de SFB per embrió a les 48 h de la inseminació. Els embrions s'incuben durant 7-8 dies a 38,5 °C i en una atmosfera amb un 5 % CO₂, 5 % O₂ i 90 % N₂.

CONCLUSIONS

Encara que s'han fet progressos recents en les metodologies MOET, és necessari que es realitzi més recerca per conèixer com és la resposta a les hormones exògenes de l'ovari segons el seu estat fol·licular i com afecten els tractaments hormonals al nivell d'ovulacions i al de recuperació d'embrions. El coneixement de l'estat fol·licular i les seves repercussions en les característiques moleculars dels oòcits és l'obstacle més gran per optimitzar tant els resultats del MOET com els de les metodologies de PIVE. En els darrers anys la PIVE ha millorat significativament gràcies a l'important nombre de grups de recerca que treballen en aquest camp arreu del món. No obstant això, hi ha una gran diferència en els resultats de PIVE entre els laboratoris i, fins i tot, dins d'un mateix laboratori, que, moltes vegades, és deguda a la diferent qualitat dels oòcits utilitzats. L'optimització dels processos de PIVE ha de ser consolidada sobre els coneixements bàsics i profunds del material biològic que utilitzem, principalment l'oòcit, però també l'espermatozoide. Aquest coneixement és fonamental per millorar la productivitat en el cabrum, però sobretot serà vital per a la producció i propagació dels animals transgènics i clònics.

BIBLIOGRAFIA

- ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. (2007). «Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 67: 526-536.
- ARMSTRONG, D. T. (2001). «Effects of maternal age on oocyte developmental competence». *Theriogenology*, 55: 1303-1322.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. (2004). «Advanced assisted reproduction technologies (art) in goats». *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83: 255-266.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. (2002). «Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies». *Theriogenology*, 57: 275-284.
- BARIL, G.; LEOEUF, B.; SAUMANDE, J. (1993). «Synchronization of estrus in goats: The relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination». *Theriogenology*, 40: 621-628.
- BARIL, G.; POUGNARD, J.; FREITAS, V.; LEOEUF, B.; SAUMANDE, J. (1996). «A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats». *Theriogenology*, 45: 697-706.
- COGNIE, Y. (1999). «State of the art in sheep-goat embryo transfer». *Theriogenology*, 51: 105-116.
- COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. (2003). «Current status of embryo technologies in sheep and goat». *Theriogenology*, 59: 171-188.
- CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M. P. (1995). «Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 103: 293-298.
- GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A.; CILLO, F.; ANTONINI, S. (2005). «Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency». *Rev. Sci. Tech.*, 24: 413-423.
- GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SOUZA, C. J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; MCNEILLY, A. S. (2004). «Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibit a secretion in goats». *Theriogenology*, 61: 977-985.
- GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; DYER, V. W.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. (1999). «Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following fsh stimulation of domestic goats». *Theriogenology*, 51: 1099-1119.
- HOLTZ, W. (2005). «Recent developments in assisted reproduction in goats». *Small Rumin. Res.*, 60: 95-110.
- IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; LOPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M. T. (2002). «Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes». *Theriogenology*, 57: 1431-1441.
- IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. T. (1999). «Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes». *Theriogenology*, 52: 847-861.
- JIMENEZ-MACEDO, A. R.; ANGUITA, B.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. (2006). «Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter». *Theriogenology*, 66: 1065-1072.
- JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; ANGUITA, B.; PARAMIO, M. T. (2005). «Comparison between intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilisation employing oocytes derived from prepubertal goats». *Theriogenology*, 64: 1249-1262.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; GAJDA, B.; SMORAG, Z. (2004). «Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of *in vitro* embryo production in goats». *Theriogenology*, 62: 576-586.
- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. (1996). «*In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media». *Biol. Reprod.*, 55: 333-339.
- KESKINTEPE, L.; MORTON, P. C.; SMITH, S. E.; TUCKER, M. J.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B. G. (1997). «Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection and defined culture». *Zygote*, 5: 261-265.
- KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B. G. (1998). «Caprine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders». *Theriogenology*, 49: 1265-1274.
- KOEMAN, J.; KEEFER, C. L.; BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B. R. (2003). «Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery». *Theriogenology*, 60: 879-889.
- MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. (1994a). «Meiotic competence of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 41: 969-980.
- MARTINO, A.; PALOMO, M. J.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. (1994b). «Influence of the collection technique

- of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization». *Theriogenology*, 42: 859-873.
- MENCHACA, A.; VILARINO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. (2007). «Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats». *Theriogenology*, 68: 1111-1117.
- MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, M. D.; PARAMIO, M. T. (1997a). «Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats». *Theriogenology*, 47: 1189-1203.
- (1997b). «Morphological events during *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*». *Theriogenology*, 48: 815-829.
- ONGERI, E. M.; BORMANN, C. L.; BUTLER, R. E.; MELICAN, D.; GAVIN, W. G.; ECHELDAR, Y.; KRISHER, R. L.; BEHBOODI, E. (2001). «Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation by different methods». *Theriogenology*, 55: 1933-1945.
- PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. (1999). «Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 51: 927-940.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. (1986). «Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen». *Theriogenology*, 25: 591-600.
- PAWSHE, C. H.; PALANISAMY, A.; TANEJA, M.; JAIN, S. K.; TOTEY, S. M. (1996). «Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers». *Theriogenology*, 46: 971-982.
- PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ LLANO, B. (1998). «Superovulatory response of murciana goats to treatments based on PMSG/anti-PMMSG or combined fsh/pmmsg administration». *Theriogenology*, 50: 357-364.
- POULIN, N.; GULER, A.; PIGNON, P.; COGNIE, Y. (1996). «*In vitro* production of goat embryos: Heparin in IVF medium affect development ability». *Proceedings of the Conference on Goats*: 838-840.
- RHO, G. J.; HAHNEL, A. C.; BETTERIDGE, K. J. (2001). «Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*». *Theriogenology*, 56: 503-516.
- RODRIGUEZ-DORTA, N.; COGNIE, Y.; GONZALEZ, F.; POULIN, N.; GUIGNOT, F.; TOUZE, J.; BARIL, G.; CABRERA, F.; ALAMO, D.; BATISTA, M. (2007). «Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos». *Theriogenology*, 68: 908-913.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; MERTENS, M. J.; PARAMIO, M. T. (2003b). «Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes». *Mol. Reprod. Dev.*, 65: 446-453.
- RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2003a). «Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation». *Reprod. Nutr. Dev.*, 43: 179-187.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. (2003). «The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats». *Anim. Reprod. Sci.*, 78: 271-287.
- SOHNREY, B.; HOLTZ, W. (2000). «Transcervical embryo collection in boer goats». *Small Rumin. Res.*, 36: 195-200.
- TAJIK, P.; ESFANDABADI, N. S. (2003). «*In vitro* maturation of caprine oocytes in different culture media». *Small Rumin. Res.*, 47: 155-158.
- URDANETA, A.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2003). «Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test». *Zygote*, 11: 347-354.
- URDANETA, A.; JIMENEZ, A. R.; PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. (2004). «Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes». *Zygote*, 12: 277-284.
- VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; ARAMIO, M. T. (2004). «Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: Ultrastructural and cytochemical study». *Mol. Reprod. Dev.*, 68: 507-514.
- VELILLA, E.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; VIDAL, F.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2006). «Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during *in vitro* maturation and fertilization». *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 617-626.
- VILLAMEDIANA, P.; VIDAL, F.; PARAMIO, M. T. (2001). «Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*». *Zygote*, 9: 193-199.
- WANG, B.; BALDASSARRE, H.; PIERSON, J.; COTE, F.; RAO, K. M.; KARATZAS, C. N. (2003). «The *in vitro* and *in vivo* development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa». *Zygote*, 11: 219-227.
- WANG, B.; BALDASSARRE, H.; TAO, T.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; ZHOU, J. F.; LEDUC, M.; KARATZAS, C. N. (2002). «Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes». *Mol. Reprod. Dev.*, 63: 437-443.
- YADAV, P. S.; SAINI, A.; KUMAR, A.; JAIN, G. C. (1998).

«Effect of oviductal cell coculture on cleavage and development of goat IVF embryos». *Anim. Reprod. Sci.*, 51: 301-306.

ZHOU, P.; WU, Y. G.; LI, Q.; LAN, G. C.; WANG, G.; GAO, D.; TAN, J. H. (2008). «The interactions between cy-

steamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes». *Reproduction*, 135: 605-611.