

**GENERACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS POR INYECCIÓN
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) UTILIZANDO
ESPERMATOZOIDES TRATADOS CON AGENTES
DESESTABILIZADORES DE MEMBRANA**

Generation of cattle embryos by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using
sperm treated with destabilizing membrane agents

Fabiola Zambrano¹, Tamara Vargas¹, Luis Águila¹, María Elena Arias¹, Raúl Sánchez¹,
Ricardo Felmer^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.34>

¹ *Laboratorio de Reproducción,
Centro de Biotecnología de la
Reproducción (CEBIOR-BIOREN),
Facultad de Medicina,
Universidad de la Frontera.
Temuco, Chile.*

² *Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales,
Universidad de La Frontera.
Temuco, Chile.*

E-mail: ricardo.felmer@ufrontera.cl

RESUMEN

La ICSI en bovinos tiene baja eficiencia debido en parte a la presencia del acrosoma y a la exposición tardía del factor espermático (PLCζ). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la eliminación del acrosoma y membranas plasmáticas de los espermatozoides con lisolecitina (LL) y tritón X100 (TX) sobre la fertilización y desarrollo de embriones generados por ICSI. Se evaluó la acrosina y PLCζ por inmunofluorescencia y citometría de flujo, el desarrollo embrionario por lupa estereoscópica y la formación pronuclear por microscopía fluorescente. Los resultados mostraron que LL y TX disminuyeron el número de espermatozoides con acrosina (77-95% y 80-98%, respectivamente) respecto al control (7%). De igual forma, LL y TX disminuyeron ($p < 0,05$) el número de espermatozoides con PLCζ. La tasa de división fue mayor en ICSI-TX (66%) mientras que la tasa de blastocistos fue mayor en ICSI-LL (28,5%) con respecto al control. No se observaron diferencias en la tasa de fertilización entre los tratamientos. En conclusión, el pretratamiento de espermatozoides con LL aumenta significativamente la tasa de desarrollo de embriones ICSI.

Palabras clave: *espermatozoides, ICSI, lisolecitina, PLCζ*

ABSTRACT

ICSI in cattle has low efficiency due to the presence of intact acrosome and delayed exposure of the spermatic factor (PLCζ). The aim of the present study was to evaluate the effect of the removal of the acrosome treating the spermatozoa with lysolecithin (LL) and triton

X100 (TX) on the embryonic development and fertilization of embryos generated by ICSI. PLCζ and acrosin were evaluated by immunofluorescencia and flow cytometry. Embryonic development was determined with stereomicroscope and pronuclear formation by epifluorescence microscopy. The results showed that LL and TX reduced the number of sperm with acrosin (77-

95% and 80-98%, respectively) compared to the control (87%). Similarly, LL and TX decreased ($P < 0,05$) the number of sperm with PLC ζ . Cleavage was higher in ICSI-TX group (66%) but blastocysts rate was improved with ICSI-LL treatment (28.5%). In conclusion, the sperm pretreatment with LL increased significantly the embryonic development of ICSI embryos.

Keywords: *spermatozoa, ICSI, lysolecithin, PLC ζ*

INTRODUCCION.

La Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es un procedimiento de reproducción asistida que implica la transferencia mecánica de un espermatozoide al interior de un ovocito que se encuentra en estado de metafase II (García-Rosello *et al.*, 2009). Actualmente es una técnica eficiente en reproducción humana, logrando solucionar diversas patologías de infertilidad (Palermo *et al.*, 1992). En animales de producción como el bovino, ICSI también puede utilizarse como opción en sistemas de reproducción. Sin embargo, la técnica es ineficiente, lo que condiciona su uso comercial. Esto se debe principalmente a los procesos naturales por los que no pasa el espermatozoide antes de ser inyectado en el ovocito, como son la capacitación y reacción acrosómica (Morozumi *et al.*, 2006), además de características propias del espermatozoide que limitan su éxito. Uno de los principales inconvenientes es la incapacidad del espermatozoide luego de la ICSI de generar las oscilaciones de calcio intracelular necesarias para la activación del ovocito, dado posiblemente por la presencia de la membrana espermática intacta, lo que desencadena una serie de inconvenientes entre ellos, el retraso de la formación pronuclear (Watanabe *et al.*, 2010). Junto con esto, se ha propuesto que el contenido acrosómico con su batería de enzimas hidrolíticas tendrían un efecto dañino en el interior del ovocito. De esta forma, la presencia tanto de la membrana acrosomal externa intacta, junto con el contenido acrosómico del espermatozoide dentro del ovocito estarían limitando la eficiencia de este procedimiento en la especie bovina (Morozumi & Yanagimachi, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación, tratamientos y evaluación de espermatozoides

Se utilizaron dosis comerciales de semen criopreservado provenientes de un toro con fertilidad probada (Alta Genetics). Las pajuelas se descongelaron a 38,5°C durante 1 minuto y los espermatozoides se seleccionaron mediante gradiente de percoll (Parrish *et al.*, 1995). Los espermatozoides seleccionados fueron llevados a una concentración de

2×10^6 e incubados en concentraciones de 0,04, 0,05 y 0,06% tanto con Lisolectina como Tritón X-100, durante 1 minuto con agitación en vortex (Seita *et al.*, 2009). Inmediatamente luego de la incubación, los espermatozoides fueron lavados en medio Sp-TALP mediante centrifugación a 1.200 rpm por 5 minutos. En cada análisis un control sin tratamiento fue incluido. Para la evaluación de la variación de PLC ζ los espermatozoides fueron fijados en paraformaldehído al 3,7% durante 30 min a 4°C, seguido de permeabilización con 0,1% Tritón X-100-DPBS durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron en PBS/BSA al 3% durante 1 hora a 4°C, y se incubaron durante 2 h a 4°C con un anticuerpo primario anti-PLC ζ . Después de lavar, se le agregó el anticuerpo secundario conjugado con FITC durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Para la evaluación de la presencia de acrosina, los espermatozoides fueron fijados en paraformaldehído al 3,7% durante 30 min a 4°C, seguido de permeabilización con 0,1% de Tritón X-100-DPBS durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron en PBS/BSA al 3% durante 1 hora a 4°C, y luego se incubaron con anticuerpo primario anti-acrosina conjugado con FITC durante 2 h a 4°C. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y cultivo de embriones

Los ovarios se recolectaron a partir de hembras sacrificadas en el frigorífico de Temuco (Temuco, Chile). Luego del transporte y lavado, se aspiraron los folículos de 2 a 6 mm de diámetro utilizando una jeringa y aguja de 18 G. La búsqueda de complejos cúmulos ovocitos (CCOs), se realizó en una lupa estereoscópica con platina térmica, donde se seleccionaron de acuerdo al número de capas de células del cúmulo (por lo menos 4) y citoplasma granular uniforme. La maduración se realizó en medio TCM-199 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, LH (6 $\mu\text{g/ml}$), FSH (6 $\mu\text{g/ml}$), estradiol (1 $\mu\text{g/ml}$), piruvato de sodio (0,2 mM) y sulfato de gentamicina (10 $\mu\text{g/ml}$). Los CCOs se incubaron 22-24 h a 38,5°C a 5% CO $_2$ y humedad a saturación. Luego de la maduración, los CCOs fueron separados de las células del cúmulo utilizando hialuronidasa (1 mg/ml) y vórtex durante 5 min. Se seleccionaron para el procedimiento ICSI ovocitos que presentaron extrusión del corpúsculo polar. Los ovocitos inyectados fueron expuestos a ionomicina (10 μM) en medio HECM-Hepes (HH) durante 5 min y luego de varios lavados en medio HH fueron incubados en 5 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida en medio KSOM durante 5 h a 38,5 °C, 5% de CO $_2$ y humedad a saturación. Posteriormente los ovocitos fueron lavados en 4 gotas de medio HH y cultivados en medio KSOM (0,4% BSA) durante 72 h en placas Nunc de cuatro pocillos cubiertas con aceite mineral.

Luego de este periodo el medio se suplementó con 5% de SFB y se registró la tasa de división. Los embriones se continuaron incubando hasta las 192 h donde se registró la tasa de formación de blastocistos. El cultivo embrionario se realizó con una atmósfera de O₂ (5%), CO₂ (5%) y N₂ (90%) a 38,5°C y humedad a saturación. La tasa de formación pronuclear se evaluó a las 19 horas posterior a la activación (hpa), fijando los presuntos cigotos en metanol-ácido acético glacial (3:1) y teñidos con Hoechst 33342 durante 4 min. Las imágenes fueron tomadas desde un microscopio de epifluorescencia (NIKON eclipse TS100F) equipado con los filtros ultravioleta apropiados.

RESULTADOS

Efecto de distintas concentraciones de LL y TX sobre la remoción del acrosoma en espermatozoides bovinos.

Para evaluar la eliminación del acrosoma de los espermatozoides se realizó inmunofluorescencia para detectar la enzima acrosina, la cual se pierde luego de la reacción acrosómica. Los resultados se muestran en la figura 1.

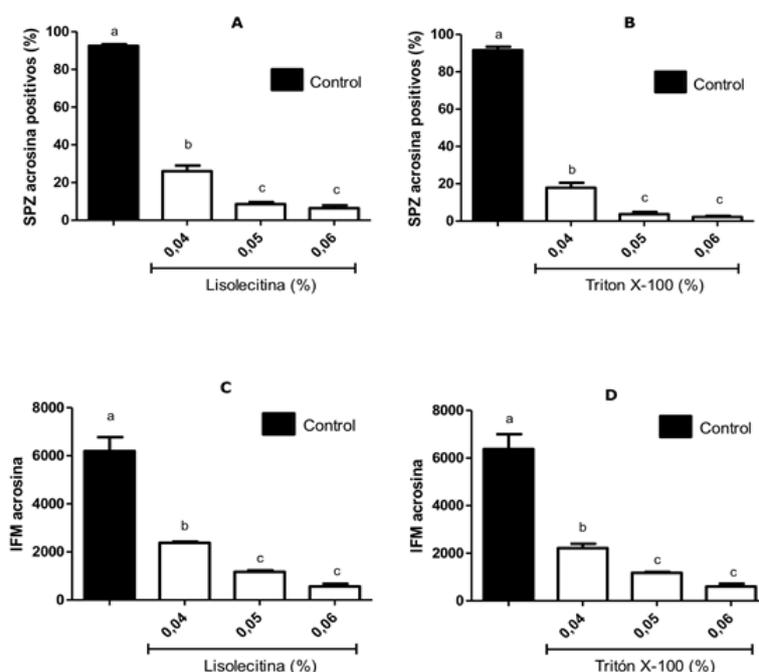


Figura 1. Efecto de distintas concentraciones de LL (A) y TX (B) sobre la remoción del acrosoma en espermatozoides bovinos. C y D muestran la variación de acrosina detectada por la intensidad de fluorescencia media (IFM) de FITC en espermatozoides bovinos (SPZ). Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; $n=3$).

Efecto de distintas concentraciones de LL y TX sobre el nivel de PLCζ presente en los espermatozoides.

La evaluación de la variación de PLCζ se determinó mediante cambios en la intensidad de fluorescencia y porcentaje de positividad de la proteína en los espermatozoides. Los resultados se muestran en la figura 2.

Efecto del pretratamiento de espermatozoides con LL y TX sobre la fertilización y la producción in vitro de embriones bovinos generados por ICSI.

Mediante el procedimiento ICSI se fecundaron los ovocitos con espermatozoides pretratados con LL y TX. Los resultados muestran un aumento en la tasa de clivaje de embriones generados con el tratamiento TX y un aumento en la tasa de blastocistos de embriones generados por LL respecto al control, respectivamente (Tabla 1). No se observó desarrollo embrionario a la etapa de blastocisto en los tratamientos y el control sin activación exógena (Tabla 1) y tampoco se observaron diferencias en las tasas de fertilización (Tabla 2).

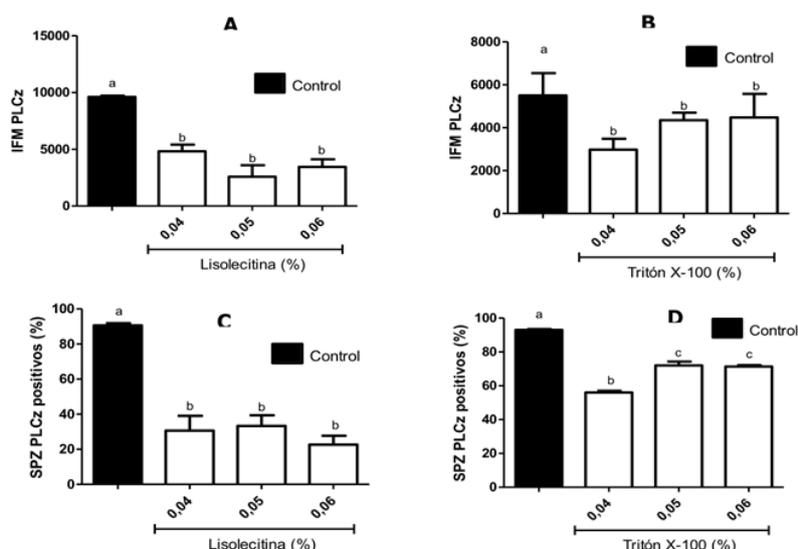


Figura 2. Efecto de distintas concentraciones de LL (A) y TX (B) sobre la variación de PLCζ. C y D muestran espermatozoides positivos a la fluorescencia FITC (espermatozoides PLCζ positivos) con los tratamientos LL y TX, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; $n = 3$).

Tabla 1. Efecto del pretratamiento de espermatozoides bovinos con LL y TX sobre el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos generados por ICSI.

Tratamiento	Activación I _o + CHX	n	Clivaje n (%)	Blastocistos (%)	
				Ovocitos inyectados	Ovocitos divididos
Control ICSI-ST	+	345	183 (52) ^a	78 (22,6) ^a	78 (42,6) ^a
ICSI- LL	+	335	207 (62) ^{ab}	100 (28,7) ^b	100 (48,3) ^b
ICSI- TX	+	304	197 (66) ^b	82 (27,5) ^{ab}	82 (41,6) ^{ab}
Partenotes	+	351	147 (43) ^c	54 (16,5) ^c	54 (36,7) ^c
Control ICSI-ST	-	65	9 (5,8) ^d	0 ^d	0 ^d
ICSI- LL	-	70	2 (1,4) ^d	0 ^d	0 ^d
ICSI- TX	-	68	1 (0,7) ^d	0 ^d	0 ^d
Partenotes	-	95	0 ^d	0 ^d	0 ^d

Las tasas de división y blastocistos (12 réplicas) de ovocitos fecundados por ICSI con espermatozoides pretratados con LL y TX (0,05%) se registraron a las 72 h y 192 h, respectivamente. Datos seguidos de letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2. Efecto del pretratamiento de espermatozoides bovinos con LL y TX sobre la tasa de fertilización.

Tratamiento	Activación I _o + CHX	n	Formación pronuclear	Otras constituciones nucleares
Control ICSI-ST	+	53	38 (71,6)	15 (28)
ICSI- LL	+	48	37 (77,0)	11 (23)
ICSI- TX	+	51	39 (76,4)	12 (24)

Tasas de formación pronuclear registrada a las 19 hpa de ovocitos fecundados por ICSI con espermatozoides pretratados con LL y TX y activados de forma exógena con ionomicina (I_o) y cicloheximida (CHX).

DISCUSIÓN

Los tratamientos espermáticos propuestos con LL y TX logran efectivamente reaccionar los espermatozoides y la eliminación parcial del contenido acrosomal (Morozumi & Yanagimachi, 2005), lo que se evidencia en la evaluación de la variación de acrosina que se pierde en los espermatozoides antes de ser inyectados al ovocito. Esto confirma anteriores resultados donde determinamos mediante el ensayo de PNA/FITC que efectivamente luego de estos tratamientos se pierde el contenido acrosomal. El pretratamiento de espermatozoides con LL y TX previo a la ICSI con activación exógena aumenta las tasas de división y formación de blastocistos, respectivamente en embriones bovinos, resultados que concuerdan con un estudio realizado en ratas Wistar donde este tratamiento aumentó la eficiencia en esta especie (Seita *et al.*, 2009). A pesar de la pérdida significativa del factor espermático que activa al ovocito (PLC ζ), la estimulación exógena con ionomicina y cicloheximida logran suplir esta deficiencia y activar efectivamente al ovocito en el proceso ICSI. Los resultados en relación a la formación pronuclear muestran que los tratamientos realizados no son suficientes para mejorar este parámetro, lo que podría ser mejorado utilizando algún agente reductor capaz de mejorar la descondensación del núcleo del espermatozoide (Watanabe *et al.*, 2010).

CONCLUSIÓN

Los hallazgos de este estudio confirman que LL y TX eliminan el contenido acrosomal. Además, el tratamiento de espermatozoides con LL y TX previo a la ICSI aumentó las tasas de división y formación de blastocistos en embriones bovinos generados por ICSI, lo que representa una interesante propuesta para aumentar las tasas de desarrollo embrionario en esta especie.

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de CONICYT-Chile proyecto FONDECYT 1120241.

REFERENCIAS

- Garcia-Rosello E, Garcia-Mengual E, Coy P, Alfonso J, Silvestre MA. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod Domest Anim.* 2009;44(1):143-51.
- Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(47):17661-6.
- Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(40):14209-14.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340(8810):17-8.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 1995;44(6):859-69.
- Seita Y, Ito J, Kashiwazaki N. Removal of acrosomal membrane from sperm head improves development of rat zygotes derived from intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of reproduction and development.* 2009;55(5):475-9.
- Watanabe H, Suzuki H, Fukui Y. Fertilizability, developmental competence, and chromosomal integrity of oocytes microinjected with pre-treated spermatozoa in mice. *Reproduction.* 2010;139(3):513-21.