EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL, CAPACIDAD DE CRIOPRESERVACIÓN Y FERTILIDAD DE UN VERRACO TPC2 KO

Navarro-Serna[1], S., Piñeiro-Silva[1], C., Almela[3], L., Poto[3], A. Parrington[2], J., Romar[1], R. y Gadea[1], J.
[1]Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. IMIB-Arrixaca. [2]Dept Pharmacology, Universidad de Oxford, Oxford, UK. [3]IMIDA-Murcia; jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

El canal de calcio Two pore channel 2 (TPC2) se encuentra en las membranas endolisosomales (Galione *et al*., 2011) y participa en diversos procesos fisiopatológicos (Zong *et al*., 2009), siendo este un gen candidato para su estudio en modelos animales para trasladar los conocimientos sobre su funcionalidad al humano. Recientemente hemos generado los primeros cerdos knock-out (KO) de TPC2 mediante inyección de CRISPR/Cas9, generando 3 animales (1 macho y 2 hembras) homocigotos KO (Navarro-Serna *et al.* 2021). Para poder difundir el material genético de estos animales, se necesita verificar la calidad seminal y su capacidad de conservación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de conservación del semen del verraco KO para TPC2 mediante congelación analizando la calidad espermática previa y posterior a un proceso de congelación-descongelación y también evaluar la capacidad fecundante mediante inseminación artificial (IA) con semen refrigerado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de conservación, se evaluaron 3 eyaculados de un verraco KO-TPC2 diluidos en Beltsville Thawing Solution (BTS) (F) y después de la congelación-descongelación (FT). Los eyaculados fueron congelados mediante el método descrito por Thiman 1997 y conservados en nitrógeno líquido hasta su evaluación. Se evaluaron diversos parámetros de calidad espermática como la motilidad mediante el sistema CASA, el estado acrosomal (NAR) mediante microscopia de contraste de fases, la vitalidad (V) y la actividad mitocondrial (AM) por citometría de flujo, tiñendo con yoduro de propidio y rodamina 123, respectivamente (Harrison *et al.* 1993). Para la evaluación de fertilidad, se realizó una prueba de IA en 6 cerdas nulíparas, con doble inseminación a las 0 y 24 h tras la detección de celo con dosis seminales refrigeradas de 3x 10^9 espermatozoides. Se evaluó porcentaje de gestación (%G), media de lechones nacidos vivos (NV), nacidos muertos (NM), totales (T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a la conservación, se observa una disminución significativa ($p<0.05$) de motilidad total (85,0±2,2% vs 45,9±2,8%), NAR (98,0±0.6% vs 72,5±2,3%), V (86,5±1,9% vs 63,6±1,3%) y AM (70,1±2,6% vs 54,1±1.8%) y un aumento de VCL (52,4±4,9 vs 91,2±3,2 µm/s), VSL (14,9±1,3 vs 26,0±1,0 µm/s) y VAP (30,7±3,9 vs 50,3±2,2µm/s). Tras su uso en IA, %G fue del 66,7% (4/6), con una media de NV de 12,0±1,1, NM de 1,0±0,4, T de 13,0±0,9. Estos resultados confirman la posibilidad de usar técnicas de refrigeración y congelación para difundir el material genético de este macho KO, y sugiere que la supresión de TPC2 no afecta negativamente a la calidad seminal y no es esencial para la fertilidad. En futuros estudios deberá analizarse si existen fenómenos de compensación.

CONCLUSIÓN

El KO para la proteína TPC2 en SPZ de cerdo no parece ser esencial para la fertilidad, lo cual permite su uso para realizar IA y poder conservar esta modificación génica realizada para posteriores estudios. Por otro lado, la buena calidad seminal y capacidad de congelación de este verraco permite la posibilidad de que su eyaculado congelado pueda ser conservado y también comercializado, permitiendo trasladar variantes genéticas sin los problemas logísticos y legales del traslado de animales vivos modificados genéticamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Galione, A., *et al.* 2011. Sci. China Life Sci. 54: 725-732. • Harrison, R., *et al.* 1993. Mol. Reprod. Dev. 35: 197-208. • Navarro-Serna, S., *et al.* 2021. Crispr J. 4: 1-16. • Zong, X., Pflügers Archiv. – Eur. J. Physiol., 458: 891–899. • Thilmant, P., *et al.* 1997. JRP de France 39: 295.

Agradecimientos: Proyectos MINECO AGL2015- 66341-R, Fundación Seneca Región de Murcia 20040/GERM/16 y 21105/PDC/19 Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por las ayudas para la Formación de Profesorado Universitario.