

LA SUPRESIÓN DEL GEN *tpc2* NO AFECTA A LA CAPACIDAD FECUNDANTE *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES EN LA ESPECIE PORCINA

Navarro-Serna¹, S., Piñeiro-Silva¹, C., Almela³, L., Poto³, A. Parrington², J., Romar¹, R. y Gadea¹, J.
¹Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. IMIB-Arrixaca. ²Dept. Pharmacology, Universidad de Oxford, Oxford, UK. ³IMIDA-Murcia; jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

Los canales permeables a cationes, *Two-pore channel* (TPC), se encuentran en las membranas endolisosomales (Galione *et al.*, 2011) y están relacionadas con distintos procesos fisiopatológicos (Zong *et al.*, 2009). En mamíferos se encuentran dos tipos: TPC1 y TPC2 (Parrington & Tunn, 2014); se expresan en testículos de ratón (Zong *et al.*, 2009) y la proteína TPC1 participa en la reacción acrosómica en esta especie (Arndt *et al.*, 2014). En el cerdo, ambas proteínas se encuentran en el epidídimo (Petryszak *et al.*, 2014) aunque hasta la fecha no se ha estudiado su función en espermatozoides (SPZ). Nuestro objetivo fue evaluar la capacidad fecundante en un sistema *in vitro*, que presentan los SPZ de un verraco knock-out para TPC2 (KO-TPC2) (Navarro-Serna *et al.*, 2021) usando como control un *wild-type* de fertilidad probada (WT).

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos eyaculados de un verraco KO-TPC2 se congelaron (Thiman 1997). Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) fueron obtenidos de ovarios de cerdas prepúberes y madurados *in vitro* en medio NCSU-37 (38°C, 5%CO₂, 7%O₂) (Cánovas *et al.*, 2017) e inseminados en medio TALP (38°C, 5%CO₂, 7%O₂). Se descongeló una pajueta (38°C, 30'') y los SPZ se seleccionaron mediante swim-up en NaturARTs-PIG sperm swim-up (EmbryoCloud, Murcia, España) (Navarro-Serna *et al.* 2021). A las 20h un grupo de presuntos cigotos fueron fijados y teñidos con Hoechst para evaluar la media de SPZ unidos a la zona pelúcida (S/ZP), media de SPZ penetrados por ovocito (S/O), tasa de penetración, monospermia y eficiencia de la fecundación *in vitro* (FIV). El resto de cigotos se cultivaron en medio NCSU23 (38°C, 5%CO₂, 7%O₂) hasta día 6 post-inseminación (pi) (Cánovas *et al.*, 2017). El día 2 pi se evaluó la tasa de primera división (divididos/ovocitos totales %D) y a día 6 pi la tasa de blastocistos (blastocistos/ovocitos totales, %B) que fueron fijados y teñidos con Hoechst para realizar recuento celular. Se evaluaron dos replicados de cada grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta experiencia preliminar se ha observado una tendencia ($p=0,06$) en el porcentaje de penetración, siendo mayor en el grupo KO (75,6%, $n=41$) que en el WT (56,5%, $n=46$), sin diferencias ($p>0,05$) en los otros parámetros siendo S/O (WT=1,5±0,2 y KO=1,7±0,2), S/ZP (WT=1,5±0,3 y KO=2,6±0,5), monospermia (WT=69,2% y KO=61,3%) y eficiencia (WT=39,1% y KO=46,3%). En cuanto al desarrollo embrionario, se observaron valores similares ($p>0,05$) en %D (WT=51,4%, $n=105$ y KO=61,7%, $n=107$), %B (WT=29,5% y KO=32,7%) y recuento celular ($n=58$; WT=51,4±3,1 y KO=46,4±2,2 células/blastocisto). Nuestros resultados muestran que el semen procedente de cerdos KO-TPC2 es capaz de fecundar y dar lugar a embriones en tasas similares al semen WT. TPC2 se encuentra expresada en tejido reproductivo masculino al igual que TPC1 (Arndt *et al.*, 2014) y por tanto su función podría estar siendo compensada por TPC1. Esta hipótesis deberá ser contrastada en el futuro con nuevos modelos KO, para TPC1 y dobles KO TPC1 y TPC2.

CONCLUSIÓN

A pesar de que la expresión de TPC2 se encuentra descrita en las gónadas masculinas, no parece ser una proteína necesaria en el espermatozoide para la fecundación ni a el desarrollo embrionario *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Arndt, L., *et al.* 2014. Mol. Biol. Cell. 25: 948-964. • Cánovas, S., *et al.* 2017. ELife. 6: e23670. Galione, A., *et al.* 2011. Sci. China Life Sci. 54:725-732. • Parrington, J., 2014. Acta Physiol. 211: 285-296. • Petryszak, R., 2014. Nucleic Acids Res. 42(D1): D926-D932. • Navarro-Serna, S., *et al.* 2021. Crispr. J. 4: 1-16. • Zong, X., Pflügers Archiv. – Eur. J. Physiol. 458: 891–899. • Thilmant, P., *et al.* 1997. JRP de France 39: 295.

Agradecimientos: Proyectos MINECO AGL2015- 66341-R, Fundación Seneca Región de Murcia 20040/GERM/16 y 21105/PDC/19 Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por las ayudas para la Formación de Profesorado Universitario.