PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES CAPRINOS MEDIANTE INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES DE OOCITOS PREPÚBERES Y SU RELACIÓN CON LA CAPACITACIÓN SEMINAL

Menéndez-Blanco, I., Soto, S., Català, M. G., Roura, M., Izquierdo, D. y Paramio, M. T.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. España. Teresa.Paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

La producción de pequeños rumiantes es una importante actividad comercial en España que se encuentra en auge dado el interés actual en la producción de leche de especies caprinas y ovinas. La producción in vitro de embriones (PIVE) puede ser una tecnología de gran interés para mejorar las propiedades genéticas de los rebaños. Además la PIVE tiene grandes aplicaciones biotecnológicas y en el investigación de la transgénesis (Revisado por Paramio e Izquierdo, 2014). La calidad del oocito es un factor primordial para el éxito de la PIVE, tanto de los embriones producidos mediante Fecundación in vitro (FIV) como por Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI). Existen distintas metodologías para producir embriones por ICSI. En nuestro laboratorio con oocitos de caprino Jiménez-Macedo et al. (2005) concluyó que el sistema más adecuado era preparar los espermatozoides mediante swim-up en medio mDM y su posterior incubación con heparina y una vez inyectado, activar el oocito con DMAP e ionomicina. Estudios recientes como el de Anzalone et al. (2016), realizada con la especie ovina, demuestran el efecto que tiene la capacitación de los espermatozoides antes de la ICSI sobre el desarrollo embrionario. La fosforilación de la tirosina es un evento clave para la evaluación de la capacitación seminal en la especie caprina. La localización de la fosforilación de la tirosina es también un factor muy importante. En espermatozoides de rata la fosforilación en la zona acrosomal es característica de espermatozoides inmaduros (Chatterjee et al. 2010) y el marcaje del flagelo en numerosas especies denota hipermotilidad. A su vez el subsegmento ecuatorial, definido como un área rica en tirosina fosforilada, ha sido propuesto como un centro organizador involucrado en la fusión de los gametos (Jones et al. 2008). El objetivo del presente trabajo es estudiar con oocitos de cabras prepúberes el efecto de distintos tratamientos de capacitación de semen fresco sobre la formación del pronúcleo masculino después de la ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cabras prepúberes fueron recogidos del matadero. Los oocitos fueron obtenidos mediante el método de slicing en medio TCM199 con heparina a una concentración de 0.1g/L y antibiótico-antimicótico al 2% (Invitrolife). Los oocitos seleccionados se incubaron en gotas de 100 µl de medio BO-IVM (IVF Bioscience; BO-IVM, UK) cubiertas con aceite mineral a 38.5% en atmósfera húmeda y 5% CO_2 durante 26 horas. El semen fresco se obtuvo mediante vagina artificial de machos con fertilidad probada. El semen fue seleccionado con la ayuda de un gradiente de densidad comercial (Ovipure gradiente de densidad; NIDACON EVB S.L, Barcelona, España) con una centrifugación de 25 minutos a 300 g. Una vez seleccionados los espermatozoides más viables, que se encuentran en el fondo del tubo, se formaron 2 grupos experimentales. Grupo 1: los espermatozoides seleccionados por el gradiente se prepararon directamente para la ICSI. Grupo 2: Los espermatozoides seleccionados son capacitados mediante su incubación con 10µM de heparina y 200nM de ionomicina durante 20 minutos a 38.5% en atmósfera húmeda y 5% CO_2. Para llevar a cabo la ICSI los oocitos, después de la MIV, fueron denudados mediante pipeteo y aquellos con visualización del Corpúsculo Polar fueron seleccionados para la ICSI. Estos oocitos se colocaron en una gota de 10 µl de BO-IVF (IVF Bioscience; BO-IVF, UK) para ser microinyectados. Una pequeña cantidad de espermatozoides se transfirió a una gota de 3 µl de SpermSlow™ médium (Origio, Denmark). Un sólo espermatozoide seleccionado en la gota de SpermSlow™ es inyectado en cada uno de los oocitos maduros. Se utilizó un grupo inyectado sin espermatozoides (grupo SHAM) como grupo control. Tras la microinyección los oocitos fueron lavados en

medio BO-IVC (IVF Bioscience; BO-IVC, UK) y fueron cultivados en ese mismo medio en microgotas de 10µl, con un máximo de 10 oocitos por gota, a 38.5% en atmósfera húmeda, 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2. Después de 17 horas de cultivo, los presuntos cigotos fueron teñidos con Hoechst 33342 (Invitrogen) al 1% en etanol durante un mínimo de 3h en oscuridad a 4ºC y fueron visualizados en el microscopio a 460nm para observar el estado nuclear. Los presuntos cigotos se clasificaron en 4 grupos: Sin pronúcleos (SP) cuando se observaba la metafase y la cabeza intacta del espermatozoide; con pronúcleo femenino (PF) cuando se observaba un pronúcleo femenino con la cabeza sin descondensar del espermatozoide; pronúcleo masculino (PM) cuando se observaba la metafase y un pronúcleo junto a la cola del espermatozoide; con pronúcleos femenino y masculino (P2) cuando se observan 2 pronúcleos. Se analizaron los distintos patrones de capacitación de los espermatozoides antes de la ICSI, mediante la inmunolocalización de la fosforilación de la tirosina siguiendo el protocolo descrito por Luño et al. 2013. Las muestras se bloquearon en PBS con BSA a una concentración de 0.4%. Se utilizó Rabbit anti-mouse IgG Fc (Thermo Fisher) como anticuerpo secundario a una concentración 1:200. La clasificación de los distintos patrones se lleva a cabo según la localización de la fosforilación en distintas áreas del espermatozoide. Patrón I; capacitación baja: señal en zona acrosomal. Patrón II; capacitación media: señal en subsegmento ecuatorial. Patrón III; capacitación alta: señal tanto en la zona acrosomal como en el subsegmento ecuatorial. Todos los patrones pueden ir acompañados del marcaje del flagelo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con el procedimiento de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., EE.UU.). Las medias fueron comparadas con LSMEAN y ajustadas por TUKEY.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, que recoge el efecto de los distintos tratamientos espermáticos previos a la ICSI, se observa un mayor porcentaje de espermatozoides altamente capacitados en el grupo 2 ($P<0,05$). En la tabla 2 se observa el estadio de los pronúcleos masculino y femenino de 85 cigotos procedentes de ICSI. En estos cigotos se observa que más de la mitad presentan los 2 pronúcleos desarrollados lo que indicaría la correcta formación del cigoto. En el resto de los cigotos se observa un mayor porcentaje con el pronúcleo femenino formado (PF) que cigotos con el masculino formado (PM). El resto de los cigotos no han formado ninguno de los dos pronúcleos, observándose la metafase II del oocito y la cabeza del espermatozoide. 15 oocitos inyectados sin espermatozoide (Sham) fueron empleados para hacer un control de la técnica y en todos se observó la metafase II. Con estos resultados podemos concluir que los tratamientos de capacitación de los espermatozoides previos a la ICSI no tienen ningún efecto sobre la formación del pronúcleo masculino, ni sobre la formación de cigotos normales. En consecuencia podríamos deducir que la ICSI nos permitiría realizar estudios de competencia del oocito para su desarrollo in vitro sin interferencias con la variable espermática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Anzalone, D. et al. 2016. J. Assist. Reprod. Genet. 33(6), 757–763. • Chatterjee, M. et al. 2010. Mol. Cell. Biochem. 336(1–2), 39–48. •Jiménez-Macedo, A. R. et al. 2005. Theriogenology. 64(6), 1249–1262. • Jones et al. 2008. Biol. Reprod. 79; 421-431. • Luño, V. *et al*. 2013. Reproduction. 146:315–24. •Paramio, M., e Izquierdo, D. 2014. Reprod. Dom. Anim. 49 (Suppl. 4), 37–48.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2014-52408-R y una beca predoctoral concedida a Irene Menéndez Blanco por el Ministerio de Educación Cultura y Deporte de España (Referencia: FPU15/00773).

***Tabla 1**. Efecto de los distintos tratamientos de los espermatozoides antes de la ICSI sobre el patrón de fosforilación de la tirosina en semen caprino.*

Tratamiento	N	Patrón I	Patrón II	Patrón III
Grupo 1	600	5.67±4.04	58.17±4.91[a]	36.17±2.09[a]
Grupo 2.	600	1.50±0.29	30.17±2.05[b]	68.34±1.96[b]

Los porcentajes están representados como $\bar{X}$ ± SEM. *Los valores con diferente letra en la misma columna difieren significativamente (P<0,05). Los grupos 1 y 2 corresponden a los distintos tratamientos del semen.*

***Tabla 2**. Evaluación del estado nuclear de los presuntos cigotos 17 horas post-inyección.*

Tratamiento	N	S**P**	**P**M	**P**F	**P**2
Grupo 1	41	13.45±8.48	2.85±2.85	19.35±8.26	64.34±6.43
Grupo 2.	44	32.20±4.93	2.22±2.22	5.81±3.96	59.76±3.87

Los porcentajes están representados como $\bar{X}$ *± SEM. Los grupos 1 y 2 corresponden a los distintos tratamientos del semen. SP: Sin pronúcleos; PF: pronúcleo femenino; PM: pronúcleo masculino; P2: formación ambos pronúcleos.*

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION OF EMBRYOS FERTILIZED BY INTRACYTOPLASMATIC SPERM INJECTION (ICSI) WITH OOCYTES FROM PREPUBERTAL GOATS AND ITS RELATION TO SPERM CAPACITATION.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of different sperm capacitation treatments on the development of male pronuclei in prepubertal goat oocytes fertilized by ICSI. We studied the expression of different tyrosine phosphorylation patterns in two groups of sperm treatment. In the first group sperm was selected by a commercial density gradient and in the second group sperm were also incubated with 10 µM heparin and 200nM ionomycin. Before ICSI, prepubertal goat oocytes were IVM in BO-IVM (IVF Bioscience; BO-IVM, UK) for 26h. After maturation, oocytes with Polar Body were fertilized by ICSI with spermatozoa from both treatments. Results showed differences in the level of capacitation of both sperm treatment groups. Group 2 showed more patter III (high capacitation level) sperm than group 1 (68.34% vs. 36.17% respectively; P (P<0,05). 85 presumptive zygotes were assessed by Hoechst to analyze the pronuclei formation. Any differences were found regarding nuclear stages of zygotes produced by ICSI with two different sperm treatment. In both groups more than 50% of the zygotes were able to form both pronuclei. In conclusion, the sperm treatments have affected the capacitation parameters but these changes have not affected the pronuclear formation of ICSI derived zygotes.

Keywords*:* goat; oocyte; ICSI; sperm.