

RESUMEN

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina es una herramienta con gran potencial aplicativo en diversos campos, entre los que destacan la producción de animales transgénicos de interés en ganadería o biomedicina, y la recuperación de razas en peligro de extinción. Aunque en la actualidad existen referencias de obtención de descendencia viva mediante esta tecnología, el rendimiento es muy inferior al de otras especies, posiblemente debido al desconocimiento de las condiciones idóneas para el desarrollo de la misma, y la dificultad de los cigotos para alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro*. El presente trabajo se llevó a cabo para determinar diferentes factores que podrían afectar al rendimiento posterior de la técnica, estudiando para ello el efecto de 1) la secuencia de cultivo de los cigotos recién inyectados; 2) modificaciones en el sistema de maduración *in vitro* (MIV) tradicional, mediante el empleo de un inhibidor meiótico como es la roscovitina y variaciones a nivel de las horas de MIV, y por último 3) la activación exógena del ovocito mediante la inyección de inositol trifosfato (InsP₃) con el espermatozoide. El objetivo global de este estudio fue el de incrementar el rendimiento final de la ICSI en la especie porcina.

Para conseguir los objetivos propuestos se utilizaron ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Además, se puso a punto en nuestro laboratorio un sistema de maduración modificado mediante el uso de la roscovitina, como inhibidor meiótico, durante las primeras 22-28h, dependiendo de la experiencia realizada. Para la puesta a punto de este sistema de maduración se valoró la capacidad de inhibición y el grado de reversibilidad de la roscovitina, y al mismo tiempo se valoró el contenido intracelular de glutatión en estos ovocitos. Una vez establecido este sistema de maduración, se valoró la capacidad de formación pronuclear mediante la ICSI y posteriormente se valoraron diferentes horas de MIV (36, 40 y 44h).

Todas las experiencias de ICSI se realizaron con espermatozoides frescos procedentes de eyaculados y los ovocitos no fueron tratados artificialmente para inducir su activación, salvo en la tercera experiencia, donde se utilizó el InsP₃. Las inyecciones se realizaron sin el uso clásico de la polivinilpirrolidona (PVP) en el medio de suspensión de los espermatozoides.

Los resultados del estudio indican en la primera experiencia que los ovocitos porcinos recién inyectados alcanzan mejores porcentajes de ovocitos en estadio de 2 células cuando se cultivan durante 6 ó 20 horas en un medio de fecundación *in vitro* (FIV), como es el caso del medio TALP, pero no se observó efecto significativo en el desarrollo embrionario posterior. En cuanto a la segunda experiencia, los resultados indican que el empleo de la roscovitina a 50µM durante un período de 22-28h presenta capacidad de inhibir la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y este efecto es totalmente reversible al cultivar los ovocitos en un medio libre de inhibidor. La cantidad de glutatión también se vio afectada en presencia de inhibidor, obteniendo unas mayores cantidades en los ovocitos cultivados con roscovitina durante 22 horas, aunque al final de la maduración este efecto no se observó. La capacidad de formación pronuclear no se vio afectada por el inhibidor pero sí que se observó una mayor rapidez en la formación de embriones (2 células) en el grupo de ovocitos premadurados. En relación al desarrollo *in vivo*, los cigotos inyectados fueron capaces de iniciar gestaciones independientemente del uso de la roscovitina durante su maduración. En relación a las horas de MIV, los resultados demuestran que períodos de MIV de 36h ofrecen mejores porcentajes de fecundación que periodos de 44h. Estos resultados son similares en ausencia de roscovitina.

Por último, el empleo del InsP₃ como activador exógeno del ovocito no presentó efectos significativos en el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto.

En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que la ICSI en la especie porcina puede ofrecer porcentajes de activación y fecundación elevados. El cultivo de los cigotos en medio TALP antes de transferirlos al medio de cultivo de embriones es beneficioso. La roscovitina a la dosis y tiempo utilizada puede emplearse como herramienta para el mantenimiento de los ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV) sin afectar a la fecundación y al desarrollo embrionario posterior. Un periodo de MIV de 36 horas incrementa el rendimiento de la ICSI evaluado a las 22 h post-inyección. El InsP₃ en las condiciones experimentales empleadas no aumenta el rendimiento de la ICSI.

SUMMARY

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in pigs is a tool with an important applicable potential in diverse fields. One of this is the production of transgenic animals which is of interest in livestock and biomedicine, and the conservation of endangered species. Even though there are some cases of living offspring through this technique, its output is still quite low comparing to other species, possibly due to unknown factors referring to ideal conditions for the development, and to the difficulty of the zygotes to reach the blastocyst stage *in vitro*. The goal of this study was to evaluate different factors affecting the ICSI performance. This was done by studying 1) the sequence of culture of the injected oocytes; 2) *In vitro* maturation (IVM) modifications, through meiotic inhibitors, such as roscovitine, and changes in IVM duration time, and finally 3) the exogenous oocyte activation through inositol triphosphate (InsP₃) injection together with the sperm. The main objective of this study was to increase the final performance of ICSI in pigs.

To get the proposed goal, *in vitro* matured oocytes were employed. Moreover, two step-IVM system was carried out in our laboratory, through the use of roscovitine as a meiotic inhibitor during the first 22-28h of maturation, depending on the experiment realized. To start with this system, meiotic inhibition and reversibility capacity were assessed and also intracellular oocyte glutathione (GSH) content. Then, pronuclear formation ability through ICSI and different IVM times (36, 40 and 44h) were evaluated. All the ICSI experiments were done with fresh ejaculated semen and the oocytes were not treated artificially to induce activation, only in the last experiment where InsP₃ was used. The injections were carried out without the classical use of polivinilpirrolidone (PVP) in the sperm preparation medium.

Results in the first experiment show that porcine ICSI zygotes get higher two cells rate in presence of the used *in vitro* fertilization medium (TALP), but further embryo development is not affected. In relation to second experiment, results show that the germinal vesicle breakdown (GVBD) was inhibited in presence of 50 μ M roscovitine during 22-28h, and this effect was completely reversible when the oocytes were cultured in a free-inhibitor medium. Also GSH content was affected by the roscovitine. GSH content was higher in prematuration oocytes than in not prematuration ones at 22 h, although this effect was not observed at the end of the maturation. Pronuclear formation ability was not affected by the prematuration, but a quicker embryo development was observed in roscovitine treated oocytes. Concerning the *in vivo* development, the injected zygotes, prematuration or not with roscovitine, were able to establish pregnancies. In relation to IVM times, results show that oocytes matured for 36h can achieve better fertilization rates than the oocytes matured during 44h. These results are similar without roscovitine treatment.

Finally, no effect on embryo development until blastocyst stage was observed with the use of the InsP₃, such as an exogenous activating factor.

In conclusion, data show that porcine ICSI can achieve high activation and fertilization rates. The culture in TALP medium before transferring the zygotes to embryo culture medium is beneficial. Taking into account the concentration and duration of roscovitine prematuration, it can be used as an important tool for maintaining the germinal vesicle (GV) stage oocytes without compromising fertilization and further embryo development. An IVM period of 36 h increases the ICSI yield assessed at 22 h post-injection. InsP₃ does not improve the ICSI yield under the employed experimental conditions.