MANUALES CLÍNICOS DE VETERINARIA

EDITORES DE LA COLECCIÓN
Juan Morgaz Rodríguez
Pilar Muñoz Rascón
Alba Galán Rodríguez

TÉCNICAS REPRODUCTIVAS EN LAS ESPECIES ANIMALES

Carlos C. Pérez Marín
Lydia Gil Huerta
Luis Ángel Quintela Arias

Escaneado con CamScanner

Manuales clínicos de Veterinaria

Técnicas reproductivas en las especies animales

EJEMPLAR GRATUITO
PROHIBIDA SU VENTA

Escaneado con CamScanner

Manuales clínicos de Veterinaria

Técnicas reproductivas en las especies animales

Editores

Carlos C. Pérez Marín (UCO)

Lydia Gil Huerta (UNIZAR)

Luis Ángel Quintela Arias (USC)

Editores de la colección

Juan Morgaz Rodríguez (UCO)

Pilar Muñoz Rascón (UCO)

Alba Galán Rodríguez (UCO)

ELSEVIER

Escaneado con CamScanner

ELSEVIER

Avda. Josep Tarradellas, 20-30, 1.º 08029 Barcelona, España

Técnicas reproductivas en las especies animales
de Carlos C. Pérez Marín, Lydia Gil Huerta y Luis Ángel Quintela Arias

© 2024 Elsevier España, S.L.U.
ISBN: 978-84-1382-371-3
eISBN: 978-84-1382-666-0

Todos los derechos reservados.

Reserva de derechos de libros
Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra (www.conlicencia.com; 91 702 19 70/93 272 04 45).

Advertencia
Los profesionales de la salud e investigadores deben siempre contrastar con su propia experiencia y conocimientos la evaluación y el uso de cualquier información, método, compuesto o experimento descrito en esta obra. Los rápidos avances en el conocimiento científico requieren que los diagnósticos y las dosis de fármacos recomendadas sean siempre verificados de manera independiente. Conforme al alcance máximo permitido por la ley, ni Elsevier, ni los autores, editores o colaboradores asumen responsabilidad alguna por cualquier reclamación por daños que pudieran ocasionarse a personas o propiedades por el uso de productos o por negligencia, o como consecuencia de la aplicación de cualesquiera métodos, productos, instrucciones o ideas contenidos en esta obra. Con el único fin de hacer la lectura más ágil y en ningún caso con una intención discriminatoria, en esta obra se ha podido utilizar el género gramatical masculino como genérico, remitiéndose con él a cualquier género y no solo al masculino.

Servicios editoriales: DRK Edición
Depósito legal: B.14.868-2023
Impreso en Polonia

Escaneado con CamScanner

Inyección intracitoplasmática en equinos

CAPÍTULO 32

María Jesús Sánchez Calabuig, Raúl Fernández González, Lauro González Fernández y Beatriz Macías García

Introducción

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) surge como técnica de investigación en los años 1960 para estudiar los eventos que ocurren en el cigoto inmediatamente después de la fecundación. Tras comprobar su eficacia se planteó su uso como técnica de reproducción, y en el 11.° Congreso Internacional de Reproducción Animal de 1988 el profesor Iritani presentó el primer caso de nacimiento de animales mediante ICSI, en conejos. A continuación, la técnica se adaptó para producir el primer ternero procedente de microinyección (1990), el primer humano (1992), el primer ratón (1995) y, finalmente, el primer potro (1996).

Ventajas e inconvenientes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides

A diferencia de la ICSI, en los equinos la fecundación *in vitro* (FIV) convencional presenta aún una baja eficiencia. Solo se había publicado el nacimiento de un potro por FIV convencional, a principios de la década de 1990, hasta que en 2022 el grupo de la Dra. Hinrichs publicó el nacimiento de tres potros usando un protocolo de capacitación espermática prolongada en el caballo. En el protocolo descrito se precisa el uso de semen fresco, sin retrasar su procesamiento más de 30 min. Todo esto hace que, aunque el trabajo sea prometedor, la ICSI siga siendo la técnica comercial de elección en el momento actual. A pesar de sus numerosas ventajas, esta técnica presenta algunos inconvenientes en comparación con la FIV convencional. Se trata de una técnica más invasiva para el ovocito, en el que se obvian procesos biológicos como la activación del acrosoma, la fusión de gametos o la selección espermática, que queda reducida a la selección visual del espermatozoide con una motilidad y morfología determinadas, por parte del técnico. Además, su uso implica unos elevados costes de instalaciones y equipamientos, así como una alta especialización del operador. Por otro lado, solo un número muy limitado de laboratorios en todo el mundo consiguen obtener buenos resultados mediante esta técnica, con un 20% de embriones por ovocito inyectado. Estos resultados tan difíciles de conseguir son hoy en día subóptimos si se comparan con los resultados conseguidos en otras especies domésticas mediante FIV convencional, como la bovina (40%), la porcina (50-60%) e incluso la equina (40% en el trabajo). En la actualidad hay un aumento exponencial de la demanda de programas de producción *in vitro* de embriones en caballo, pero se necesita una media de 10 ovocitos para obtener un embrión vitrificable, que resulta en una tasa de gestaciones del 60% tras la transferencia transcervical. Por lo tanto, a día de hoy, el método de aspiración de ovocitos (OPU, *ovum pick-up*) y posterior ICSI no constituye una alternativa a los programas de transferencia embrionaria en equinos. Por el contrario, es una técnica de rescate, con menor eficiencia que la transferencia de embriones *in vivo* en animales fértiles, y deben seleccionarse bien los casos en los que se propone su uso.

© 2024. Elsevier España, S.L.U. Reservados todos los derechos

Escaneado con CamScanner

Producción *in vitro* de embriones mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides

La ICSI es actualmente el único método clínico efectivo y repetible de fecundación *in vitro* en equinos, siendo el tratamiento de elección para problemas de infertilidad tanto del semental como de la yegua. Además, tiene una aplicación importante en yeguas de alta competición en las que el lavado de embriones supone una interrupción del entrenamiento, o en sementales cuya disponibilidad de semen es escasa. Otro caso excepcional para su empleo es en situación *post mortem*, en caballos de alto valor genético que fallecen repentinamente e interese obtener descendencia.

A continuación, se describen los distintos protocolos empleados en la producción *in vitro* de embriones.

Obtención de gametos

Para realizar la ICSI se necesita una fuente de gametos (masculino y femenino). Las técnicas actuales de obtención de ovocitos inmaduros en équidos son las siguientes: *post mortem*, mediante raspado folicular o aspiración de los ovarios, e *in vivo* mediante OPU (v. cap. 28). En ambos casos se obtendrán ovocitos inmaduros que requieren su maduración *in vitro*. También se pueden usar ovocitos madurados *in vivo*, pero no tiene mucha utilidad desde un punto de vista práctico, ya que se obtiene un solo ovocito para realizar la ICSI. Para obtener los espermatozoides se puede usar tanto semen fresco como refrigerado o congelado, siendo los dos últimos los más empleados en la práctica. La gran ventaja que presenta la ICSI frente a la FIV convencional es la posibilidad de utilizar espermatozoides de diferente calidad, incluyendo aquellos que presentan una baja concentración espermática o baja motilidad. Por otro lado, para realizar la ICSI se necesita poca cantidad de espermatozoides, por lo que se optimiza el uso de las pajuelas de aquellos sementales con un elevado coste o un reducido número de dosis.

Maduración *in vitro* de los ovocitos

Los ovocitos se encuentran inmaduros en el ovario en profase I de meiosis. Durante un ciclo estral y bajo la influencia de las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), el ovocito reanudará la meiosis y se desarrollará hasta el estadio de metafase II justo antes de la ovulación, cuando se observa la extrusión del corpúsculo polar. La maduración del ovocito equino se reproduce con relativo éxito en el laboratorio, ya que, de media, el 70-80% de los ovocitos obtenidos maduran *in vitro*. Los medios de maduración más utilizados en la especie equina son TCM-199 y DMEM-F12. Al medio base se le adiciona una fuente de proteínas, generalmente suero fetal bovino, que da como resultado unas mejores tasas de maduración en comparación con el uso de albúmina sérica bovina. Además, se añaden diferentes hormonas y aditivos, dependiendo del laboratorio, como LH o FSH (o ambas), estradiol o factor de crecimiento epidérmico, entre otros. Los ovocitos se mantienen en estos medios en una atmósfera húmeda con un 95% de aire y un 5% de CO_2, con protocolos que varían entre las 28 y las 40 h.

Una vez madurados, como paso previo a la ICSI los ovocitos deben denudarse. Esto se hace mediante pipeteo repetido y uso de agentes enzimáticos (hialuronidasa), lo que implica la separación mecánica del ovocito y de las células de la granulosa. La denudación se realiza con la intención de, por un lado, comprobar la maduración del ovocito mediante la visualización del corpúsculo polar, y por otro para facilitar el proceso de ICSI, pues las células de la granulosa impiden visualizar correctamente la zona pelúcida y la membrana, y se adhieren a las pipetas de *holding* (o sujeción) e inyección, dificultando enormemente el procedimiento.

Selección y preparación del esperma

En la mayoría de los casos, por cuestiones prácticas, se emplea semen congelado para su uso en la ICSI. Los ovocitos denudados se mantienen en el medio de maduración en el incubador mientras se procede a la descongelación del semen. Se descongela el semen de una pajuela, o de una

Escaneado con CamScanner

parte de la pajuela, en un baño de agua a 37 °C durante 1 min y se deposita en un tubo con *Holding Medium* (HM; TCM-199 suplementado con HEPES y 10% de suero fetal bovino). A continuación, se pueden llevar a cabo muchos tipos de selección espermática, pero los dos métodos más empleados en centros de referencia son la selección mediante centrifugación usando un coloide y el método de *swim-up*. El primero consiste en realizar una centrifugación sobre gradiente de densidad, generalmente EquiPure®, que permite la selección de los espermatozoides con motilidad. El segundo método consiste en realizar un *swim-up* en el que se centrifugan los espermatozoides en un tubo que se coloca en el incubador con una inclinación de 45°, con el fin de permitir que lleguen los mejores hasta la superficie. Después, se recogen los que se encuentran en la parte superior, se seleccionan los que presentan mayor motilidad y se descarta el resto. Una vez seleccionados los espermatozoides, se mantienen en el medio que se va a emplear para la inyección, a 38 °C, para que permanezcan vivos y con motilidad.

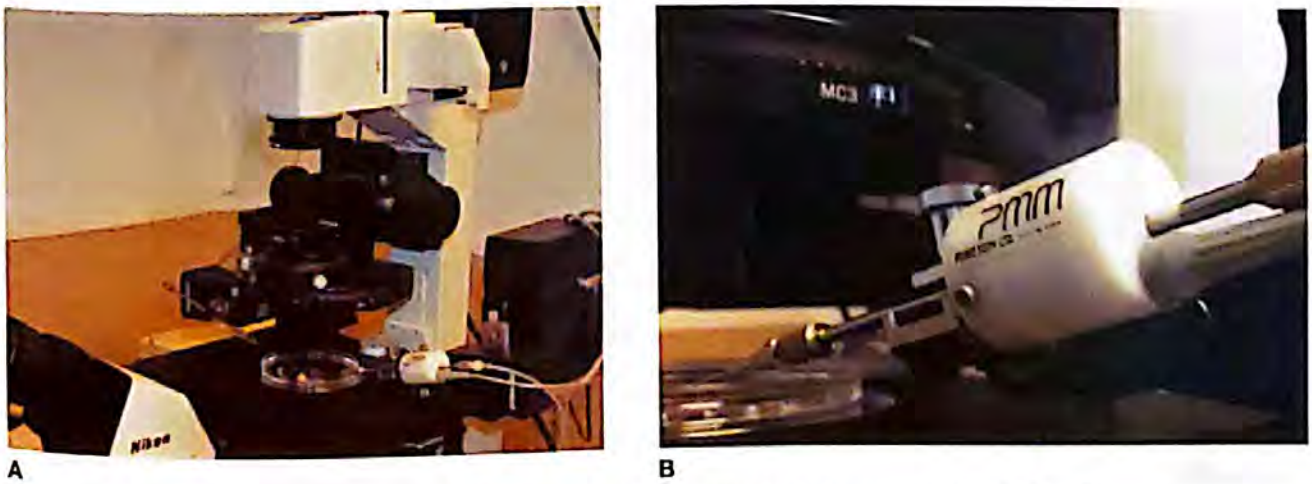
Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Hay tres técnicas de ICSI, según el sistema que se utilice para atravesar la zona pelúcida del ovocito: convencional, piezo-ICSI y asistida por láser.

En la **ICSI convencional** se utiliza una aguja biselada que permite atravesar tanto la zona pelúcida como la membrana del ovocito, permitiendo además la rotura de la pieza intermedia del espermatozoide, interrumpiendo así su motilidad. Este tipo de ICSI se emplea en la mayoría de las especies, como la porcina, la bovina, la humana y los lagomorfos. En la especie equina se emplea también este tipo de ICSI.

La **piezo-ICSI** (fig. 32.1A y B) se desarrolló en el laboratorio del Dr. Ryuzo Yanagimachi para aumentar la eficiencia de la técnica en ratón. El modelo murino presenta una dificultad añadida a la técnica, ya que la zona pelúcida es muy elástica y exige que la aguja biselada convencional ejerza una presión excesiva sobre el ovocito para poder atravesarla, lo que termina provocando un daño notable en la membrana plasmática, disminuyendo la viabilidad postinyección. Para evitar este inconveniente se desarrolló un sistema de sujeción de la aguja de inyección acoplado a un motor piezoeléctrico, que convierte pulsos electromagnéticos en una vibración con efecto percutor. El uso de piezoelectricidad permite usar una aguja roma para perforar la zona pelúcida y extraer un trozo de la zona del diámetro de la aguja, a través de la cual se accede al espacio perivitelino. Del mismo modo, pero con pulsos menos intensos, se atraviesa la membrana plasmática para depositar el espermatozoide en el citoplasma del ovocito.

La piezo-ICSI empezó a aplicarse en equinos en el año 2002 y en poco tiempo demostró unas tasas de producción de blastocistos superiores a las de la ICSI convencional. Sin embargo, en 2014, un estudio demostró que la piezo-ICSI alcanzaba las mismas tasas de producción de blastocistos que la ICSI convencional. En este trabajo se observó que en la ICSI convencional se producía un retraso en la



A B

Figura 32.1. Equipo de ICSI. **A.** Microscopio invertido con micromanipuladores acoplados. **B.** Detalle del piezoeléctrico.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Escaneado con CamScanner

activación del ovocito, una descondensación de la cromatina más lenta y una menor tasa de eliminación del acrosoma, lo que resultaba en una menor calidad embrionaria. Posteriormente, un estudio del grupo de la Dra. Hinrichs demostró que el uso del piezoeléctrico fragmenta el acrosoma, lo que mejora el desarrollo embrionario.

Por último, en relación con la tercera técnica de ICSI, los primeros trabajos realizados con láser para horadar la zona pelúcida se llevaron a cabo en los años 1990, con la finalidad de facilitar la fecundación *in vitro*. La **ICSI asistida por láser** fue descrita por primera vez en el año 2000 en humanos, para casos en los que el ovocito presentaba una zona pelúcida dura o muy engrosada, o en aquellos en los que, por el tratamiento de estimulación ovárica, los ovocitos presentaban una membrana frágil. Con el tiempo se ha extendido a otras especies en las que la fragilidad de la membrana pueda ser más habitual, pero siempre ha existido preocupación por el efecto del láser, por su poder mutagénico, sobre todo para longitudes de onda cercanas al pico de absorción del ADN (260 nm), y por el posible efecto en el aumento de la temperatura del medio en que se trabaja con los ovocitos. Aun así, un estudio que comparó la ICSI asistida por láser frente a la piezo-ICSI en equinos demostró una mayor supervivencia de los ovocitos inyectados aplicando láser, aunque las tasas de producción de blastocistos eran sensiblemente inferiores.

Aquí vamos a describir la técnica tal como se realiza en nuestro laboratorio, pero debe tenerse en cuenta que en otros centros los medios o la disposición de las gotas en las placas varían.

El primer paso para realizar la ICSI, mientras los ovocitos se recuperan del tratamiento con hialuronidasa, es proceder a la preparación de la placa de micromanipulación (fig. 32.2) y la colocación de las pipetas de sujeción *(holder)* y de microinyección (ICSI) en un microscopio invertido con micromanipuladores acoplados (v. fig. 32.1A). Aunque en el mercado hay placas específicas para ICSI, en nuestro laboratorio empleamos placas de Petri de 90 mm. Para preparar la placa, se coloca una gota central de HM de 50 µl para la manipulación de los ovocitos, y por encima y por debajo gotas de polivinilpirrolidona (PVP) para manipular los espermatozoides. La PVP es un polímero que otorga gran densidad al medio, ralentizando el movimiento de los espermatozoides y facilitando su captura, pero es tóxica para el ovocito, por lo que hay que procurar que no se mezcle con la gota de manipulación donde se encuentran los ovocitos, e introducir el espermatozoide en el menor volumen posible al citoplasma. En nuestro caso, mezclamos PVP con medio HM de manipulación, en una proporción 5:1, y hacemos gotas de 10 µl, a las que se añadirán otros 10 µl de la preparación de espermatozoides, una gota diferente cada 30 min, para que estén frescos y no les afecte la PVP. Además, es necesaria otra gota de 20 µl de 10% PVP para lavar

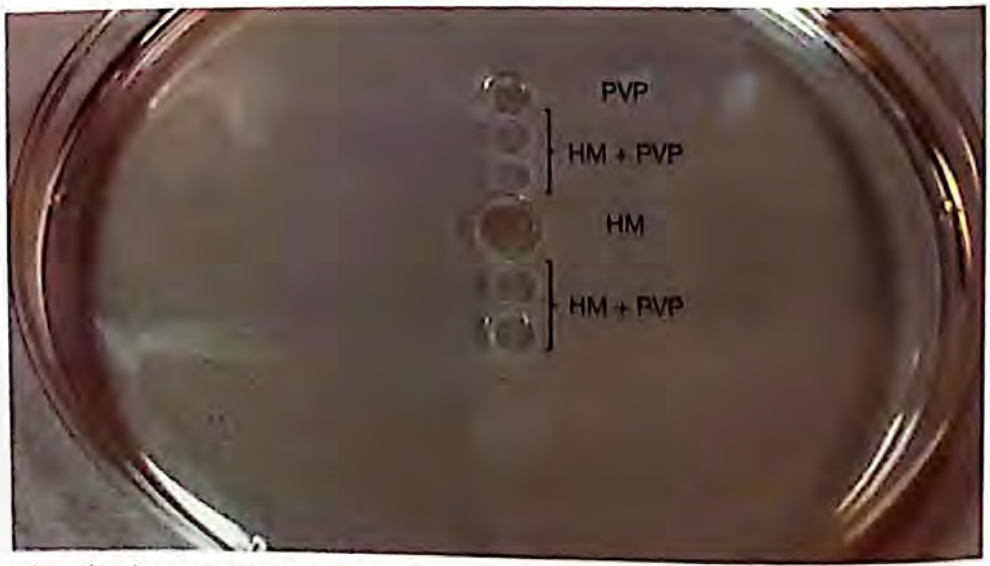


Figura 32.2. Placa de micromanipulación. En la gota central con medio HM se realiza la micromanipulación de los ovocitos. Las dos gotas inmediatamente superior e inferior son las de manipulación de los espermatozoides. La tercera gota superior es PVP al 10% para el lavado de la aguja.

Escaneado con CamScanner

la aguja de inyección y eliminar la adhesividad, tanto al principio de la sesión como cada vez que sea necesario cuando se observe que los espermatozoides se pegan a la cara interna del capilar. La placa se recubre con aceite mineral para evitar la evaporación de los medios y, por consiguiente, el cambio de concentraciones. Además, es importante contar con una placa calefactada a 38 °C, ya que los ovocitos equinos son muy sensibles a los cambios de temperatura.

La técnica de ICSI consiste en introducir mecánicamente un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito en metafase II. Para ello se cuenta con un microscopio invertido con dos sistemas de micromanipulación acoplados, uno a cada lado. Cada sistema de micromanipulación consiste en una fijación motorizada para los capilares, controlada desde un *joystick*, acoplada a un microinyector de aceite. El microinyector funciona como una jeringa cuyo émbolo está acoplado a un tornillo, que en sentido horario de giro produce un avance del émbolo y con ello de todo el flujo de aceite, produciendo la expulsión del contenido del capilar, mientras que en sentido antihorario hace retroceder el émbolo y el aceite produciendo la aspiración en el capilar. El ovocito se fija para que se mantenga inmóvil durante la inyección, mediante un capilar de sujeción *(holder)* situado en el lado izquierdo (v. fig. 32.1A). Con el fin de no dañar las estructuras internas, como el centrosoma, el corpúsculo polar se sitúa en la zona superior o inferior (a las 12 o a las 6, tomando como referencia la esfera del reloj). Mediante un capilar de inyección romo, adaptado a un microinyector especial con el sistema piezoeléctrico (situado a la derecha; v. fig. 32.1B) se colecta el espermatozoide que se va a inyectar. Con la cabeza fuera del capilar y la cola dentro, se activa el piezoeléctrico para que ejerza golpes bruscos a la altura de la pieza intermedia que inactivan su motilidad. Con la misma aguja se atraviesa, en primer lugar, la zona pelúcida (fig. 32.3A) a golpe de piezoeléctrico, que deja un bocado en esta (fig. 32.3B). A continuación, se pone en tensión la membrana plasmática llevando más allá de la mitad del ovocito la aguja de inyección (fig. 32.3C), y con parámetros más suaves se atraviesa la membrana plasmática con un golpe corto de piezoeléctrico. Este punto es importante porque indica la fragilidad de la membrana, ya que esta debería soportar el empuje de la aguja de inyección hasta prácticamente el otro polo manteniéndose íntegra. Por último, se libera suavemente el espermatozoide en el interior del ovocito en el menor volumen posible (fig. 32.3D).

Cultivo embrionario

Actualmente no existe un medio específico de cultivo de embriones equinos. De hecho, desde el inicio del uso de la técnica se han utilizado medios desarrollados para otras especies, suplementados para adecuarse a las necesidades del embrión equino. Así, en los distintos laboratorios de embriología equina se han empleado DMEM/F12, SOF, TCM 199 y Global, entre otros.

A diferencia de lo que ocurre en otras especies de mamíferos, en las que concentraciones elevadas de glucosa conllevan el bloqueo en dos células y la apoptosis de las blastómeras o alteraciones de la expresión génica, los embriones equinos necesitan concentraciones altas de glucosa durante el cultivo para poder llevar a cabo su desarrollo *in vitro*. Mientras que en las demás especies de mamíferos se emplean concentraciones fisiológicas de glucosa (0,2 mM), en la especie equina dichas concentraciones solo permiten un buen desarrollo embrionario hasta el día 4 tras la ICSI, cuando se alcanza el estadio de 8-16 células. A partir de ese momento es necesario aumentar las concentraciones de glucosa para evitar una bajada drástica de la tasa de producción embrionaria. Así, a partir del día 4 se realiza un cambio de medio donde la glucosa supera 17 mM de concentración (DMEM/F12, SOF con 17,5 mM y 19 mM, respectivamente). Resulta paradójico que, al analizar la concentración de glucosa en la composición del fluido oviductal equino, donde de manera fisiológica se encuentra el embrión, el resultado fue que la concentración de glucosa variaba entre 0,15 y 0,30 mM, sin superar en ningún caso la concentración de 1 mM. Este hallazgo indica que los requerimientos de los embriones cultivados *in vitro* difieren sustancialmente de los embriones obtenidos *in vivo*.

En relación con la fuente de proteínas del medio de cultivo, es importante mencionar que tradicionalmente los medios se suplementan con suero fetal bovino. Entre las ventajas destacan un incremento de la calidad del blastocisto, tal como se ha observado en la especie bovina. Esta mejora se atribuye a que el suero fetal bovino disminuye la concentración de radicales libres que se forman

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Escaneado con CamScanner

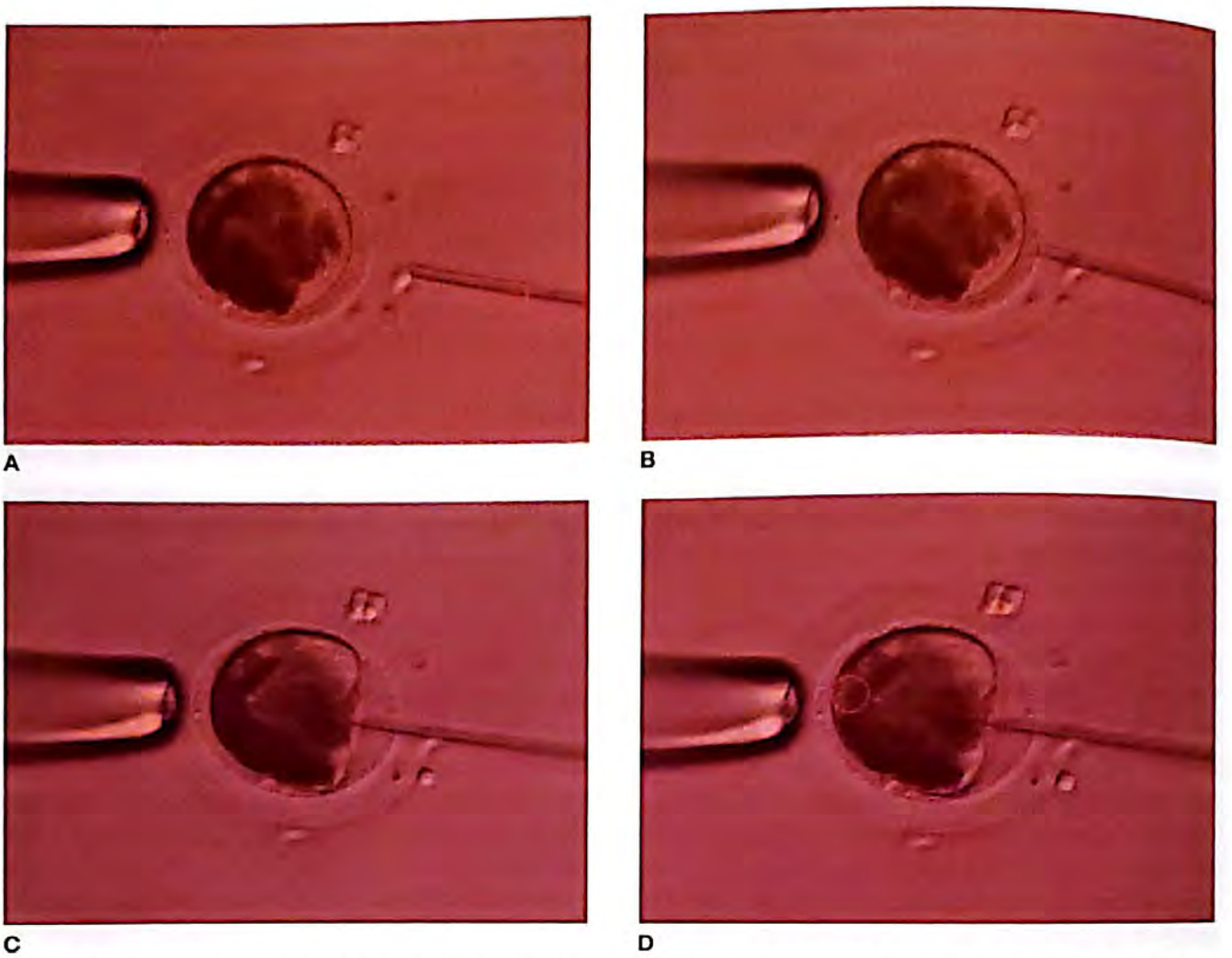


Figura 32.3. Proceso de ICSI. **A.** Ovocito equino maduro, con corpúsculo polar en la zona inferior, sujeto por el *holder (izquierda)*, y aproximación del capilar de inyección con un espermatozoide *(círculo rojo)* cargado *(derecha)*. **B.** Capilar de inyección atravesando la zona pelúcida. **C.** Aguja tensando la membrana plasmática. **D.** Aguja depositando el espermatozoide *(círculo rojo)* en el citoplasma del ovocito maduro, con la membrana visiblemente relajada.

por el metabolismo embrionario, o elimina metales pesados procedentes de los medios sintéticos. Su mayor inconveniente es que se desconoce su composición exacta y que aporta aminoácidos, hormonas, factores de transcripción, citocinas y vitaminas, con enormes variaciones entre lotes, por lo que los resultados obtenidos del cultivo *in vitro* de embriones son variables para cada sesión. Por eso, en la actualidad se buscan alternativas que ofrezcan resultados más estables a lo largo del tiempo.

Por último, hay que señalar que las condiciones de cultivo están muy estandarizadas. Se emplean incubadores que controlan tanto la temperatura como la composición del aire y la humedad, siendo la temperatura de 38,5 °C con una concentración de un 5% de CO_2 y un 5% de O_2, condiciones de hipoxia como las que se producen en el útero materno fijando la humedad a saturación. Los mejores resultados del cultivo se han obtenido en microgota de 5 µl, a una relación de 1 µl por embrión, es decir, hasta cinco embriones por gota y cubiertos con aceite mineral.

Bibliografía recomendada

Choi YH, Velez IC, Macías-García B, Riera FL, Ballard CS, Hinrichs K. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology* 2016;85:1289-96.

Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TAE. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. *Reprod Fertil Dev* 2019;31:1894.

Felix MR, Turner RM, Dobbie T, Hinrichs K. Successful *in vitro* fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biol Reprod* 2022;107:1551-64.

Escaneado con CamScanner

Galli C, Colleoni S, Turini P, Crotti G, Lazzari G. Prolonged in vitro maturation time and increased intensity of piezo pulses during ICSI enhance cleavage and embryo development in the horse. *J Equine Vet Sci* 2018;66:169-70.

Hinrichs K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reprod Domest Anim* 2018;53(Suppl 2):4-13.

Lazzari G, Colleoni S, Crotti G, Turini P, Fiorini G, Barandalla M, et al. Laboratory production of equine embryos. *J Equine Vet Sci* 2020;89:103097.

Lewis N, Hinrichs K, Leese HJ, McG Argo C, Brison DR, Sturmey R. Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. *Sci Rep* 2020;10:3493.

Sánchez-Calabuig MJ, Fernández-González R, Hamdi M, Smits K, López-Cardona AP, Serres C, et al. A high glucose concentration during early stages of in vitro equine embryo development alters expression of genes involved in glucose metabolism. *Equine Vet J* 2021;53:787-95.

Squires E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *J Equine Vet Sci* 2020;89:102981.

Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1996;45:306.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito

Escaneado con CamScanner