

## EL SEMEN PORCINO VITRIFICADO: ¿ES CAPAZ DE PRODUCIR EMBRIONES?

Arraztoa, C.C. y Neild, D.M.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Cs Veterinarias, INITRA, Cátedra de Teriogenología

### Introducción

La vitrificación es un proceso mediante el cual los líquidos adquieren un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo<sup>(5, 10, 11, 12)</sup>. Es un procedimiento simple que requiere menor tiempo y tiene mayor costo-beneficio que la congelación convencional, ya que no necesita equipo ni un operador altamente capacitado para ejecutarla y tanto el proceso de vitrificación como el de atemperado se realizan en segundos<sup>(13)</sup>. Sin embargo, este método utilizado con éxito en ovocitos y embriones mamíferos, no pudo extrapolarse de forma directa a los gametos masculinos<sup>(9)</sup>, debido a la elevada concentración de crioprotectores utilizada, las cuales provocan un efecto osmótico deletéreo<sup>(13)</sup> produciendo toxicidad y posibles alteraciones químicas en los espermatozoides<sup>(8)</sup>. Surgió entonces la alternativa de vitrificar espermatozoides utilizando velocidades de enfriamiento y atemperado muy rápidas, en un tamaño de muestra muy pequeño para evitar así las elevadas concentraciones de los crioprotectores<sup>(8)</sup>. Nuestro laboratorio ha vitrificado espermatozoides porcinos en ausencia de crioprotectores con el método de esferas, logrando conservar la condensación e integridad de la cromatina espermática<sup>(2, 3)</sup>. Estos resultados indicarían que la vitrificación espermática porcina, permitiría preservar los recursos genéticos de la especie, surgiendo como un modelo alternativo de criopreservación de la misma.

En la especie porcina, la producción de embriones mediante fertilización *in vitro* (FIV), utilizando ovocitos madurados *in vitro* (MIV) a partir de ovarios provenientes de faena, es limitada, debido a la alta incidencia de polispermia<sup>(4)</sup>. Por esta razón, la técnica de inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) se presenta como una herramienta alternativa para la producción *in vitro* de cigotos monospermicos en la especie<sup>(6)</sup>. Más aún, siempre y cuando el núcleo espermático conserve su integridad, la

ICSI permitiría obtener crías viables, independientemente de la concentración, morfología o movilidad espermáticas<sup>(14)</sup>.

### Nuestra experiencia

El Instituto INITRA cuenta en la actualidad con un Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (BID-PICT: 2013-0725): "*Aspectos morfológicos, bioquímicos y funcionales de las gametas porcinas sometidas a procesos de criopreservación: indicadores de competencia*", donde uno de sus objetivos se centra en evaluar, a través de parámetros bioquímicos, morfológicos y funcionales, la viabilidad de espermatozoides porcinos vitrificados. Por lo tanto, se ha analizado si los espermatozoides porcinos vitrificados en ausencia de crioprotectores utilizando el método de esferas, eran capaces de mantener la capacidad de producir cigotos *in vitro*, mediante la técnica ICSI.

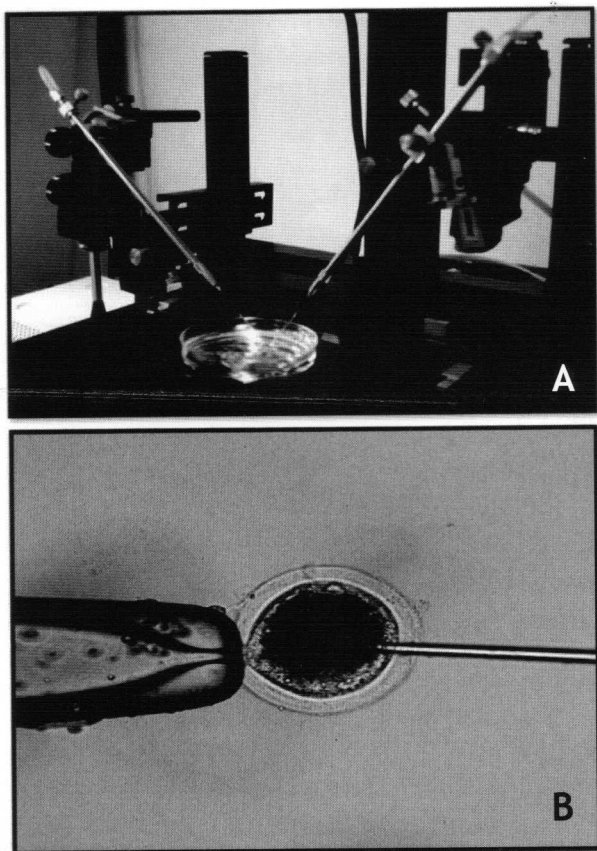
Para la ICSI, los complejos ovocitos-cumulus (COCs), provenientes de ovarios de faena, se maduraron *in vitro* en medio TCM-199 suplementado con cisteína, sulfato de gentamicina, hormona foliculo estimulante porcina (FSH), hormona luteínica porcina (LH) y 10% de líquido folicular<sup>(1)</sup>. La maduración se realizó a 39°C durante 48 h en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad. Una vez maduros, los ovocitos se desnudaron en solución de hialuronidasa 0,1%, se evaluaron bajo lupa estereoscópica y aquellos con corpúsculo polar visible (metafase II - MII) y citoplasma homogéneo fueron seleccionados para la ICSI. Se inyectaron espermatozoides de cerdo provenientes de semen fresco, mejorado por filtración a través de lana de vidrio, vitrificado en medio TALP (sin crioprotectores) + 1% BSA (grupo tratamiento). El semen fue vitrificado en esferas a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml y fue atemperando de forma rápida a 37°C durante 30 seg<sup>(2)</sup>. También se inyectaron espermatozoides

diluidos en medio BTS y conservados a 17°C (grupo control). Por otro lado, se realizó la maniobra de Sham (inyección de ovocitos sin depósito de espermatozoide) para evidenciar presencia de activación partenogénica.

La microinyección se realizó en un microscopio invertido Leica® DMIL equipado con micromanipuladores Narishige®. Brevemente: un espermatozoide fue inmovilizado, aplastando su pieza intermedia con la aguja de inyección y aspirado desde el flagelo. El ovocito maduro en MII fue sujetado con la aguja de contención, posicionando el corpúsculo polar en la posición de las 12 ó 6 horas reloj, para evitar dañar la placa metafásica con la inyección. La aguja de inyección atravesó la zona pelúcida y el oolema llegando al citoplasma (esto se comprobó aspirando una pequeña cantidad del mismo) e inmediatamente el espermatozoide fue depositado dentro del citoplasma (Figura 1).

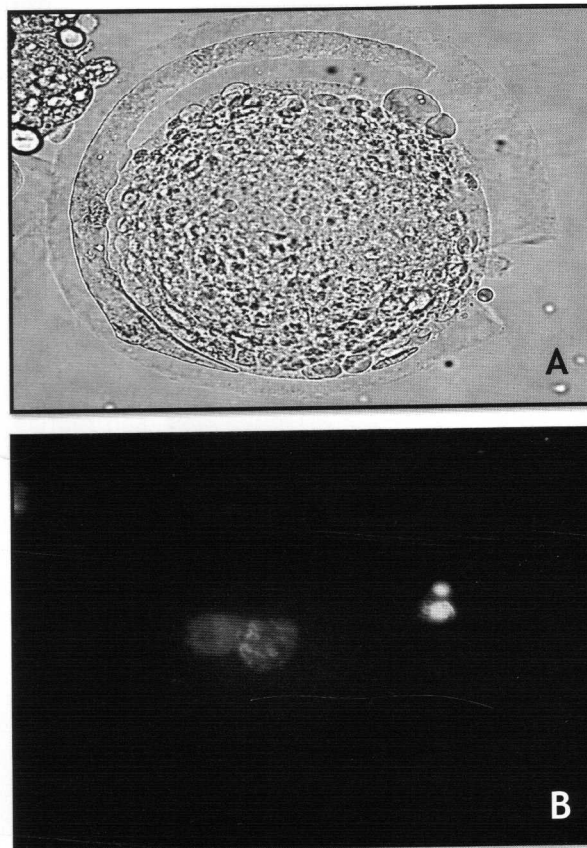
Los ovocitos inyectados fueron mantenidos en medio de cultivo comercial libre de suero: G1<sup>(7)</sup> durante 18 h, a 38°C, 100% de humedad y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La presencia de pronúcleos (PN) se analizó fijando y tiñendo los presuntos cigotos con Hoechst 33342 y utilizando para

**Figura 1.** A: microscopio invertido Leica® DMIL con micromanipuladores Narishige®. B: microinyección de un espermatozoide en un ovocito maduro (MII). Se puede observar el cuerpo polar ubicado a las 12 h.



su observación un microscopio de epifluorescencia Leica® modelo DMLS con los filtros correspondientes<sup>(4)</sup> (Figura 2). Los datos del monitoreo embrionario hasta estadios de PN fueron analizados utilizando una comparación de proporciones, considerando significativo un valor de  $P < 0,05$ .

**Figura 2.** Presencia de PN en ovocito inyectado con un espermatozoide vitrificado-atemperado. A: campo claro. B: tinción con Hoechst 33342.



### Nuestros resultados

No se presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre el porcentaje de cigotos obtenidos a partir de ovocitos inyectados con semen diluido y mantenido a 17°C (35,5%, 32/90) y aquellos inyectados con espermatozoides vitrificados-atemperados (31,8%, 36/113). La presencia de PN en los ovocitos sometidos a Sham fue nula (0%, 0/30).

La vitrificación espermática porcina permitiría conservar espermatozoides con cromatina condensada e intacta, capaces de producir desarrollo embrionario temprano hasta el estadio de pronúcleos, por medio de la técnica ICSI. Sería interesante evaluar a futuro el avance de dicho desarrollo embrionario *in vitro* y la posibilidad de obtener estadios embrionarios transferibles a útero.

## Bibliografía

1. Abeydeera L.R. In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod. Suppl.*, 2001; 58:159-173.
2. Arraztoa C.C., Miragaya M., Pendola C., Gambarotta M., Neild D.M. Boar sperm vitrification. 2012. *InVet* 14(2): 254.
3. Arraztoa C.C., Neild D.M. Vitricación: ¿Una nueva alternativa de criopreservación espermática? *Taurus* 2014; 17 (65): 22.
4. 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.
5. Gao D., Critser J. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal* 2000; 41 (4): 187-196.
6. García Rosello E., García Mengual E., Coy P., Alfonso J., Silvestre M. Review article: Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: An Update. *Reprod. Dom. Ani.* 2008; 44: 143-151.
7. Gardner D.K., Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod.*, 1997; 3(4): 367-382.
8. Isachenko E., Isachenko V., Katkov I., Dessolet S., Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. BioMed. Online* 2003; 6: 191-200.
9. Isachenko V., Isachenko E., Katkov I.I., Montag M., Dessolet S., Nawroth F., Van der Ven H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 1167-1173.
10. Katkov I., Isachenko V., Isachenko E., Kim M., Lulatd A., Mackaye A., Levine F. Low-and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. *Int. J. Refrig.* 2006; 29: 346-357.
11. Kumar Gupta M., Jun Uhm S., Taek Lee H. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* 2007; 67: 238-248.
12. Luyet B., Hodapp R. Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Meet. Soc. Exp. Biol.* 1938; 39: 433-434.
13. Sánchez R., Risopatrón J., Schulz M., Villegas J., Isachenko V., Kreinberg R., Isachenko E. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 2011; 43: 233-241.
14. Yanagimachi R. Male gamete contribution to the embryo. *Annals NY Acad. Sci.* 2005; 1061: 203-207.



**BALANCE** en las curvas de crecimiento

Genética de la VACA

MERCADO

GENÉTICA PRODUCTIVA

Capacidad REPRODUCTIVA

FERTILIDAD

AMBIENTE PRODUCTIVO

ARGENTINA FUNDACION

Kg/Ha

MANEJO NORMAL

**CREAMOS SOLUCIONES**

CARHUE-BUENOS AIRES-ARGENTINA

[54] 2936-430110 / 2923-15-425513

**CABA**

CENTRO ARGENTINO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL

**CABA NORTE**

[www.centrocaba.com.ar](http://www.centrocaba.com.ar)

info@centrocaba.com.ar - narbaltzjm@hotmail.com.ar