

EFICIÈNCIA DE LA ICSI SEGONS DIFERENTS MIDES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS

A. R. Jiménez-Macedo, B. Anguita, D. Izquierdo, M. T. Paramio

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

Resum

Els objectius d'aquest treball van ser l'avaluació de la competència meiótica dels oòcits de cabres prepúbbers i la millora de les taxes de desenvolupament embrionari. Per això, es van dividir els oòcits madurats *in vitro* en quatre grups segons els seus diàmetres (grup *a*: < 110 µm Ø; grup *b*: 110-125 µm Ø; grup *c*: 125-135 µm Ø i grup *d*: > 135 µm Ø). Es van fecundar mitjançant la tècnica d'ICSI i es van cultivar en SOF durant cent noranta-dues hores més. També es fecundaren per FIV convencional un grup d'oòcits com a control de la ICSI. Els percentatges de blastocists obtinguts als grups *c* i *d* van ser de 15,9 i 11,8%, respectivament, i van ser estadísticament majors que en la resta de grups. Segons aquest resultat, els oòcits de cabres prepúbbers amb diàmetres superiors (*c* i *d*) estan millor preparats per a la fecundació i el posterior desenvolupament embrionari que els de mida inferior. També s'ha aconseguit millorar els resultats de blastocists respecte als fecundats per FIV convencional (4%). Per tant, amb la ICSI s'han aconseguit millorar els resultats de desenvolupament embrionari respecte de la FIV. En conclusió, segons aquest treball, existeix una correlació positiva entre la grandària de l'oòcit i la seva competència citoplasmàtica, que es tradueix en un augment de les taxes de blastocists obtinguts.

Paraules clau Cabres, oòcits, ICSI.

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the meiotic competence of prepubertal goat oocytes and the improvement of the embryo development. To achieve this, *in vitro* matured oocytes were divided in four groups according to diameter criteria (group *a*: < 110 µm Ø; group *b*: 110-125 µm Ø; group *c*: 125-135 µm Ø and group *d*: > 135 µm Ø). After that, they were fertilized by ICSI and cultured in SOF medium for 192 hours. There was also a control group of ICSI technique fertilized by conventional FIV. The blastocyst percentages obtained in groups *c* and *d* were 15.9 and 11.8%, respectively and they were statistically higher than the rest of groups. According to these results, prepubertal goat oocytes with higher diameter (*c* and *d*) were more prepared to fertilisation and embryo development than the smallest ones. There was also improved the result of blastocysts obtained by ICSI compared to IVF (4%). Thus, ICSI fertilisation has improved embryo development in relation to IVF. In conclusion, according to this work, there is a positive correlation between the diameter of the oocyte and its cytoplasmic competence improving the blastocyst rates.

Key words Goats, oocytes, ICSI.

INTRODUCCIÓ

Des que Uehara i Yanagimachi (1997) van obtenir naixements d'hàmsster a partir d'oòcits fecundats per ICSI, aquesta tècnica s'ha incorporat com una alternativa a la FIV convencional i actualment té molt d'èxit tant en casos d'infertilitat masculina (Palermo *et al.*, 1992) com en experimentació amb animals —vedella (Kefer *et al.*, 1990), truja (Kolbe i Holtz, 1999), ovella

(Gómez *et al.*, 1998), euga (Alm *et al.*, 2001) i cabra (Wang *et al.*, 2003).

Per a obtenir embrions produïts per ICSI és necessari que, un cop injectat l'espermatozoide, l'oòcit s'activi i iniciï la mitosi. Els oòcits de mamífer poden ser activats per nombrosos estímuls, tant químics com físics. Encara que en condicions normals és necessària la intervenció d'un espermatozoide per a activar l'oòcit, en espècies com l'hàmsster o el porc, l'esti-

Taula 1 Resultats de desenvolupament embrionari a les quaranta-vuit i cent noranta-dues hores postfecundació d'òcits de cabres prepúbbers separats segons mida i fecundats per ICSI i del grup control (FIV).

	total	48 h	< 16 cèHules	mòrules	blastocists
Grup a	3	1b (33,3)	1 (100) ^a	—	—
Grup b	53	32 ^a (60,3)	30 (93,7) ^a	2 (6,2) ^c	—
Grup c	103	69 ^a (66,9)	37 (53,6) ^c	21 (30,4) ^a	11 (15,9) ^a
Grup d	48	34 ^a (70,8)	24 (70,6) ^b	8 (23,5) ^{ab}	4 (11,8) ^{ab}
FIV	169	75 ^b (44,4)	61 (81,3) ^{ab}	10 (13,3) ^{bc}	3 (4,0) ^b

^{a,b,c,d} Valors amb diferent lletra tenen diferències estadístiques ($P < 0,05$)

mulació mecànica que s'exerceix amb la pipeta de microinjecció és suficient per a activar l'òcít partenogènèticament (Kim *et al.*, 1999). En canvi, per a altres espècies com la bovina, és necessària una estimulació química addicional a la ICSI convencional (Kefer *et al.*, 1990), encara que Katayose *et al.* (1999) utilitzant *piezo-drill* ICSI van aconseguir blastocists sense aquesta activació química.

En el cabrum s'han obtingut blastocists mitjançant ICSI utilitzant semen congelat i sense activació química (Keskin-tepe *et al.*, 1997). Wang *et al.* (2003), van aconseguir el naixement de cabrits utilitzant *piezo-drill* ICSI. En ambdós grups s'utilitzaren òcits de cabres adultes. Jiménez-Macedo *et al.* (2005) van aconseguir embrions provinents de cabres prepúbbers activant els òcits químicament després de la ICSI, encara que no van obtenir blastocists.

S'ha vist que els òcits d'animals prepúbbers tenen taxes de fecundació inferiors que els d'adults. Es creu que és degut a deficiències en la seva maduració citoplasmàtica. Martino *et al.* (1994) van veure una correlació positiva entre el diàmetre dels òcits i la seva competència per completar la maduració *in vitro*. A més, en estudis fets al nostre laboratori, hem vist una correlació positiva entre la mida de l'òcít i la fecundació *in vitro*.

A causa de les baixes taxes de fecundació i desenvolupament embrionari que s'obtenen amb cabres prepúbbers, en aquest treball es proposa fer un estudi de la competència citoplasmàtica dels òcits de cabres prepúbbers, separant els òcits en quatre grups diferents segons el seu diàmetre i fecundant-los posteriorment amb ICSI.

MATERIAL I MÈTODES

Es van obtenir ovaris de cabres prepúbbers d'un escorador i van ser transportats fins al laboratori a 38,5° C.

Els òcits es van obtenir realitzant *slicing* dels ovaris

en medi TCM 199 (M-2520, Sigma) suplementat amb 2,2 mg/ml NaHCO₃, 2% (v/v) DBS (*donor bovine serum*, Cansera, Canadà) i 50 µg/ml de gentamicina a 37° C. Únicament van ser seleccionats els òcits envoltats totalment de, com a mínim, quatre capes de cèl·lules del cúmulus, i amb el citoplasma homogeni. Es van fer grups de vint a vint-i-cinc complexos òcít-cúmulus (COC) i es van posar en microgotetes de 100 µl de medi de maduració (MIV) (Urdaneta *et al.*, 2003) cobertes d'oli mineral (Rodríguez *et al.*, 2000). Els òcits s'incubaren 27 h a 38,5° C en una atmosfera del 5% CO₂ en aire.

La fecundació es va realitzar amb semen fresc, seleccionant els espermatozoides més mòtils per *swim-up* durant una hora en medi mDM (Bracckett i Oliphant, 1975, modificat per Younis *et al.*, 1991). El sobrenadant es va centrifugar a 500 rpm durant vuit minuts per a concentrar el espermatozoides. El *pellet* es va diluir 1:1 en mDM i es va capacitar amb 200 nM de ionomicina i 10 µg/ml d'heparina, i es va incubar durant quinze minuts (Wang *et al.*, 2002). Es va separar un grup d'òcits i es va col·locar en medi de FIV (Parish *et al.*, 1986). Aquest servirà com a grup control de fecundació per a la tècnica d'ICSI. Immediatament després es van inseminar amb una concentració de 4,10⁶ espermatozoides/ml i es van deixar en cocultiu durant vint-i-quatre hores. La resta d'òcits es van denudar i es van seleccionar únicament els que tenien el primer corpuscle polar visible i es van separar en quatre grups segons el diàmetre del seu citoplasma. Grup a: <110 µm Ø; grup b: 110-125 µm Ø; grup c: 125-135 µm Ø i grup d: > 135 µm Ø.

La ICSI es va realitzar seguint el protocol de Keskin-tepe *et al.* (1997) amb espermatozoides mòtils, i es va col·locar el corpuscle polar a les dotze o a les sis, indistintament (Stoddart *et al.*, 2000). Després de la injecció, els òcits es van incubar durant vint-i-quatre hores en medi de FIV. Els embrions es van cultivar durant cent noranta-dues hores més en medi SOF en una atmosfera amb un 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂, afegint

també sèrum fetal boví a l'1 % a les vint-i-quatre hores d'haver iniciat el cultiu dels embrions.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

A la taula es mostren els resultats del desenvolupament embrionari dels oòcits fecundats mitjançant ICSI i separats en diferents grups segons les grandàries del seu citoplasma i també dels fecundats per FIV.

Els percentatges dels embrions s'han donat sobre el total d'embrions observats a les quaranta-vuit hores postfecundació.

Del grup *a* es van aconseguir tres oòcits aptes per a ser fecundats per ICSI, és a dir, amb el 1r corpuscle polar visible, i només un es va dividir encara que no va superar l'estadi de dues cèl·lules. Als grups *b*, *c*, i *d* no es va trobar cap diferència significativa pel que fa a la divisió a les quaranta-vuit hores entre si, però sí amb respecte al grup de FIV, el qual va ser significativament inferior (60,3, 66,9, 70,8 vs. 44,4 %, respectivament). Aquests resultats podrien indicar que, inicialment, els grups *b*, *c* i *d* tenen tots els factors citoplasmàtics necessaris per a iniciar la mitosi sense que hi hagi diferències a causa de la seva mida. El fet que el grup control tingui resultats inferiors pot ser degut al fet que sobre aquest intervenen molts factors durant la fecundació que poden comprometre-la; en canvi, en els grups d'ICSI injectem directament l'espermatozoide i ens saltem tots els passos previs a la unió dels nuclis. Pel que fa als resultats del grup *a*, concorden amb els estudis previs realitzats al nostre laboratori amb FIV, on no s'han obtingut resultats de fecundació ni divisió embrionària. En els grups *a*, *b* i FIV es van trobar els majors percentatges d'embrions aturats amb menys de setze cèl·lules als vuit dies postfecundació. Respecte als estadis embrionaris avançats, trobem que els grups *c* i *d* tenen els millors percentatges tant de mòrules com de blastocists (mòrules: 30,4 i 23,5 %; blastocists: 15,9 i 11,8 %, respectivament). Al grup control (FIV), trobem valors més baixos, tot i que no es diferencien significativament dels percentatges del grup *d* (mòrules, 13,3 % i blastocists, 4 %). Respecte al grup *b*, aquest va proporcionar els valors més baixos de desenvolupament embrionari avançat i només vàrem obtenir mòrules (6,2 %).

Segons els resultats obtinguts en aquest treball, podríem dir que els oòcits dels grups *c* i *d* (els que tenen un major diàmetre) tenen major competència meiótica respecte als de grandària inferior, fet que concorda amb els resultats de maduració obtinguts per Martino *et al.* (1994) i el nostre grup (resultats no publicats).

En estudis anteriors fets en cabres prepúbers, no es van obtenir blastocists ni quan es van activar els oòcits

després de fer la ICSI ni quan es va aplicar la ICSI convencional i es van capacitar els espermatozoides amb heparina (Jimenez-Macedo *et al.*, 2005). En aquest estudi aconseguim obtenir blastocists aplicant la ICSI convencional sense activació química i capacitant els espermatozoides amb ionomicina.

En conclusió, oòcits de cabres prepúbers amb un diàmetre superior a 125 µm són més competents citoplasmàticament i estan millor preparats per la divisió embrionària que els de mida inferior. Amb aquests oòcits i fecundació per ICSI s'ha aconseguit obtenir blastocists en un percentatge superior a l'obtingut per FIV.

BIBLIOGRAFIA

- ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NÜRNBERG, G.; KANITZ, W. (2001). «Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes». *Theriogenology*, 56:817-829.
- GÓMEZ, M. C.; CATT, J. W.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. (1998). «Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization». *Theriogenology*, 49:1143-1154.
- JIMÉNEZ-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 goat». *Theriogenology*. [En premsa]
- KATAYOSE, H.; YANAGIDA, K.; SHINOKI, T.; KAWAHARA, T.; HORIUCHI, T.; SATO, A. (1999). «Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a piezo-driven pipette». *Theriogenology*, 52:1215-1224.
- KEEFER, C. L.; YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G. (1990). «Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection». *Mol. Reprod. Dev.*, 25:265-276.
- 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.
- KIM, N.; JUN, S.; DO, J.; UHM, S.; LEE, H.; CHUNG, K. (1999). «Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse or human spermatozoon into porcine oocytes». *Mol. Repr. Dev.*, 53:84-91.
- KOLBE, T.; HOLTZ, W. (1999). «Intraytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididimal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig». *Theriogenology*, 52:671-682.
- MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. (1994). «Meiotic competence of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 41:969-980.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM,

- A. C. (1992). «Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoon into an oocyte». *Lancet*, 340:17-18.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTER, E. S.; EYESTON, W. H.; FIRST, N. L. (1986). «Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen». *Theriogenology*, 25:591-600.
- STODDART, N. R.; FLEMING, S. D. (2000). «Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o'clock during ICSI does not affect clinical outcome». *Hum. Reprod.*, 15:1580-1585.
- UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. (1977). «Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididimal spermatozoa injected into hamster egg». *Biol. Reprod.*, 16:315-321.
- 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 (BCB)». *Zygote*, 11:347-354.
- 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(3):219-227.
- WANG, B.; BALDASSARRE, H.; TAO, T.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; ZHOU, J. F.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; BILODEAU, A. S.; LAZARIS, A.; KEEFER, C.; KARATZAS, C. N. (2002). «Transgenic goats by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes». *Molecular reproduction and development*, 63:437-443.
- YOUNIS, A. I.; ZUELKE, K. A.; HARPER, K. M.; OLIVEIRA, M. A.; BRACKETT, B. G. (1991). «*In vitro* fertilization of goat oocytes». *Biol. Reprod.*, 44:1177-1182.