



Avances en el manejo de gametos caninos *in vitro*

Advance in handling canine gametes in vitro

Mónica De los Reyes S¹

¹Unidad de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Chile

Resumen

Las características fisiológicas de los gametos caninos que los hace especiales respecto a los de otras especies han dificultado los estudios tendientes a incrementar los porcentajes de éxito en diversas biotecnologías reproductivas. Entre estas características está el inicio de la meiosis de los ovocitos posterior al nacimiento y la ovulación de un gameto inmaduro como ovocito primario, lo que ha complejizado la maduración *in vitro* de estos ovocitos y, por parte de los espermatozoides, una gran diferencia en la sobrevivencia de los espermatozoides eyaculados versus los congelados-descongelados, que hace imprescindible evaluar la biología reproductiva de estos gametos tendiente a optimizar nuevos protocolos haciendo énfasis previamente en una adecuada evaluación del crecimiento del ovocito *in vivo* y de la viabilidad espermática en aquellos sometidos a criopreservación,

Palabras claves: ovocitos, espermatozoides, maduración, viabilidad

Abstract

The physiological characteristics of canine gametes that make them unique compared to those of other species have hindered studies aimed at increasing the success rates in various reproductive biotechnologies. Among these characteristics is the meiosis of the oocytes after birth and the ovulation of an immature gamete as a primary oocyte, which has made the in vitro maturation of these oocytes more complex and, on the part of the spermatozoa, a significant difference in the viability of ejaculated versus frozen-thawed spermatozoa, which makes it essential to evaluate the reproductive biology of these gametes in order to optimize new protocols, previously emphasizing an adequate evaluation of in vivo oocyte growth and sperm viability in those subjected to cryopreservation.

Keywords: oocytes, spermatozoa, maturation, viability

Introducción

La reproducción en cánidos se ha caracterizado por tener algunos aspectos peculiares, que ha hecho que el progreso hacia la comprensión de los mecanismos subyacentes a estas características únicas haya sido lento, lo que, a su vez, limita la capacidad para controlar o mejorar la reproducción y desarrollar biotecnologías reproductivas en esta especie y lograr herramientas clínicas para diagnosticar trastornos reproductivos.

Ovocitos

Una de las características más intrigantes de la reproducción canina es la ovulación de ovocitos inmaduros que requieren alrededor de 72 horas adicionales fuera del folículo ovárico para adquirir la capacidad de fecundación y posterior desarrollo (Renton et al., 1991). Hasta la fecha, la eficiencia de los protocolos de maduración *in vitro* (IVM) en cánidos es muy baja (<20% en promedio), justamente por lo largo del proceso y la necesidad de imitar diferentes ambientes de desarrollo genético.

El probar diferentes protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos caninos, evaluando la adición de diferentes compuestos como son hormonas, proteínas, factores de crecimiento, vitaminas, y probando además, diferentes densidades de ovocitos, tiempos de incubación, condiciones de cultivo y más, ha ayudado a mejorar los porcentajes de ovocito que completan su desarrollo meiótico *in vitro*, pero no ha solucionado aun las tasas de desarrollo muy por debajo de lo obtenido en otras especies animales. De hecho, hasta la fecha aún no se obtienen camadas producto de fecundación *in vitro* con ovocitos madurados completamente *in vitro*.

Esto abre una serie de desafíos en orden de lograr un desarrollo de los ovocitos caninos en cultivo que hasta la fecha no ha sido posible obtener. Nuestro laboratorio ha estado estudiando el último tiempo por tanto, factores fisiológicos que involucran el desarrollo del ovocito *in vivo*, para lograr una mejor replicación en los protocolos *in vitro*.

La capacidad de desarrollo de los ovocitos se adquiere durante la foliculogénesis, la adquisición de las competencias de maduración y desarrollo es un proceso altamente coordinado que incluye cambios morfológicos, ultra estructurales y transcripcionales en el gameto. Los eventos claves durante la ovogénesis y foliculogénesis se basan en las interacciones entre el ovocito y las células de cúmulo (CC) (Peng et al., 2019). Las CC y los ovocitos interactúan a través de uniones comunicativas o GAP para mantener la función ovárica normal, permitiendo el paso de pequeñas moléculas de señalización, como miRNA, nucleótidos cíclicos y azúcares (Russell et al., 2016). Las uniones GAP están compuestas por complejos de proteínas, conexas que forman canales de estructuras proteicas de doble membrana, denominadas conexiones (Zhou et al., 2016). La conexina 43 (CX43), es predominante en las células de la granulosa y del cúmulo en numerosas especies (Cheng et al., 2015). La conexina 37 (CX37), en cambio, contribuye principalmente a las uniones gap que conectan los ovocitos con las CC adyacentes a través de proyecciones transzonales (TZP). Recientemente, investigamos la localización y los patrones de expresión específicos y dinámicos de los genes de conexas CX37 y CX43 y sus proteínas en los folículos ováricos caninos (De los Reyes et al., 2020). Nuestros resultados mostraron que el acoplamiento de los ovocitos con las células del cúmulo-granulosa y las células de la granulosa entre sí por CX37 y CX43 comienza en folículos primordiales y continúa a medida que la foliculogénesis progresa hasta folículo preovulatorio, pudiendo demostrar además, la participación de Cx37 y Cx43 en la detención meiótica prolongada en caninos hasta después de la ovulación. Sin embargo, es necesario profundizar estos hallazgos mediante el estudio de la regulación dinámica y/o transitoria postranscripcional de ovocitos y CC, como los factores que gobiernan el cierre tardío de estas conexiones más allá del alza de LH como ocurre en otras especies. Manejar *in vitro* la dinámica de las uniones GAP a través de las conexas permitirá un avance en lograr el reinicio y desarrollo meiótico de los ovocitos caninos.

Los desafíos en que hemos estado avanzando involucran el efecto de la apoptosis temprana durante el desarrollo folicular en la competencia meiótica de los ovocitos (Palomino y De los Reyes, 2021), el rol de la progesterona en estas conexas, considerando los altos niveles de esta hormona durante las fases finales de maduración del ovocito, y recientemente, dado que durante el crecimiento intra-folicular del ovocito hay una tasa alta de actividad transcripcional que conduce a una mayor síntesis de RNA y proteínas que regulan el desarrollo del ovocito, para entrar luego previo al reinicio meiótico a un silencio transcripcional, la evaluación de micro RNAs (Xu et al., 2011) en el desarrollo gamético abre nuevas posibilidades en el conocimiento del proceso de maduración del ovocito canino. El análisis de perfiles de miARN ayudará a comprender de la regulación génica involucradas en el desarrollo de ovocitos caninos.

Espermatozoides

Los espermatozoides eyaculados y epididimales pueden utilizarse en procedimientos *in vitro*. Los estudios de procedimientos de manejo espermático han avanzado últimamente en la criopreservación de los espermatozoides de estas diferentes fuentes de obtención espermática, siendo hasta la fecha los espermatozoides eyaculados los que han sido más estudiados ampliamente.

En los perros, los espermatozoides eyaculados se obtienen generalmente mediante manipulación digital o con el uso de una vagina artificial. Los espermatozoides del epidídimo se obtienen de la cola del epidídimo luego de la orquiectomía o por aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo (Hewitt et al., 2001). Cualquiera sea la forma de obtención de los espermatozoides, el manejo de ellos, más allá de la simple inseminación artificial, es su criopreservación, que es lo que en definitiva potencia el desarrollo biotecnológico a través de bancos de semen para ser utilizados en cánidos domésticos y silvestres.

Los protocolos y medios de criopreservación han diferido dependiendo de la procedencia de los gametos; pero, las muestras de espermatozoides criopreservados ya sea eyaculados o epididimarios muestran una disminución de la fertilidad en comparación con los espermatozoides frescos debido al daño en diferentes estructuras espermáticas, como el ADN, el acrosoma y la membrana plasmática, junto con modificaciones en las funciones celulares, incluida una reducción en la motilidad del espermatozoides (Palomino y De los Reyes, 2009). Por tanto, independiente del origen de obtención de los espermatozoides y del protocolo de criopreservación efectuado, en todos se requiere una adecuada evaluación de la viabilidad espermática post criopreservación, para, de ese modo, tener una mayor certeza de su utilización posterior.

Se han estudiado varias estrategias para determinar la calidad y viabilidad espermática después de la congelación. La exclusión con yoduro de propidio (PI) es la sonda más común para determinar la

viabilidad celular mediante la evaluación de un aumento en la permeabilidad de la membrana (Graham et al., 1990). Dentro de la célula, el PI puede intercalarse con el ADN y una vez que el tinte se une a los ácidos nucleicos, su fluorescencia aumenta de 20 a 50 veces. El PI es ampliamente utilizado para determinar la viabilidad celular. En muestras de espermatozoides de perro congeladas y descongeladas, la exclusión de PI muestra un bajo porcentaje de espermatozoides viables (Corcini et al., 2016), pero este marcador no se correlaciona con las tasas de fertilización porque las muestras con un alto porcentaje de células positivas para PI aún fecundan ovocitos (Martins et al., 2009). En muestras de espermatozoides criopreservado canino hemos evaluado a través de citometría de flujo la exclusión de PI observando un alto porcentaje de células positivas para PI, lo que podría atribuirse a un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática causado por el daño. Sin embargo, esta alta tasa se redujo significativamente cuando los espermatozoides se incubaron con dos inhibidores de canales de panexina (CBX y PBD) antes de la incubación con PI (Torres et al., 2017). Las proteínas pannexina se han descrito en diferentes células y forman canales permeables a moléculas como PI, lo que indica que el mecanismo del canal de panexina puede estar involucrado en la captación de PI. Por tanto, se podría sugerir que el ensayo PI subestima el porcentaje de células vivas.

Conclusión

Conocer la biología reproductiva de los gametos es fundamental para poder aplicar correctamente las biotecnologías reproductivas, tanto para promover la fertilidad en ciertas poblaciones, especialmente en aquellos como los cánidos silvestres, y también para disminuir la fertilidad en otras poblaciones como los animales en abandono.

Referencias

- Corcini CD, Goularte KL, Bongalhardo DC, Lucia T, Jardim RD, Varela AS.** Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia*. 2016, 48, 114–115.
- Cheng JC, Chang HM, Fang L, Sun YP, Leung PC.** TGF- β 1 up-regulates connective tissue growth factor expression in human granulosa cells through Smad and ERK1/2 signaling pathways. *PLoS One*. 2015,10, e0126532.
- **De los Reyes M, Palomino J, Gallegos C, Espinoza R, Dettleff P, Peralta OA, Parraguez VH, Ramirez G.** Gene and protein expression of connexins 37 and 43 in cumulus–oocytes complexes throughout the canine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development* 2020. 32(11) 976-987
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH.** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*. 1990. 43, 55–64.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GC.** Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*. 2001, 67 101-111.
- Lei R, Bai X, Chang Y, Li J, Qin Y, Chen K, Gu W, Xia S, Zhang J, Wang Z, Xing G.** Effects of fullerene nanoparticles on rat oocyte meiosis resumption. *Int. J. Mol. Science* 2018. 19, 699.
- Martins MI, Padilha LC, Souza FF, Lopes, MD.** Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009,44, 342–344.
- Palomino J, De los Reyes M.** A scanning electron microscope study of frozen/thawed dog sperm during *in vitro* gamete interaction. *Reproduction in Domestic Animals* 2009, 44, 278–283.
- **Palomino J, De los Reyes M.** Flow cytometric evaluation of canine follicular cell apoptosis during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2021, 00, 1–8.
- Peng Y, Wang X, He B, Ge H, Tao L, Peng F, Zheng N, Wang Q.** Pattern of cell-to-cell transfer of microRNA by gap junction and its effect on the proliferation of glioma cells. *Cancer Science*. 2019, 110,1947–1958.
- Renton JP, Boyd, JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey M J, Mullaney J, Perry B.** Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility* 1991, 93, 221–231.
- Russell DL, Gilchrist RB, Brown HM, Thomsom JG.** Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players? *Theriogenology* 2016, 86, 62–68.
- Torres J, Palomino J, Moreno, RD, De los Reyes, M.** Pannexin channels are involved in freezing/thawing IP-permeability increase in dog spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 2017, 29(11) 2269-2276.
- Xu YW, Wang B, Ding CH, Li T, Gu F, Zhou C.** Differentially expressed miRNAs in human oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011, 28: 559–566.



Zhou CJ., Wu, S. N., Shen, J. P., Wang, D. H., Kong, X. W., Lu, A., Li, Y. J., Zhou, H. Zhao XYF, Liang CG. The beneficial effects of cumulus cells and oocyte–cumulus cell gap junctions depend on oocyte maturation and fertilization methods in mice. *Peer Journal*. 2016, 4, e1761.
