

## **OBTENCIÓN DE DESCENDENCIA VIVA TRAS LA FECUNDACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS PORCINOS CON ESPERMATOZOIDES CRIOCONSERVADOS**

P. Coy, J. Gadea, S. Ruiz, R. Romar, E. Sellés, C. Matás, B. Sieg<sup>2</sup> y D. Rath<sup>2</sup>.

Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria.

Universidad de Murcia. España. E- mail:pcoy@um.es

<sup>2</sup>Institute of Animal Science and Animal Behaviour. Mariensee (Alemania)

### **INTRODUCCIÓN**

Una de las aplicaciones de la crioconservación espermática consiste en la posibilidad de utilizar los espermatozoides de animales de alto valor genético incluso después de la muerte de los mismos. Esto puede resultar de gran utilidad en el futuro para la recuperación de razas en peligro de extinción (Bwanga, 1991). Por otra parte, en los laboratorios de Fecundación in vitro (FIV) es cada vez mayor la necesidad de contar con muestras de semen congelado procedente de un mismo eyaculado para la estandarización de los resultados de las diferentes experiencias (Rath y Niemann, 1997). El objetivo del ensayo que describimos consistió en comprobar la utilidad de la crioconservación espermática en la especie porcina en los dos aspectos mencionados.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### *Obtención y análisis del semen.*

En un estudio previo realizado sobre 18 verracos utilizados en un centro de Inseminación Artificial se seleccionó uno de los animales para su uso rutinario en pruebas de FIV debido al alto porcentaje de fecundaciones monospermicas que se consiguieron con sus espermatozoides tras la congelación/descongelación. Dicho verraco fue sacrificado más tarde por una enfermedad y se decidió intentar obtener descendencia viva a partir sus muestras de semen crioconservadas.

Los espermatozoides fueron congelados según la técnica descrita por Westendorf et al. (1975). El semen fue envasado en pajuelas de 0'5 ml con una concentración final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml, 3% de glicerol y 0'5% de Orvus et Paste. Tras la descongelación durante 12 segundos en un baño a 50°C y posterior dilución en BTS a 37°C se procedió a valorar antes y después de la FIV la motilidad (MOT), motilidad progresiva (MOT prog), estado del acrosoma (NAR) y la integridad de la membrana mediante la tinción con eosina-nigrosina (EN) y los fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína y ioduro de propidio (DCF).

#### *Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos*

Los ovocitos fueron obtenidos tras la recogida en el matadero de ovarios de hembras prepúberes sacrificadas y la sección con hoja de bisturí de los folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro. Tras la selección bajo el estereomicroscopio de los ovocitos que presentaban un aspecto homogéneo en su citoplasma y estaban completamente rodeados por varias capas de células del cúmulus, 300 ovocitos fueron madurados in vitro. Para ello se introdujeron en un incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> a 39°C en pocillos con 50 ovocitos conteniendo 500 µl de medio NCSU-37 y suplementos hormonales durante 22 horas, y seguidamente se cultivaron durante otras 22 horas adicionales en el mismo medio sin suplementos hormonales (Funahashi et al., 1997).

*Fecundación in vitro y cultivo de embriones*

La FIV se realizó en placas conteniendo 2 ml de TCM-199 con 25 ovocitos cada una a las que se añadieron  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml procesados según se describió anteriormente (Coy et al., 1999).

22 horas después de la FIV los posibles cigotos se trasladaron a medio NCSU-37 suplementado con 0.4 gr/100 ml de BSA, fijando 10 de éstos para obtener un control de FIV. El resto permanecieron en cultivo hasta un total de 48 horas y posteriormente se seleccionaron 50 de ellos para ser transferidos. Los criterios de selección utilizados fueron estrictamente morfológicos, basados en el grado de segmentación recogiendo sólo aquellos embriones en estadio de 2-4 células con blastómeros no fragmentados y de tamaño homogéneo. Una parte de los embriones no transferidos pero con buen aspecto morfológico fueron mantenidos en el cultivo in vitro hasta el día 7 y los que alcanzaron el estadio de blastocisto fueron fijados y teñidos con Hoechst para su evaluación.

*Transferencia de embriones*

Una cerda de primer parto que había manifestado síntomas de celo 3 días antes de la transferencia y en la que se habían detectado folículos en crecimiento mediante ultrasonografía fue utilizada como receptora de los 50 embriones seleccionados. El oviducto del lado derecho fue expuesto mediante laparotomía medial y los embriones se introdujeron a través del infundíbulo mediante un catéter estéril de vidrio.

21 días después de la transferencia se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía para verificar la presencia de vesículas embrionarias. La ecografía se repitió a los 26, 32 y a los 46 días con el fin de confirmar la continuidad de la gestación.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados de los análisis realizados sobre las muestras de semen descongeladas antes y después del tratamiento previo a la FIV se muestran en la Tabla 1. Como era de esperar, tras el lavado de los espermatozoides por centrifugación y resuspensión de los mismos en medio TCM-199, todos los parámetros estudiados muestran un deterioro de la calidad seminal, consecuencia de la desestabilización de las membranas que sufren algunos espermatozoides debida al tratamiento.

Tabla 1. Parámetros de calidad seminal del verraco seleccionado antes de la congelación (Fresco), inmediatamente después de la descongelación (Descong) o después de ser sometidas las muestras al tratamiento previo a la FIV (FIV).

Muestra	MOT(%)	MOT prog (0-5)	EN (%)	NAR (%)	DCF (%)
Fresco	75	3	88	98	89
Descong	60	3.5	64	62	51
FIV	40	3	54	40	40

En relación con los resultados de FIV, en la Tabla 2 se muestran los obtenidos en los cuatro ensayos previos con muestras de semen congelado/descongelado del macho utilizado en este estudio y en el grupo control de FIV empleado para la transferencia. Uno de los 10 ovocitos del grupo control FIV resultó ser inmaduro y por ello el número de ovocitos valorados se redujo a 9. Los datos de formación de pronúcleo masculino en los cinco ensayos nos indican que el método de maduración y el macho seleccionado son adecuados, ya que ambos factores influyen

sobre la capacidad del ovocito para transformar la cabeza espermática en pronúcleo (Coy et al., 1999).

Tabla 2. Resultados de FIV con el macho seleccionado en tres ensayos previos y en el ensayo de transferencia embrionaria.

Ensayo	N° ovocitos	% PEN	E/O	% MON	Rendimiento	%PNM
Previo 1	38	78'95±6'70 <sup>a</sup>	1'60±0'19	66'67±8'75	52'63±8'21	100
Previo 2	41	41'46±7'79 <sup>b</sup>	1'35±0'19	82'35±9'53	31'71±7'36	94'12±5'88
Previo 3	19	47'37±11'77 <sup>ab</sup>	1'22±0'15	77'78±0'15	36'84±11'37	100
Previo 4	35	57'14±8'49 <sup>ab</sup>	1'30±0'10	70'00±10'51	40'00±8'40	95'00±5'00
Transferencia	9	33'33±16'67 <sup>ab</sup>	1	100	33'33±16'67	100
Totales	142	55'63±4'18	1'41±0'09	73'42±5'00	40'14±4'13	97'47±1'78
Anova	P	0'006	0'508	0'627	0'422	0'686

Por otra parte, a pesar de existen diferencias en los porcentajes de penetración espermática entre ensayos, el rendimiento final del sistema de FIV (ovocitos monospermicos con dos pronúcleos), es decir el porcentaje de posibles cigotos viables, es semejante en todos los casos. Esto corrobora la idea apuntada por otros autores en cuanto a la estandarización de los resultados de la FIV mediante el uso de semen congelado (Wang et al., 1991; Abeydeera y Day, 1997; Day, 2000).

Tras la transferencia de los embriones, los sucesivos diagnósticos de gestación realizados en la cerda receptora mediante ultrasonografía confirmaron el resultado positivo del ensayo. Una vez producido el nacimiento de los lechones vivos estaremos en condiciones de verificar, con un mayor número de experiencias, la utilidad de la congelación de semen y de la FIV para la conservación de razas en peligro de extinción o, lo que es lo mismo, para la obtención de descendencia a partir de gametos de animales muertos.

Finalmente, los resultados tras la tinción de tres blastocistos, obtenidos a los 7 días de la FIV mediante el cultivo in vitro en medio NCSU-37, mostraron que el número de células por blastocisto se sitúa en valores semejantes a los obtenidos por otros autores (Prather et al., 1995) siendo de 36, 23 y 30 respectivamente, lo que nos demuestra que el sistema de producción de embriones utilizado en nuestro laboratorio es viable. A pesar de ello, es necesario continuar avanzando en la investigación en este campo para aumentar el rendimiento del sistema.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeydeera LR y Day BN. *Biol Reprod* 57:729-734 (1997).  
 Bwanga CO. *Acta Vet Scand* 32:431-453 (1991).  
 Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I y Gadea J. *Theriogenology* 51:799-812 (1999).  
 Day BN. *Anim Reprod Sci* 60-61:161-172 (2000).  
 Funahashi H, Cantley TC y Day BN. *Biol Reprod* 57:49-53 (1997).  
 Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE y Parry TW. *Theriogenology* 43:1001-1007 (1995).  
 Rath D y Niemann H. *Theriogenology* 54:785-793 (1997).  
 Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR y Niwa K. *J Reprod Fert* 104:305-313 (1991).  
 Westendorf P, Ritcher L y Treu H. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 82:261-300 (1975).

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos HA99- 0115, DAAD 314/Al-e-dr/ia y 1FD97-0501.