

EFFECTE DE LA FOTOESTIMULACIÓ D'OÒCITS PORCINS EN LA MADURACIÓ, LA FECUNDACIÓ I EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Andrea Barceló^{1,*}, Marc Yeste¹, Sergi Bonet¹, Miriam Castillo-Martín^{1,*}

¹Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Edifici Jaume Casademont, porta E.

Carrer Pic de Peguera, 15. 17003, Girona.

*u1922676@campus.udg.edu, miriam.castillo@udg.edu

Resum

La fotoestimulació d'espermatozoides de porcí ha demostrat tenir efectes sobre diferents paràmetres, modificant el metabolisme cel·lular i incrementant la taxa de parts i el nombre de garrins totals i vius per part. Per contra, els efectes de la fotoestimulació en oòcits han estat poc estudiats o els resultats obtinguts presenten controvèrsia. L'objectiu d'aquest treball ha sigut avaluar els efectes de la fotoestimulació d'oòcits de porcí en les diferents etapes de la producció *in vitro* d'embrions. En aquest sentit, es van definir dos tractaments; el grup fotoestimulat, irradiats amb llum LED i el grup control, no irradiats. Posteriorment, ambdós grups es van madurar, fecundar i cultivar *in vitro*. El protocol de fotoestimulació utilitzat consistia en 5 minuts de llum, seguits de 5 minuts de foscor i 5 minuts de llum (5-5-5). Es van avaluar la maduració nuclear, la integritat de la membrana plasmàtica, la taxa de penetració i el desenvolupament embrionari. També es va analitzar la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa per ambdós tractaments. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives per a la maduració nuclear i la integritat de la membrana plasmàtica, ni tampoc per la penetració i el desenvolupament embrionari quan es comparen els dos grups. A més, no s'han obtingut diferències significatives entre la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa irradiades i les no irradiades (control). En conclusió, el protocol 5-5-5 de fotoestimulació no genera efectes significatius (ni positius ni deleteris) en la producció *in vitro* d'embrions porcíns pels paràmetres analitzats en el present estudi.

Paraules clau: Fotoestimulació, oòcits, cèl·lules de la granulosa, producció *in vitro*.

Abstract

Photo-stimulation has been demonstrated to affect boar sperm, modifying their metabolism and increasing reproductive performance (farrowing rates and number of both total and live-born piglets for parturition). In contrast, effects of photo-stimulation on oocytes have been less studied and results reported are controversial. The aim of this study was to evaluate the effects of photo-stimulation porcine oocytes during steps involved in embryo *in vitro* production. Regarding that, two treatments were established; photo-stimulated group, irradiated with LED light and control group, non-irradiated. After that, both groups were *in vitro* matured, fertilised and cultured. Photo-stimulation procedure consisted of 5 min light, 5 min rest and 5 min of further light (5-5-5). Finally, nuclear maturation, plasma membrane integrity, penetration rate and embryo development were assessed. Moreover, viability of granulosa cells was also analysed in both treatments. Results obtained did not show significant differences for nuclear maturation, plasma membrane integrity, penetration rates or embryo development when both groups were compared. Also, no significant differences were observed when viabilities of granulosa cells were compared between irradiated and non-irradiated (control) cells. In conclusion, 5-5-5 photo-stimulation procedure does not trigger significant effects (neither deleterious nor positive) on *in vitro* production of porcine embryos.

Key words: Photo-stimulation, oocytes, granulosa cells, *in vitro* production.

INTRODUCCIÓ

En els últims anys, s'ha observat que la fotoestimulació amb làser a nivells baixos (biofotomodulació) millora diversos paràmetres tissulars i cel·lulars, com el metabolisme (Abdel-Salam *et al.*, 2014). En aquest sentit,

s'ha suggerit que la fotoestimulació podria afavorir l'ús de gàmetes, tant masculins com femenins, en la reproducció assistida. Concretament, Yeste i col·laboradors (2016) van observar que la fotoestimulació d'espermatozoides incrementa la taxa de parts i el nombre de garrins totals i vius per part. D'altra banda, diversos inves-

tigadors s'han focalitzat en l'estudi dels efectes de la fotoestimulació en l'espermatozoide, analitzant paràmetres espermàtics com la viabilitat i la motilitat. En canvi, els efectes sobre la maduració oocitària i el posterior desenvolupament d'aquests han set pobrament estudiats.

La maduració dels oòcits, la fecundació i el desenvolupament dels embrions inclouen canvis nuclears i citoplasmàtics que depenen de diversos factors. En efecte, s'ha descrit que les cèl·lules de la granulosa indueixen les transformacions necessàries per regular el creixement i la maduració, ja que permeten el pas de factors de maduració a l'oòcit mitjançant unions comunicants (Fujiwara *et al.*, 1991). Recentment, Soares i col·laboradors (2014) van observar que el làser Heli-Neó (He-Ne) modula l'activitat mitocondrial de les cèl·lules de la granulosa. En concret, la fotoestimulació per làser He-Ne incrementa el potencial de membrana dels mitocondris d'aquestes cèl·lules però no altera la seva viabilitat (Soares *et al.*, 2014). D'altra banda, estudis previs han vist que la irradiació amb làser afecta negativament el procés de maduració i causa danys nuclears en oòcits de boví (Ocaña-Quero, 1998; Moreno-Millan i Ocaña-Quero, 2009). Tot i això, aquest efecte deleteri en la maduració i en el desenvolupament embrionari no es va observar a l'estudi de Soares i col·laboradors (2014), on aquests paràmetres no eren significativament diferents entre els oòcits de boví irradiats i els control.

A partir d'aquests antecedents, l'objectiu d'aquest estudi és analitzar els efectes de la fotoestimulació en els oòcits de porcí, específicament la maduració nuclear, el dany a la membrana plasmàtica de l'oòcit, la penetració i el desenvolupament embrionari. El treball també ha abordat l'estudi dels efectes de la fotoestimulació en la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa.

MATERIAL I MÈTODES

La maduració dels oòcits i la producció d'embrions va ser realitzada segons procediments convencionals (Castillo-Martín *et al.*, 2012).

Obtenció, fotoestimulació i maduració dels COCs

Els complexos cúmulus-oòcits (COCs) van ser aspirats d'ovaris de femelles pre-púber, obtinguts de l'escorxadors i es van seleccionar segons l'aspecte del citoplasma i el número de capes de cèl·lules del cúmulus. Abans de realitzar la maduració, els COCs es van dividir aleatòriament en grup control i grup fotoestimulat. Al segon grup s'hi va realitzar la fotoestimulació amb llum LED, amb un sistema programable (PhastBlue, GenIUL, S.L., Barcelona) durant 15 minuts, alternant 5 minuts de

llum, 5 minuts de foscor i 5 minuts de llum (5-5-5). El rang de longitud d'ona utilitzat (620 nm – 630 nm) es trobava en l'espectre del vermell. Posteriorment, els COCs van ser madurats 22 h en medi NCSU-37 (Petters i Wells, 1993) suplementat amb 0.57 mM cisteïna, 50 μ M β -Mercaptoetanol, 5 μ g/mL insulina, 10% (v:v) fluid fol·licular porcí (PFF), 1 mM dibutiril cAMP (dbcAMP), 10 IU/mL gonadotrofina coriònica equina (eCG) i 10 IU/mL gonadotrofina coriònica humana (hCG). Posteriorment, els COCs van ser incubats en medi de maduració sense dbcAMP i hormones durant altres 22 h.

Producció in vitro d'embrions porcíns

Per dur a terme la fecundació, es van seleccionar espermatozoides provinents de semen fresc (17°C) mitjançant un gradient de densitat discontinu de BoviPure™. A les 44 h de maduració *in vitro*, els oòcits van ser denudats de les cèl·lules de la granulosa i transferits al medi de fecundació TALP (Rath *et al.*, 1999) suplementat amb 3 mg/mL BSA lliure d'àcids grassos i 1.1 mM piruvat sòdic. Els espermatozoides (1×10^5 espermatozoides/mL) van ser coincubats amb els oòcits denudats (50 oòcits/500 μ L) durant 1 h i en medi de fecundació. Transcorreguda l'hora de coincubació, els oòcits van ser transferits a medi de fecundació fresc. A les 6 h post-inseminació (pi), els presumptes zigots van ser rentats i transferits a medi de cultiu NCSU-23 modificat (Petters i Wells, 1993) i suplementat amb 0.57 mM cisteïna, 50 μ M β -Mercaptoetanol, 5 μ g/mL insulina, 10 μ L/mL Medi Essencial Mínim (MEM), 20 μ L/mL Medi Basal Eagle (BME) i 4 mg/mL BSA. El procés de cultiu es va realitzar en microgotetes de 25 μ L de medi NCSU-23 (20-25 embrions/microgota) recobertes d'oli mineral. Totes les incubacions es van dur a terme en una atmosfera amb 5% CO₂, 38.5°C i màxima humitat.

Avaluació de la maduració i la integritat de la membrana plasmàtica dels oòcits

La determinació de la integritat de la membrana plasmàtica i l'estadi de maduració dels oòcits es va dur a terme amb un doble marcatge amb homodímer d'etidi i Hoechst 33342. El primer s'uneix als àcids nucleics dels oòcits no viables on la integritat de la membrana plasmàtica es troba alterada, mentre que el segon marca tots els nuclis. Els oòcits utilitzats per determinar la maduració nuclear i la integritat de la membrana plasmàtica van ser denudats de les cèl·lules de la granulosa a les 44 h de l'inici de la maduració *in vitro*. Posteriorment, els oòcits van ser incubats a 37°C amb 4 μ M homodímer d'etidi-1 d'acord amb el protocol descrit per Pomar i col·laboradors (2004). Després de 15 min, els oòcits es

van fixar amb una solució de glutaraldehyd al 25% en PBS, i posteriorment es van incubar amb Hoechst 33342 (5 µg/mL) i es van transferir a un portaobjectes de vidre. El marcatge es va observar sota microscopi de fluorescència i es van identificar els diferents estadis de maduració nuclear dels òcits: vesícula germinal (VG), metafase I (MI), telofase I/metafase II (TI/MII) i degenerat. Els òcits van ser considerats degenerats quan la cromatina estava marcada amb el Hoechst 33342, marcatge blau, i amb l'homodimer d'etidi, marcatge vermell, indicant que la membrana plasmàtica estava malmesa. També es van considerar degenerats els òcits que no estaven marcats i quan el citoplasma presentava fragmentacions. Els percentatges d'òcits en els diferents estadis es va calcular com la ràtio entre el número d'òcits en un estadi i el número total d'òcits analitzats.

Avaluació de la penetració i el desenvolupament embrionari

Entre les 16 i 18 h pi, una part dels presumptes zigots es van fixar i marcar amb Hoechst 33342. L'avaluació dels paràmetres de fecundació es va realitzar mitjançant el recompte del nombre de pronuclis presents i els caps descondensats sota un microscopi de fluorescència. Els òcits amb més d'un pronucli o un pronucli i un o més caps d'espermatozoide descondensats van ser considerats com a penetrats. La taxa de penetració es va calcular com la ratio entre els òcits penetrats i els òcits inseminats. Els òcits degenerats i immadurs (VG i MI) no es van incloure en el càlcul. Els zigots amb dos pronuclis o un pronucli i un cap d'espermatozoide descondensat van ser definits com a monospèrmics, mentre que els polispèrmics presentaven un pronucli i més d'un cap descondensat, o més de dos pronuclis.

La taxa de divisió embrionària es va valorar a les 48 h pi, i la taxa de formació de blastocists es va determinar a les 144 h pi. El percentatge de divisió i de desenvolupament es van calcular com el número d'embrions amb més de 2 blastòmers i el número d'embrions que van assolir l'estadi de blastocists, respectivament, entre el número d'embrions totals transferits a cultiu.

Anàlisi de la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa

Una vegada els òcits van ser desproveïts de les cèl·lules del cúmulus, aquestes es van centrifugar 5 min a 240 g a temperatura ambient, i posteriorment es van resuspendre en PBS. A continuació es van marcar amb SYBR (100 µM), durant 10 minuts a 37°C, i iodur de propidi (12 µM) durant 5 minuts a 37°C segons el protocol de Garner i Johnson (1995), i van ser analitzades amb el citòmetre de flux (citòmetre Cell Laboratory Quanta SC™; Beckman Coulter). El doble marcatge

amb aquests fluorocroms va permetre avaluar la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, les quals presentaven un color vermellós quan eren no viables, i verd quan eren viables.

Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme mitjançant un test-T de *Student* per determinar si existien diferències significatives entre el grup control i el grup fotoestimulat per totes les dades: taxa de maduració, penetració i monospèrmia, desenvolupament embrionari i viabilitat de les cèl·lules de la granulosa. El test-T de *Student* es va realitzar amb el programa estadístic IBM SPSS (Versió 23.0; Chicago, Illinois, EUA). El nivell de significació (p) va ser establert a 0.05.

RESULTATS

A partir dels resultats obtinguts, que es mostren a la Taula 1, s'observa que no hi ha diferències significatives entre el percentatge d'òcits que assoleixen l'estadi de telofase I i metafase II del grup exposat a fotoestimulació amb llum LED, i el grup control que no va estar exposat. Pel que fa a la integritat de l'oolema, el percentatge d'òcits degenerats és lleugerament superior, però no significativament distint, en els gàmetes exposats a la llum LED.

D'altra banda, la irradiació dels òcits abans de la maduració *in vitro* no va afectar el percentatge de penetració i el de monospèrmia, i tampoc al desenvolupament embrionari avaluat com percentatge de divisió (48 h pi) i el percentatge de blastocists (144 h pi), ja que no es van observar diferències significatives entre el grup control i el fotoestimulat, tal i com mostra la Taula 2. Pel que fa a l'anàlisi dels resultats de la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, representats a la Figura 1, la viabilitat observada al control i al fotoestimulat (76.22 ± 0.41 vs 71.67 ± 0.06 respectivament) va resultar ser similar, i sense diferències significatives.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'ha comprovat que la fotoestimulació amb llum LED dels òcits porcins amb el protocol realitzat (5-5-5) no té efectes negatius en la progressió de la meiosi i per tant en la maduració nuclear oocitària.

Aquests resultats concorden amb els estudis realitzats prèviament per Soares i col·laboradors (2014), on els òcits de boví van ser irradiats amb llum làser (He-Ne), i en el qual la maduració nuclear, determinada mitjançant el percentatge d'òcits amb el primer corpuscle

Taula 1. Efecte de la fotoestimulació en la maduració nuclear oocitària i la integritat de l'oolema.

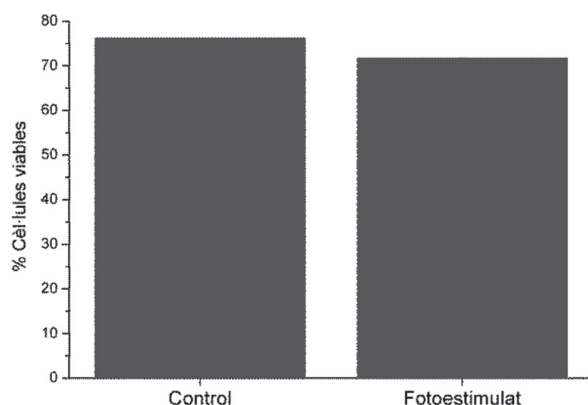
Tractament	Nº oòcits	Percentatge d'oòcits a l'estadi de			
		VG	MI	TI/MIH	Degenerat
Control	334	14.28 ± 2.39	11.30 ± 4.00	70.78 ± 5.15	4.08 ± 1.56
Fotoestimulat	206	10.22 ± 1.56	11.86 ± 4.91	72.25 ± 4.25	4.96 ± 2.40

Els valors mostren la mitjana del percentatge d'oòcits ± l'error estàndard de la mitjana.

Taula 2. Efecte de la fotoestimulació sobre paràmetres de fecundació (% penetració i % monospèrmia) i desenvolupament embrionari.

Tractament	Nº rèpliques	Penetració (%)	Monospèrmia (%)	Divisió (%)	Blastocists (%)
Control	4	53.52 ± 22.84	65.28 ± 21.56	34.00 ± 9.24	4.09 ± 1.87
Fotoestimulat	4	57.08 ± 18.49	50.19 ± 18.80	41.67 ± 13.29	4.96 ± 2.99

Els valors mostren la mitjana del percentatge ± l'error estàndard de la mitjana.

**Figura 1.** Percentatge de cèl·lules de la granulosa viables en el tractament control i el fotoestimulat.

polar extruït a diferents temps, tampoc es veia afectada. Per contra, l'estudi de Moreno-Millan i Ocaña-Quero (2009), també a l'espècie bovina i utilitzant llum làser He-Ne sí que va registrar un efecte significatiu en els processos de maduració amb dany a nivell citoplasmàtic i nuclear per aquells oòcits tractats respecte els no tractats.

A l'espècie porcina, un dels principals inconvenients és l'elevada incidència de la polispèrmia (50%) que té lloc durant la fecundació *in vitro* en relació a la realitzada *in vivo* (30 - 40%) (Yi *et al.*, 2007). Segons les condicions d'aquest estudi, tampoc s'han registrat efectes de la fotoestimulació en el percentatge d'oòcits penetrats ni en el nombre d'espermatozoides que penetren. El fet que no s'observi un increment en la taxa de

polispèrmia en els oòcits tractats respecte al grup control indica que la fotoestimulació no altera els processos implicats en el bloqueig de la fecundació polispèrmica com l'alliberament dels grànuls corticals.

La qualitat dels oòcits és determinant pel desenvolupament embrionari, tant per la divisió

com per la formació de blastocists, i depèn d'una gran ventall de factors. Entre aquests s'inclouen la mida del fol·licle, el metabolisme glicolític relacionat amb un augment del desenvolupament embrionari, la comunicació entre l'oòcit i les cèl·lules de la granulosa, i altres processos citoplasmàtics (Krisher, 2004). En aquest sentit, en el present estudi, la divisió i desenvolupament embrionari tampoc s'ha vist afectat per la fotoestimulació tal i com havien demostrat anteriorment Soares i col·laboradors (2014) determinant la taxa de divisió i de blastocists en l'espècie bovina. Tanmateix, aquests resultats suggereixen que el tractament dels COCs amb llum LED a l'espectre del vermell abans de la maduració no compromet la qualitat dels oòcits i tampoc la seva competència per assolir l'estadi de blastocist.

Per últim, també es va analitzar l'efecte de la fotoestimulació a la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, implicades directament en la maduració oocitària, efecte que no s'ha observat en les nostres condicions. Aquest fet també va en concordança amb els resultats de Soares i col·laboradors (2014), que no van veure una alteració en la viabilitat d'aquestes cèl·lules en boví. Tot i això, a l'estudi mencionat anteriorment, sí que es va registrar un augment de l'activitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules. Aquests resultats són similars als obtinguts en gàmetes masculins on també s'ha vist que la fotoestimula-

ció amb llum LED (10 min llum, 10 min fosc, 10 min llum) incrementa significativament el potencial de la membrana mitocondrial (Yeste *et al.*, 2016).

Amb tot, i malgrat l'absència d'efectes deleteris, no s'ha observat cap efecte de millora en cap dels paràmetres analitzats, de manera que són necessaris altres estudis que modifiquin els protocols de fotoestimulació (temps d'irradiació i/o rangs de longitud d'ona) i que avaluïn altres paràmetres com l'activitat mitocondrial per verificar l'efecte de la fotoestimulació en òcits porcins.

En conclusió, la fotoestimulació d'òcits amb llum LED amb el tractament de 5 minuts de llum, seguits de 5 minuts de fosc i 5 minuts de llum no afecta al rendiment dels processos de producció *in vitro* d'embrions porcins.

AGRAÏMENTS

A Frigorífics Costa Brava S.A. pel proveïment d'ovaris per realitzar aquest estudi, i a Estela García, Laia Lladó i Irene Soler pel seu suport tècnic.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Salam, Z.; Harith, M.A. (2015). «Laser researches on livestock semen and oocytes: a brief review». *J Adv Res.*, vol. 6, núm. 3, p. 311-317.
- Castillo-Martín, M. [et al.] (2012). «Cryotolerance of *in vitro*-produced porcine blastocysts is improved when using glucose instead of pyruvate and lactate during the first 2 days of embryo culture». *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 24, núm. 5, p. 737-745.
- Fujiwara, A. [et al.] (1991). «Activating effects of light irradiation at various wavelength on the respiration in sperm of the echinoid, *Urechis unicinctus*, in the presence of carbon monoxide». *J Biochem.*, vol. 109, núm. 3, p. 486-491.
- Garner, D. L.; Johnson, L. A. «Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide». *Biol. Reprod.*, vol. 53, núm. 2, p. 276-284.
- Krisher, R.L. (2004). «The effect of oocyte quality on development». *J Anim Sci.*, vol. 82, Suppl. E, p. 14-23.
- Moreno-Millán, M.; Ocaña-Quero, J.M. (2009). «Preliminary results of the evaluation of the use of clinical laser He-Ne radiation in the process of bovine 'in vitro' fertilization». *Bulletin UASVM Vet Med.*, vol. 66, núm. 1, p. 495.
- Ocaña-Quero, J.M. [et al.] (1998). «Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation increases the incidence of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division *in vitro*». *Lasers Med Sci.*, vol. 13, núm. 4, p. 260-264.
- Petters, R.M.; Wells, K.D. (1993). «Culture of pig embryos». *J. Reprod. Fertil Suppl.*, vol. 48, p. 61-73.
- Pomar, F.J. [et al.] (2004). «Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study». *Theriogenology*, vol. 63, núm. 8, p. 2254-2268.
- Rath, D. [et al.] (1999). «*In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer». *J. Anim. Sci.*, vol. 77, núm. 12, p. 3346-3352.
- Soares, C.A. [et al.] (2014). «Photobiological effect of low-level laser irradiation in bovine embryo production system». *J Biomed Opt.*, vol. 19, núm. 3, p. 35006-1-35006-9.
- Yeste, M. [et al.] (2016). «Specific LED-based red light photo-stimulation procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates». *Sci Rep.*, vol. 6, 22569.
- Yi, Y.J. [et al.] (2007). «Ubiquitin C-terminal hydrolase-activity is involved in sperm acrosomal function and anti-polyspermy defense during porcine fertilization». *Biol Reprod.*, vol. 77, núm. 5, p. 780-793.

