EFECTO DEL TRATAMIENTO ESPERMÁTICO CON TRITON X-100 EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

García-Mengual, E. [1], Alfonso, J.[2], García-Roselló, E.[3], Salvador, I.[1], Silvestre, M.A.[1]

[1]Centro de Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA), Segorbe, Castellón. egarcia@ivia.es
[2] Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia.
[3]Dpto. Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad CEU-Cardenal Herrera. Edificio Seminario s/n 46113 Moncada-Valencia.

INTRODUCCIÓN

Con la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se evitan ciertos procesos que se dan en la fecundación *in vivo*, como la capacitación, la reacción acrosómica o la fusión de membranas. La cromatina entra en el ooplasma junto con el material perinuclear, el acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide. Aunque todos estos componentes se suelen desintegrar dentro del citoplasma del oocito, se ha sugerido que podrían interferir en la remodelación de la cromatina espermática, sustitución de las protaminas por histonas y desmetilación de la cromatina paterna.

En comparación con lo obtenido en otras especies, la ICSI en porcino no está del todo consolidada, y esto es en parte debido a características intrínsecas del espermatozoide de porcino, ya que tras la ICSI, en la mayoría de trabajos publicados, el núcleo espermático no es capaz de descondensar de forma espontánea para formar el pronúcleo (PN) masculino, y esto da lugar a bajas tasas de fecundación (Lee y Yang, 2004). Para mejorar la formación pronuclear tras la ICSI de oocitos de vacuno y de porcino se han ensayado diferentes tratamientos espermáticos, que generalmente tienen como objetivo inmovilizar el espermatozoide y desestabilizar la membrana espermática: a) golpear la cola del espermatozoide con la pipeta de inyección (Dozortsev *et al*., 1995); b) congelar/descongelar el espermatozoide sin crioprotector (Tian *et al*., 2006); c) aplicar pulsos piezoeléctricos con la pipeta de microinyección en el espermatozoide (Katayama *et al*., 2005); d) tratamiento del espermatozoide con ditiotreitol (DTT; reduce los puentes disulfuro de las protaminas que compactan el ADN espermático) (Watanabe y Fukui, 2006); e) tratamiento del espermatozoide con Triton X-100 (TX-100) (detergente aniónico que produce daños en la membrana y el acrosoma (Kimura *et al*.,1998).

El tratamiento del espermatozoide con TX-100 parece ser una de las alternativas más atractivas, ya que además de desestabilizar la membrana eliminaría el acrosoma que también interfiere la descondensación de la cromatina espermática tras la ICSI en porcino (Katayama *et al*., 2002). El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del tratamiento del espermatozoide con TX-100 en la viabilidad embrionaria tras la ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ovarios de cerdas prepúberes procedentes de matadero se transportaron al laboratorio a 39ºC en solución salina. Los complejos cúmulo-oocito se recuperaron mediante la punción folicular de folículos de entre 3 y 7 mm de diámetro. Una vez recuperados y catalogados los oocitos se maduraron *in vitro* en TCM199 durante 44 horas a 38ºC, 5%CO_2 y 5%O_2 según el protocolo descrito por Silvestre *et al*. (2007). Las primeras 22h de maduración el medio se suplementó con hormonas (FSH y LH recombinante), y las siguientes 22h se cultivó en el mismo medio sin hormonas. Tras el proceso de maduración los oocitos se denudaron con hialuronidasa al 0,1% y se consideraron oocitos MII maduros aquellos que habían extruido el primer corpúsculo polar.

El semen utilizado fue refrigerado y adquirido en un núcleo de inseminación artificial. Con el fin de recuperar espermatozoides vivos y móviles, fue centrifugado a 50*g* durante 3 min. El sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación de 1250*g* durante 4 min y el sedimento se resuspendió en TCM199 Hepes suplementado con suero (HM199) y se preservó a temperatura ambiente hasta su utilización (semen control).

Para el tratamiento del espermatozoide con TX-100, la fase superior (1-2 ml) del semen control (con mayor porcentaje de espermatozoides mótiles) se separó y se añadió TX-100 al 0,1%, se agitó en el vortex 1 min y se lavó con HM199, centrifugándolo a 500*g* durante 5 min. El sedimento se resuspendió en HM199.

Diseño experimental: Se dividieron aleatoriamente los oocitos MII en dos grupos homogéneos: **1)** ICSI convencional y **2**) ICSI con espermatozoides tratados con TX-100. La ICSI se realizó según García-Roselló *et al*. (2006) con ligeras modificaciones. Inmediatamente antes de la microinyección, se mezclaron en una microgota de 10µl de PVP al 10% dependiendo del grupo, 5µl de la suspensión espermática control o de los espermatozoides tratados con TX-100. Para la ICSI convencional se seleccionó un espermatozoide móvil y se inmovilizó golpeando la cola con la pipeta de microinyección. En el caso de la ICSI con espermatozoides tratados con TX-100 esto no fue necesario ya que todos los espermatozoides estaban inmóviles. Se microinyectó un solo espermatozoide por oocito en una microgota (10µl) de HM199 cubierta con aceite mineral.

Posteriormente a la ICSI, el cultivo embrionario se llevó a cabo en grupos de 20 a 30 oocitos en 500µl de PZM3 suplementado con albúmina sérica bovina y cubierto con aceite mineral a 38ºC, 5% de CO_2 y 5% de O_2. Las tasas de división y de formación de blastocistos se valoraron a las 48 y 168 h post-ICSI respectivamente. Con el fin de contar el número de células, aquellos embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto fueron fijados y teñidos en etanol absoluto con Hoechst 33342 y se observaron con un microscopio equipado con fluorescencia.

Los resultados obtenidos para tasa de división y tasa de formación de blastocistos se compararon usando el test Chi-cuadrado, mientras que el número de células por blastocisto fue analizado con el test de ANOVA. Se realizaron tres réplicas para cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento del espermatozoide con TX-100 en la viabilidad embrionaria tras la ICSI. El TX-100 es un detergente aniónico capaz de disolver proteínas nucleares y dañar la membrana espermática (Szczygiel y Ward, 2002). Por un lado, el tratamiento de los espermatozoides con TX-100 facilitaría la descondensación de la cabeza del espermatozoide, ya que dejaría más expuesto el núcleo espermático (sin la presencia de membranas) a los factores citoplasmáticos y al factor promotor de la metafase (MPF), acelerando la reorganización del núcleo espermático y los orgánulos dentro del ooplasma (Lee y Yang, 2004). Por otro lado, el tratamiento de TX-100 puede interrumpir, en algún grado, la estructura nuclear (integridad del ADN) del espermatozoide (Szczygiel y Ward, 2002), el cual afectaría negativamente al desarrollo de los embriones generados mediante ICSI.

En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas ni en la tasa de división, ni en la tasa de formación de blastocistos entre los dos grupos experimentales. Tampoco se observaron diferencias significativas en el número medio de células por blastocisto (Tabla 1).

En la bibliografía, existen trabajos que describen un incremento en el desarrollo embrionario tras un tratamiento del espermatozoide con TX-100 (Lee y Yang, 2004). Sin embargo, esta mejora significativa respecto al grupo control solo fue observada en aquellos

casos en los que se reforzaba la ICSI con una activación exógena (pulso eléctrico). Otros autores solo observaron un incremento en la tasa de fecundación normal (2PN) tras el tratamiento del espermatozoide con TX-100 en comparación con el DTT o la congelación sin crioprotector de los espermatozoides, sin embargo no vieron diferencias en el número de blastocistos, ni en el número de células medio por blastocisto. (Tian *et al.,* 2006). En este sentido, Nakai *et al*. (2006) tampoco observaron ningún incremento en el desarrollo embrionario, sin aplicar ninguna activación adicional.

Los resultados del presente trabajo están en concordancia con los trabajos citados, ya que en nuestro caso no aplicamos ningún tratamiento de activación adicional. Todo parece indicar que el estudio de los tratamientos del espermatozoide deben realizarse en combinación con el estudio de los diferentes protocolos de activación, intentando optimizar la exposición del núcleo del espermatozoide a niveles altos de MPF, los cuales están íntimamente ligados tanto al envejecimiento del oocito como al momento de activación oocitaria.

Tabla 1. Efecto de un tratamiento del espermatozoide con TX-100.

		ICSI		
	Total oocitos MII	Divididos (%)	Blastocistos (%)[a]	Nº células ± ES
Control	119	98 (82,4)	10 (10,2)	31,78 ± 7,7
TX-100	74	65 (87,8)	4 (6,15)	28,25 ± 11,6

[a] en relación a los divididos

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P. Human Reprod 1995; 10: 2960-2964.

Garcia-Rosello E, Coy P, Garcia Vazquez FA, Ruiz S, Matas C. Theriogenology. 2006; 66:1857-1865.

Katayama M, Koshida M, Miyake M. Hum Reprod. 2002;17:2657-2664.

Katayama M, Sutovsky P, Yang BS, Cantley T, Rieke A, Farwell R, Oko R, Day BN. Reproduction. 2005; 130:907-916.

Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H. Biol Reprod. 1998; 58:1407-1415.

Lee JW, Yang X. Mol Reprod Dev. 2004; 68:96-102.

Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. Reproduction. 2006; 131:603-611.

Szczygiel MA, Ward WS. Biol Reprod. 2002; 67:1532-1537.

Silvestre MA, Alfonso J, Garcia-Mengual E, Salvador I, Duque CC, Molina I. J Anim Sci. doi: 10.2527/jas.2006-645

Tian JH, Wu ZH, Liu L, Cai Y, Zeng SM, Zhu SE, Liu GS, Li Y, Wu CX. Theriogenology. 2006; 66:439-448.

Watanabe H, Fukui Y. Theriogenology. 2006; 65:528-539.

Este trabajo ha sido financiado por la Generalitat Valenciana, Consellería d'Empresa, Universitat i Ciencia (GV05/212).