

SISTEMA OPTIMIZADO PARA LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES PORCINOS Y EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA EN SU RENDIMIENTO

Navarro-Serna^{1,2}, S., París-Oller^{1,2}, E., Gadea^{1,2}, J. y Romar^{1,2}, R.

¹Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. Murcia 30.100 ²MIB-Arrixaca; romar@um.es

INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas avanzadas en la generación de cerdos modificados genéticamente requiere de la producción y manipulación de un número elevado de embriones porcinos en estadio de cigoto de alta calidad. Estos embriones pueden producirse *in vivo*, y recogerse del oviducto mediante técnicas quirúrgicas o tras el sacrificio del animal (Gadea et al. 2018 y este número), o bien *in vitro* a partir de ovocitos recogidos de ovarios de animales procedentes de matadero, madurados y fecundados *in vitro* (revisado por Romar et al. 2016). Estos sistemas *in vitro* precisan de una optimización con el objetivo de incrementar su rendimiento y obtener un mayor número de cigotos con un mejor potencial de desarrollo embrionario. Estas mejoras pasan por aproximar las condiciones *in vitro* a las que los gametos encuentran *in vivo* lo que implica reducir sensiblemente las concentraciones de oxígeno (García-Martínez et al. 2018), seleccionar los espermatozoides mediante un sistema de swim-up, para reducir el daño espermático, y emplear semen congelado en lugar de refrigerado ya que aumenta notablemente la repetitividad de resultados al evitar la variabilidad generada por la distinta calidad seminal presente entre verracos e incluso entre eyaculados del mismo individuo.

La viabilidad de un sistema con estas características en la producción de embriones transgénicos se puede valorar inyectando en el citoplasma de los cigotos sgARN y Cas9 (en forma de RNA o proteína) mediante el uso de un equipo de micromanipulación similar al que se usa en la técnica ICSI, y posteriormente cultivando los embriones hasta el momento de su estudio o transferencia a cerdas receptoras.

En este trabajo se analizó la eficiencia de un sistema de producción *in vitro* de cigotos y embriones con condiciones optimizadas durante la maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo embrionario (CE) y se valoró el posible efecto dañino que la inyección de los presuntos cigotos con PBS puede tener en el ulterior desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) porcinos fueron obtenidos de ovarios procedentes de matadero y sometidos a MIV en medio NCSU-37 durante 40-44h (Cánovas et al. 2017). Tras la MIV, los COCs fueron parcialmente desnudados e inseminados en medio TALP con semen eyaculado congelado seleccionado mediante la técnica de swim-up empleando medio NaturARTs-PIG sperm swim-up (EmbryoCloud, Murcia, Spain) a una concentración entre 30.000-40.000 espermatozoides/ml.

A las 10-12h post-inseminación, todos los cigotos se transfirieron a PBS, la mitad de ellos fueron microinyectados con PBS y la otra mitad no se microinyectó (grupo control). A continuación todos los cigotos continuaron el cultivo en TALP hasta las 18-20 h post-inseminación. En este punto, una alícuota de los presuntos cigotos de cada grupo se seleccionó de forma aleatoria para ser fijados en glutaraldehído, teñidos con Hoechst y evaluados mediante microscopía de fluorescencia para determinar los resultados de la FIV (Cánovas et al. 2017) obteniéndose datos de porcentaje de penetración, número de espermatozoides por ovocito, número de pronúcleos masculinos, tasa de monospermia y rendimiento de la FIV. El resto de los presuntos cigotos fueron cultivados en medio NCSU-23 (Petters y Wells, 1993) suplementado con lactato y piruvato durante 24h tras las cuales se evaluó el porcentaje de embriones en 2-4 células (% cleavage). Los embriones divididos se cultivaron en medio NCSU-23, reemplazando el lactato-piruvato por glucosa, durante 6 días más tras los que se evaluó el porcentaje de blastocistos obtenidos. Las condiciones de cultivo durante la MIV, FIV y CE fueron 38,5°C, 5% CO₂ y 7% O₂ (García-Martínez et al. 2018). Se compararon las tasas de cleavage y formación de blastocistos entre grupos mediante el test de chi cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de penetración evaluada en 515 ovocitos fue del 83,3%, con una tasa de monospermia del 42,0%, lo que arroja un porcentaje de presuntos cigotos (rendimiento de FIV) del 35,0%. Los ovocitos presentaron una media de $2,1 \pm 0,1$ espermatozoides/ovocito de los que $1,3 \pm 0,1$ eran pronúcleos masculinos.

Tras el proceso de inyección, el porcentaje de división temprana (cleavage %) fue de 63,2% (246/389) siendo similar al del grupo control (67,4%, 285/423; $p=0,23$). Sin embargo, la tasa de formación de blastocistos fue sensiblemente inferior con valores de 30,1% vs. 40,4% ($p=0,014$) blastocistos/cleavage y 19,0% vs. 27,2% ($p=0,006$) blastocistos/zigotos respectivamente para cigotos microinyectados y control (no microinyectados).

Los rendimientos obtenidos en el proceso de producción de embriones son superiores a los descritos en la bibliografía (revisado por Romar et al. 2016). La optimización de todo el sistema de MIV-FIV-CE con una adecuación de los valores de O_2 y CO_2 a niveles fisiológicos detectados *in vivo* en el oviducto y útero de cerdas (García-Martínez et al., 2018) permite mejorar tanto las tasas de cleavage como de formación de blastocistos. Por otra parte, el uso de semen congelado en un sistema de swim-up facilita la estandarización del sistema y reduce notablemente la variabilidad entre replicados.

El efecto lesivo del proceso de inyección observado sobre el cigoto puede estar relacionado con los cambios de temperatura y condiciones de cultivo al transportar los cigotos desde el incubador hasta el microscopio donde serán inyectados, la iluminación de los mismos necesaria para su observación (Martínez Soto et al. 2008), el efecto mecánico de la sujeción del cigoto con una pipeta donde se ejerce un vacío y la rotura de la zona pelúcida y el olema con la aguja de microinyección, como previamente se ha evidenciado en el uso de la técnica ICSI en la especie porcina (revisado por García-Roselló et al. 2009).

La posibilidad de obtener cerca de un 20% de blastocistos de los cigotos inyectados con este sistema optimizado permite generar un elevado número de embriones modificados genéticamente en una sesión de trabajo, en la que se pueden manejar fácilmente hasta 600 ovocitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cánovas S, Ivanova E, Romar R, García-Martínez S, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA, Saadeh H, Andrews S, Kelsey G & Coy P. 2017. DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife* 6:e23670. • Gadea J, García-Vázquez FA, Hachem A, Bassett A, Romero-Aguirregomezcorta J, Cánovas S, Romar R & Parrington J. 2018. Generation of TPC2 knock out pig embryos by CRISPR-Cas technology. *Reprod Animals* 53: 87-88. • García-Martínez S, Sánchez Hurtado MA, Gutiérrez H, et al. 2018. Mimicking physiological O_2 tension in the female reproductive tract improves assisted reproduction outcomes in pig. *MHR Basic Sci Reprod Med* 24:260-270. • García-Rosello E, García-Mengual E, Coy P, Alfonso J & Silvestre MA. 2009. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod Domest Anim* 44 143-151. • Martínez-Soto JC, Amorcho B, Lopez D, Landeras J & Gadea J. 2008. Light exposure and sperm nuclear DNA damage in ICSI procedures. *Fertil Steril* 90: S411-S412. • Romar R, Funahashi H & Coy P. 2016. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology* 85: 125-134.

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

OPTIMIZED SYSTEM FOR THE IN VITRO PRODUCTION OF PORCINE EMBRYOS AND EFFECT OF INTRACITOPLASMIC MICROINJECTION ON ITS FINAL PERFORMANCE

ABSTRACT. Genetically modified pig generation requires a high number of zygotes with high quality. To achieve this goal it is necessary to optimize the current in vitro systems by reducing the oxygen tension and using frozen-thawed semen separated by swim-up method. In this work, the viability of such a system was assessed by injecting PBS within the ooplasm of porcine zygotes. Porcine cumulus-oocyte complexes were matured (NCSU-37, 40-44h), partially denuded and inseminated (TALP) with frozen ejaculated semen selected by the swim-up technique (NaturARTs-PIG sperm swim-up medium) at $3-4 \times 10^4$ spermatozoa/ml. At 10-12h post-insemination (hpi), putative zygotes were transferred to PBS, half microinjected with PBS and half not (control) and cultured until 18-20hpi to assess fertilization results in an aliquot. Remaining zygotes were transferred to NCSU-23 to assess cleavage (48hpi) and blastocyst (168hpi) rates. Conditions during all steps were 38.5°C, 5% CO₂ and 7% O₂. Penetration rate was 83.3%, with 42.0% monospermy rate and 35.0% fertilization yield. After microinjection, cleavage rate was similar to control group (63.2% vs. 67.4%). However, blastocyst formation rate was lower: 30.1% vs. 40.4% blastocysts/cleavage and 19.0% vs. 27.2% blastocysts/zygotes, respectively for microinjected and control group. The yield of this system is higher than the described in the literature.

Keywords: embryo, swim-up, oxygen tension, pig.