

FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE POTROS POR INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

Factors affecting the efficiency of foal production by intracytoplasmic sperm
injection (ICSI)

Sicilia T. Grady¹ y Katrin Hinrichs^{1,2}

¹ Departamento de
Fisiología y Farmacología
Veterinaria y

² Departamento de Ciencias
Clínicas de Especies
Mayores, Facultad de
Medicina Veterinaria y
Ciencias Biomédicas,
Universidad de Texas
A&M, College Station, TX,
USA 77843

E-mail: sgrady@cvm.tamu.edu

RESUMEN

Actualmente, la producción de embriones equinos por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es lo suficientemente eficiente para ser utilizada comercialmente. Sin embargo, hay varios factores que afectan la eficiencia de este procedimiento porque, además del equipo especializado, la experiencia en la manipulación de ovocitos y embriones, y preparación de espermatozoides, es necesario tener un amplio conocimiento sobre el cultivo de ovocitos y embriones. En la actualidad únicamente hay dos reportes disponibles acerca de la eficiencia esperada de la producción de potros por ICSI. En el presente artículo presentamos únicamente los parámetros pertinentes al Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M, ya que es posible que los resultados de otros laboratorios sean diferentes a los nuestros.

Palabras clave: equino; *in vitro*, embriones, ICSI

ABSTRACT

Equine embryo production by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is currently effective enough to be used clinically. However, there are several factors that affect the efficiency of this procedure because, in addition to specialized equipment, skill in oocyte and embryo handling, and sperm preparation as well as knowledge of oocyte and embryo culture are required. To the best of our knowledge, there are currently only a couple of reports available on the expected efficiency of foal production by ICSI. Here we discuss the parameters that pertain to the Texas A&M Equine Embryo Laboratory only, as other laboratories may have different results.

Keywords: equine; *in vitro*, embryo, ICSI

INTRODUCCION

En el año 2007, Galli *et al.* reportaron el primer potro producido por ICSI (Colleoni *et al.*, 2007). Para recolectar ovocitos inmaduros, este grupo realizó punciones ováricas y aspiraciones transvaginales (TVAs) guiadas por ecografía; con este método lograron obtener un índice de recolección de un 58% con un promedio de 10 ovocitos inmaduros por cada aspiración. De los ovocitos recuperados, 6,6 maduraron *in vitro*. El índice de desarrollo hasta blastocisto fue de un 12%, resultando en 0,85 blastocistos por aspiración y un porcentaje de preñez de un 55% por blastocisto transferido. En el Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M, desde Febrero hasta Mayo del año 2013, se realizaron 103 aspiraciones y se produjeron 119 blastocistos (resultando en un índice de producción de blastocistos de un 20% por ovocito inyectado) (Hinrichs *et al.*, 2014). La transferencia de 101 embriones resultó en un porcentaje de preñez de un 82%. De estas 82 preñeces se produjeron 60 potros (resultando en un índice de parto de un 59% por embrión transferido). En el año 2014, el grupo de Galli reportó resultados más recientes de su laboratorio. Reportaron un porcentaje de recolección de ovocitos inmaduros de un 66 a 70% y un porcentaje de blastocistos producidos por ovocito inyectado de un 2 a 8% (resultando en 0,3 a 0,8 blastocistos por aspiración).

PRODUCCIÓN DE BLASTOCISTOS POR ICSI

Ovocitos de folículos dominantes estimulados

La aspiración de folículos dominantes estimulados (DSFs) es un procedimiento simple y con un alto índice de recolección de ovocitos. Esto se debe al gran tamaño del folículo y a que el complejo cúmulus-ovocito está expandiéndose y desprendiéndose de la pared folicular debido a la estimulación de gonadotropinas. Este procedimiento fue descrito por primera vez en 1983 por Vogelsang *et al.* en donde introdujeron una aguja por el flanco de las yeguas para la colección del ovocito (Vogelsang *et al.*, 1983). La aspiración de DSF por TVA fue descrita por primera vez en 1992 por Brück *et al.* (Bruck *et al.*, 1992). Cuando se aspira un DSF, el índice de recolección de ovocitos debe ser mayor al 70%, sin importar el método utilizado. El ovocito aspirado de un DSF está en proceso de maduración (meiosis), por lo tanto, una vez recuperado, el ovocito debe mantenerse a temperatura corporal durante la manipulación y el transporte al laboratorio de ICSI.

Para recolectar ovocitos de DSFs, el desarrollo folicular de las yeguas debe ser monitoreado durante el estro, y un agente ovulatorio (hCG o un análogo de GnRH) es

administrado cuando un folículo dominante es detectado. El DSF es aspirado entre 24 y 35 h después de la administración del agente ovulatorio; el ovocito recolectado permanece en cultivo hasta 40 h después de la administración del agente ovulatorio, y después es fertilizado por ICSI.

El Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M no realiza la aspiración de DSFs con frecuencia porque la aspiración de folículos inmaduros no requiere que la yegua sea monitoreada ni requiere que el agente ovulatorio, la aspiración del folículo y la fertilización de ovocito ocurran a horas determinadas. Además, la aspiración de folículos inmaduros permite la recolección de varios ovocitos a la vez y aumenta el número de blastocistos producidos por cada aspiración.

Los ovocitos recolectados de DSFs tienen una mayor capacidad intrínseca de desarrollo ya que la mayor parte de su maduración ha ocurrido *in vivo*. Aunque los ovocitos recuperados de DSFs deberían producir el mismo porcentaje de blastocistos *in vitro* que después de la transferencia de ovocitos (OT; transferencia quirúrgica de un ovocito maduro al oviducto de una yegua receptora que ha sido inseminada), el porcentaje de preñez después de OT es de $\geq 75\%$ (Carnevale y Ginther, 1995, Hinrichs, 1998) mientras que el porcentaje de preñez después de ICSI y cultivo *in vitro* en nuestro laboratorio es solo de un 40%, cuando se usan yeguas y sementales probados (Jacobson *et al.*, 2010).

Ovocitos inmaduros

En 1992, Cook *et al.* describieron por primera vez la aspiración de folículos inmaduros por TVA (Cook *et al.*, 1992). A diferencia de la aspiración de DSFs, la aspiración de folículos inmaduros por TVA es un procedimiento complicado con una curva de aprendizaje muy larga, y el índice de recolección de ovocitos depende de la persona que manipula el ovario y la persona que manipula la aguja. Durante la aspiración de folículos inmaduros, todos los folículos con un diámetro ≥ 5 mm son aspirados. Algunas de las complicaciones que pueden ocurrir durante la aspiración de folículos inmaduros por TVA incluyen abscesos ováricos (Bøgh *et al.*, 2003, Velez *et al.*, 2012), desgarros rectales, peritonitis y muerte por hemorragia (Vanderwall y Woods, 2002). Sin embargo, durante el transcurso de 3 años, el Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M, evaluó los ovarios de nuestra manada de yeguas bajo investigación, por medio de laparoscopia y después de ser extraídos por ovariectomía. En este estudio se encontraron mínimos cambios macroscópicos e histológicos, y solamente se encontró un absceso

(Velez *et al.*, 2012). Este estudio se realizó sobre 400 TVAs y más de 3 000 punciones ováricas que fueron realizadas para recolectar todos los folículos inmaduros de todas las yeguas una vez cada 14 días durante el año sin la administración de antibióticos.

Los ovocitos inmaduros recolectados son transportados al laboratorio de ICSI en donde son madurados *in vitro*. ICSI se realiza en aquellos ovocitos que progresan a metafase II. Cabe resaltar que durante la recuperación y manipulación, los ovocitos inmaduros recuperados son sumamente susceptibles a toxinas incluyendo compuestos orgánicos volátiles en el aire, repelente de moscas, residuos antisépticos durante el lavado perineal de la yegua, y el manejo no estéril de los platos y medios de cultivo. Todos los medios y materiales utilizados para la recolección y el transporte de ovocitos deben ser no tóxicos para embriones.

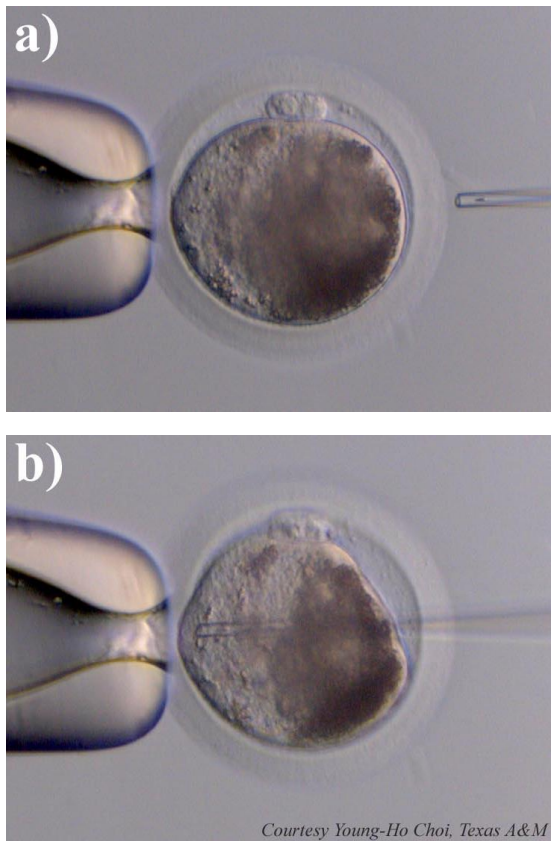


Figura 1. ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Alrededor del 65% de los ovocitos inmaduros recolectados maduran *in vitro* y son fecundados por ICSI (ver Figura 1), y de esos un 20 a 25% producen blastocistos. En promedio se producen 1,1 blastocistos por cada TVA; sin embargo, un 40% de los casos no

producen ni un blastocisto. La razón de esta variabilidad en la producción de blastocistos es desconocida. En nuestro laboratorio no hay diferencias en la producción de blastocistos producidos de ovocitos inmaduros aspirados durante la fase de regresión de la onda folicular (ovocitos aspirados al mismo tiempo que un DSF, es decir, después de la administración de hCG o un análogo de GnRH) y ovocitos aspirados durante la fase lútea del ciclo estral.

Efectos de la yegua y el semental

Tanto la yegua como el semental ejercen un efecto en la producción de blastocistos. Las yeguas de edades más avanzadas tienen un menor número de folículos, y aunque esto no afecta la eficiencia de ICSI sí afecta los resultados. Cuando hay un menor número de folículos, hay un menor número de ovocitos para recolectar, y por lo tanto, el número de blastocistos que se pueden producir es menor.

Hay ciertos sementales que producen bajos porcentajes de clivaje y de blastocistos, posiblemente debido a que producen semen de mala calidad. El método utilizado para preparar los espermatozoides que serán utilizados para ICSI también tiene un efecto en el desarrollo embrionario (Choi *et al.*, 2015).

Ovocitos transportados

Los ovocitos recolectados de DSFs y de folículos inmaduros que son envasados y transportados a nuestro laboratorio han producido resultados iguales a los ovocitos recolectados por nuestro equipo en el Hospital Veterinario de Texas A&M (un 60-65% de maduración y un 20-25% de blastocistos producidos por ovocito maduro inyectado).

Preñez y pérdida en gestación

Todos los blastocistos producidos en el Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M son envasados y transportados para ser transferidos o son vitrificados. Los blastocistos producidos *in vitro* son procesados como embriones recolectados al Día 6 y por lo tanto deben ser transferidos a yeguas receptoras que hayan ovulado de 4 a 6 días previos.

En nuestro laboratorio, los blastocistos producidos *in vitro* tienen un porcentaje inicial de preñez de un 70% pero alrededor de un 25% de esas gestaciones se pierden antes de detectar la frecuencia cardíaca embrionaria. El porcentaje de pérdida en gestación es el mismo para ovocitos recolectados de folículos inmaduros y de DSFs, por lo tanto es probable que las pérdidas en gestación se deben a problemas intrínsecos

del sistema de cultivo *in vitro*. Mucho del trabajo que se realiza actualmente en nuestro laboratorio está enfocado en tratar de entender y mejorar el sistema de cultivo *in vitro* para minimizar las pérdidas en gestación.

CONCLUSIONES

La maduración *in vitro* de ovocitos equinos, ICSI y el cultivo de embriones son procesos complejos que requieren de equipo especializado y experiencia para ser exitosos. ICSI es un método efectivo para producir potros de yeguas que no pueden producir embriones para transferencia debido a endometritis crónica, defectos cervicales, daño al tracto reproductivo, o a la recurrencia de folículos anovulatorios. ICSI también es indicado para casos en donde los sementales tienen muy pocos espermatozoides, o cuando solo existe un número limitado de pajillas congeladas. ICSI también puede ser utilizado para obtener potros de ovocito colectados de los ovarios recolectados de una yegua después de la eutanasia. Sin embargo, ICSI no debe ser considerado un como método para producir más potros de una yegua fértil porque además de que existen riesgos para la yegua donante, la labor necesaria y el costo económico para realizar TVA e ICSI son mucho más altos que el de una típica transferencia embrionaria.

REFERENCIAS

- Bøgh I, Brink P, Jensen HE, Lehn-Jensen H, Greve T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine veterinary journal*, 2003. 35(6): 575-579.
- Brück I, Raun K, Synnstedt B, Greve T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine veterinary journal*, 1992. 24(1): 58-59.
- Carnevale E, Ginther O. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. 1995. *Biology of Reproduction*. 1: 209-214.
- Choi YH, Velez IC, Macías-García B, Riera FL, Ballard CS, Hinrichs K. Effect of clinically-related factors on *in vitro* blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology*. 2016; 85(7):1289-96.
- Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Galli C. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. in *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Orlando, Florida, USA, 1-5 December, 2007*. 2007.
- American Association of Equine Practitioners (AAEP).
- Cook NL, Squires EL, Ray BS, Cook VM, Jasko J. Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1992. 12(4): 204-207.
- Hinrichs K, Choi YH, Love CC, Spacek S. Use of *in vitro* maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2014. 34(1): p. 176.
- Hinrichs K. Oocyte transfer in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998, 212, 982-986.
- Jacobson CC1, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2010, 73(8):1116-26.
- Vanderwall D, Woods G. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2002. 22(2):84-86.
- Velez IC, Arnold C, Jacobson CC, Norris JD, Choi YH, Edwards JF, Hayden SS, Hinrichs K. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status. *Equine veterinary journal*, 2012. 44(S43): 78-83.
- Vogelsang M, Keider J, Potter G. Recovery of pre-ovulatory equine oocytes by follicular aspiration. in *Proceedings, 8th Equine Nutr. and Physio. Symposium*. 1983.