

*Artículo corto:*

## **PRODUCCIÓN *in vitro* DE CIGOTOS PORCINOS UTILIZANDO SEMEN VITRIFICADO**

### ***In vitro* porcine zygote production using vitrified semen**

**C. Arraztoa<sup>1</sup>, C. Baca Castex<sup>2</sup>, G. Alvarez<sup>3</sup>, S. Giuliano<sup>4</sup>, P. Cetica<sup>5</sup>, D. Neild<sup>6</sup>**

<sup>1,2,3,6</sup> *Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias-UBA, Buenos Aires, Argentina.*

<sup>3,5</sup> *Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias-UBA, Buenos Aires, Argentina.*

<sup>4</sup> *Cátedra de Física Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias-UBA, Buenos Aires, Argentina.*

Claudia Arraztoa: [carraztoa@fvvet.uba.ar](mailto:carraztoa@fvvet.uba.ar)

#### **RESUMEN**

La vitrificación de espermatozoides porcinos en ausencia de crioprotectores, mediante el método de esferas, permite conservar la condensación e integridad de la cromatina espermática. Resulta de interés determinar si los espermatozoides porcinos vitrificados-atemperados mantienen su capacidad de producir cigotos *in vitro*, mediante la técnica de ICSI. Los resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de cigotos obtenidos entre el grupo de ovocitos inyectados con semen vitrificado-atemperado 42,9% (39/91) y el grupo de semen diluido y conservado a 17°C, 34,2% (26/76) (P>0,05). De esta manera se observa que, la vitrificación espermática porcina mediante el método de esferas, utilizando medio TALP sin crioprotector, no solo permitiría conservar espermatozoides porcinos con cromatina condensada e intacta, sino que además conservaría células con la capacidad de generar cigotos mediante la técnica ICSI.

Palabras claves: *vitrificación, semen, porcino, ICSI.*

#### **ABSTRACT**

Vitrification of porcine spermatozoa, using the spheres method in the absence of cryoprotectant, permits preservation of sperm chromatin condensation and integrity. It would be interesting to evaluate if vitrified-warmed porcine spermatozoa maintain the capacity to produce zygotes *in vitro*, using the ICSI technique. The results showed no significant differences in percentage of zygotes (P>0,05) between the group of oocytes injected with vitrified-warmed spermatozoa (42,9%; 39/91) and the group injected with extended semen preserved at 17° C (34,2%; 26/76). This shows that porcine sperm vitrification in spheres, using TALP medium without cryoprotectant, would not only preserve spermatozoa with condensed and intact chromatin, but also with the capacity to produce zygotes using the ICSI technique.

Keywords: *vitrification, boar, semen, ICSI*



## INTRODUCCIÓN

La vitrificación es un proceso mediante el cual el líquido se modifica sin la formación de cristales de hielo, presentándose como un modelo alternativo de criopreservación espermática porcina, especie muy sensible a los cambios sufridos durante la congelación profunda. La vitrificación de espermatozoides porcinos en ausencia de crioprotectores, mediante el método de esferas, permite conservar la condensación e integridad de la cromatina espermática porcina (Arraztoa *et. al.*, 2012), permitiendo preservar los recursos genéticos de la especie. Esta condición hace de la vitrificación un modelo de criopreservación de espermatozoides con utilidad en biotecnologías como la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). El objetivo del presente trabajo fue determinar si los espermatozoides porcinos vitrificados-atemperados, mantienen su capacidad de producir cigotos *in vitro*, evaluando la misma mediante la técnica ICSI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la vitrificación espermática se utilizó semen porcino fresco, el mismo se obtuvo a partir de 3 machos híbridos terminales, de 2 a 3 años de edad, alojados en instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina. La extracción de semen se realizó mediante el método de mano enguantada, recolectando la fracción rica en espermatozoides, la cual fue diluida 1:2 en medio Beltsville Thawing Solution (semen: BTS). Las muestras (semen: BTS), fueron seleccionadas por filtración a través de lana de vidrio, sometidas a centrifugación a  $400 \times g$  durante 5 minutos y diluidas a  $5 \times 10^6$  esp./ml en medio TALP libre de crioprotectores permeables y suplementado con 1% de BSA (T). Para la vitrificación, se utilizó el método de esferas (Isachenko *et al.*, 2008), descargando 20  $\mu$ l de la suspensión espermática en un recipiente con nitrógeno líquido. Al tomar contacto con el mismo, la gota se transformó en una esfera, que intercambió calor con el nitrógeno hasta llegar a los  $-196^\circ$  C, sumergiéndose al cabo de 6-7 segundos. Las esferas permanecieron en nitrógeno líquido un mínimo de 24 horas para luego ser atemperadas y evaluadas. El atemperado se realizó de forma rápida, sumergiendo las esferas una por una en medio T a  $37^\circ$ C, aplicando una suave agitación. Se atemperaron un total de 5 esferas en 5 ml de medio T, procediendo luego a su centrifugación durante 5 minutos a  $300 \times g$ .

Se evaluó la movilidad, funcionalidad de membranas, viabilidad, integridad acrosomal y la cromatina espermática en las muestras diluidas en medio T, previas a vitrificar, así como en las muestras espermáticas vitrificadas y atemperadas. La movilidad se evaluó utilizando platina térmica y microscopio con contraste de fase y la funcionalidad de membrana citoplasmática mediante la técnica HOS, observando la presencia de "swelling" en las colas de los espermatozoides con membrana funcional. La viabilidad espermática se evaluó mediante la tinción con los fluorocromos Diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e Ioduro de propidio (Pi), observando aquellos espermatozoides viables (membranas intactas) con fluorescencia verde y los no viables (membranas dañadas) con fluorescencia roja en el núcleo, mientras que la integridad acrosomal se valoró fijando las muestras en solución salina formolada y observando las mismas con microscopio con contraste de fase. También se evaluó la

calidad de la cromatina espermática, analizando el grado de condensación de la misma por medio de la técnica de azul de toluidina, observando aquellos espermatozoides con cromatina condensada (normal) de color celeste claro, y analizando la integridad del ADN a través del fluorocromo naranja de acridina, donde aquellos espermatozoides resistentes a la desnaturalización ácida presentaron un color verde (cromatina intacta).

Para la ICSI, se obtuvieron los complejos ovocitos cumulus (COCs) por punción-aspiración de folículos ováricos antrales (3-8 mm) provenientes de ovarios de hembras de matadero. La maduración se realizó en medio TCM-199 suplementado con cisteína, sulfato de gentamicina, hormona foliculo estimulante porcina, hormona luteínica porcina y líquido folicular (Abeydeera, 2001), bajo aceite mineral, a  $39^\circ$  C durante 48 horas en estufa gaseada con 5% de  $CO_2$  y saturada de humedad. Los ovocitos se denudaron en solución de hialuronidasa 0,1%, se evaluaron bajo lupa y aquellos con corpúsculo polar visible y citoplasma homogéneo fueron seleccionados para la ICSI. El mismo día de la ICSI, un grupo de ovocitos fue inyectado con espermatozoides vitrificados-atemperados (grupo tratamiento) y otro grupo fue inyectado con espermatozoides diluidos en BTS (1:2) y mantenido a  $17^\circ$  C (grupo control). Durante la ICSI, los ovocitos se colocaron en gotas de HEPES-TALP suplementado con BSA 0,3% y la suspensión de semen vitrificado-atemperado o semen diluido y mantenido a  $17^\circ$  C se colocó en gotas de polivinilpirrolidona 10%.

Todo el proceso se realizó a  $38^\circ$  C. Como control de activación partenogenética, se ensayó la maniobra de Sham, donde un grupo de ovocitos fueron inyectados en ausencia de espermatozoides, con el fin de corroborar que el desarrollo de pronúcleos (PN) no se debiera a la activación que podría producir la maniobra de inyección. Todos los ovocitos inyectados (grupos tratamiento, control y Sham), se cultivaron en medio G1 (Gardner y Lane, 1997) a  $38^\circ$  C y atmósfera de tri-gas (5% de  $CO_2$ , 5% de  $O_2$  y 90% de  $N_2$ ), saturada de humedad. A las 18 horas de cultivo, se evaluó la presencia de PN, fijando y tiñendo los presuntos cigotos con Hoechst 33342 (Coy *et al.*, 2005), también se fijaron y tiñeron los ovocitos sometidos a Sham para corroborar la ausencia de activación, observándose las muestras en microscopio de epifluorescencia.

Los datos obtenidos en el monitoreo del desarrollo embrionario hasta estadios de PN fueron analizados utilizando una comparación de proporciones, considerando significativo un valor de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en el desarrollo embrionario temprano hasta estadios de PN entre el grupo de ovocitos inyectados con semen vitrificado-atemperado y el grupo de semen diluido y conservado a  $17^\circ$  C ( $P > 0,05$ , ver Tabla 1). Los ovocitos sometidos a Sham (22 ovocitos totales), distribuidos en las diferentes sesiones de ICSI, presentaron un 9% (2/22) de activación (presencia de un solo PN).

Tabla 1: Porcentaje de PN en ovocitos inyectados con espermatozoides vitrificados-atemperados, espermatozoides diluidos y conservados a 17 °C y ovocitos sometidos a Sham (P>0,05)

	Semen vitrificado - atemperado	Semen diluido y conservado a 17 °C	Sham
Ovocitos con PN	42,9% (39/91)	34,2% (26/76)	9% (2/22)

## DISCUSIÓN

Si bien los porcentajes de PN obtenidos entre el grupo tratamiento y el grupo control no presentaron diferencias significativas, es evidente la presencia de un mayor porcentaje en el grupo inyectado con espermatozoides vitrificados-atemperados. Esto podría deberse a que los espermatozoides vitrificados-atemperados podrían comenzar el proceso de descondensación de la cromatina espermática para la formación del PN masculino de forma más rápida y fácil que aquellos conservados a 17 °C debido a que presentan membranas dañadas y ausencia de acrosoma, ya que los únicos parámetros seminales que luego de la vitrificación no presentaron diferencias significativas con las muestras previas a vitrificar fueron: la condensación (previas a vitrificar: 89,9% ± 0,8 vs. vitrificadas-atemperadas: 93,3% ± 0,7) y la integridad de la cromatina espermática (previas a vitrificar: 97,2 ± 1,9 vs. vitrificadas-atemperadas: 91,2% ± 5,2) (media ± error estándar) (Arraztoa *et al.*, 2012).

Los resultados en el porcentaje de PN obtenidos en el presente trabajo, fueron semejantes a los obtenidos a partir de ovocitos inyectados con espermatozoides porcinos vitrificados-atemperados y espermatozoides conservados a 17 °C, cultivados en medio G1 pero en atmósfera gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>, donde tampoco se observaron diferencias significativas en la presencia de PN entre ambos grupos (Arraztoa *et al.*, 2014). Estos resultados no sólo corroboran que la vitrificación de espermatozoides porcinos permitiría conservar células con una cromatina condensada e intacta, sino que además conservaría células con la capacidad de generar cigotos mediante la técnica ICSI. Resultados semejantes se han reportado al obtener desarrollo embrionario hasta estadios iniciales utilizando espermatozoides no viables tanto en la especie porcina, al inyectar cabezas espermáticas aisladas (Kim *et al.*, 1998), como en la especie equina, utilizando espermatozoides desecados al aire (Alonso *et al.*, 2007).

Por otro lado, el bajo porcentaje de PN en el grupo de ovocitos sometidos a Sham (9%, 2/22), indicaría que los cigotos obtenidos por ICSI de espermatozoides vitrificados-atemperados se deberían a la fertilización y no a la activación partenogénica.

## CONCLUSIÓN

La vitrificación espermática porcina en esferas, a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> esp./ml de medio TALP sin crioprotector, suplementado con BSA 1%, permitiría conservar la cromatina de los espermatozoides, manteniendo la capacidad de producir cigotos por medio de la técnica ICSI.

## REFERENCIAS

- Abeydeera L.R. In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod. Suppl.*, 2001; 58:159-173.
- Alonso A., Miragaya M., Losinno L., Herrera C. Intracytoplasmic Sperm Injection of equine oocytes using air-dried sperm or sperm stored in a high osmolarity medium. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007; 19(1): 301.
- Arraztoa C., Miragaya M., Pendola C., Gambarotta M., Neild D.M. Boar sperm vitrification. *In Vet*, 2012; 14(2): 254.
- Arraztoa C., Baca Castex C., Alvarez G., Cetica P., Neild D. Vitrificación de espermatozoides porcinos y evaluación de su capacidad de producir embriones mediante la técnica ICSI. *II Congreso de la Sociedad de Tecnologías Embrionarias (S.ATE)*, 2014; Resúmen.-
- Coy P., Romar R., Ruiz S., Cánovas S., Gadea J., Vázquez F.G., Matás C. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. *Reprod. Res.*, 2005; 129: 747-755.
- Gardner D.K. y Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod*, 1997; 3(4): 367-382.
- Isachenko E., Isachenko V., Weiss J., Kreienberg R., Katkov I., Schulz M., Lulat A., Risopatrón M., Sánchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*, 2008; 136: 167-173.
- Kim N., Lee J., Jun S., Lee H., Chung K. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon of isolated sperm head injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 51 (4): 436-444.

