

EFECTO DEL MÉTODO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA BOVINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y TASA DE FERTILIZACIÓN *in vitro*¹

Raúl H. De León-García²; Roderick A. González M³; Pedro Guerra M³; Kristel Flores⁴

RESUMEN

Los espermatozoides mamíferos no son capaces de fertilizar el ovocito inmediatamente; primero deben sufrir un periodo de preparación llamado capacitación espermática, que se define como el conjunto de modificaciones que ocurren después de la maduración en el epidídimo, y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito. Un primer requisito en el proceso de preparación de los espermatozoides para la fertilización *in vitro* (FIV) bovina incluye la separación de los mismos del diluyente y/o del crioprotector. Con el objetivo de examinar el efecto que tiene el método de capacitación sobre la concentración y la tasa de fertilización se realizó este trabajo en el Laboratorio de Biotecnología del IDIAP. Para ello se utilizaron ovocitos provenientes de ovarios *post mortem* que fueron transportados al laboratorio donde se puncionaron los folículos antrales (entre 2 mm y 5 mm). Posteriormente, se seleccionaron ovocitos con más de cinco capas de células del cúmulo y se colocaron a madurar por 20 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la FIV. Para la separación de la fracción espermática motil se utilizaron los métodos Gradiente de Percoll® y Swim up. La concentración espermática se midió utilizando un SpermaCue® y la tasa de fertilización se evaluó a las 18 horas post fertilización utilizando microscopio con aumento de 100x. Los resultados indicaron que la mayor concentración espermática y tasa de fertilización se observaron con Swim up ($4,8 \times 10^6$ y $83,7 \pm 7,8 \%$, respectivamente), mientras que con el Gradiente de Percoll se lograron valores de $3,5 \times 10^6$ y $60,22 \pm 6,3\%$ para concentración espermática y tasa de fertilización. La producción total de embriones con ambos métodos fue de 95 embriones transferibles, con una tasa de desarrollo de 21,7%. En este estudio se observó que la motilidad espermática no influyó en la tasa de fertilización y se concluye que ambos métodos de capacitación espermática son aptos para la producción de embriones *in vitro*.

Palabras clave: Crioprotector, ovocitos *post mortem*, maduración, fracción espermática motil, embrión.

¹ Recepción: 23 de junio de 2020. Aceptación: 1 de mayo de 2021. Trabajo para optar por el Título de Ing. Agr. con orientación en Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá. Financiado por el Proyecto Mejoramiento de las Técnica de Biotecnología Animal utilizadas en el Mejoramiento Animal del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).

² IDIAP. Centro de Innovación Agropecuario Oriental. subcentro de Buena Vista. Ing. Zootecnista.
e-mail: raulherminio@gmail.com

³ IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria Chiriquí. Estación Experimental de Gualaca.

⁴ Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Estudiante graduando.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

EFFECT OF BOVINE SPERM CAPACITATION METHOD ON CONCENTRATION AND RATE OF *in vitro* FERTILIZATION

ABSTRACT

Mammalian sperm are not able to fertilize the oocyte immediately; they must first undergo a preparation period called *sperm capacitation*, which is defined as the set of modifications occurring after sperm maturation in the epididymis, giving it the ability to fertilize the oocyte. A first requirement in the process of preparing bovine sperm for *in vitro* fertilization (IVF) includes the separation of the sperm from the diluent and/or cryoprotectant. This work was carried out at the Biotechnology Laboratory of IDIAP in order to examine the effect of sperm capacitation method on concentration and fertilization rate of *in vitro* fertilization. For this purpose, oocytes from post-mortem ovaries were collected and transported to the laboratory where the antral follicles (between 2 mm and 5 mm) were punctured. Subsequently, oocytes with more than 5 layers of cumulus cells were selected and matured for 20 hours. After this time, IVF was carried out. The Gradient methods of Percoll® and Swim up were used for the separation of the motile sperm fraction. Sperm concentration was measured using a SpermaCue® and the fertilization rate was evaluated at 18 hours post-fertilization using a microscope with an increase of 100x. The results indicated that the highest sperm concentration and fertilization rate were observed with Swim up ($4,8 \times 10^6$ and $83,7 \times 7,8 \%$ respectively), while the values with the Percoll Gradient were $3,5 \times 10^6$ and $60,22 \times 6,3\%$ for sperm concentration and fertilization rate. The total production of embryos with both methods was 95 transferable embryos, with a development rate of 21,7%. This study reported that sperm motility did not influence the fertilization rate and concludes that both sperm capacitation methods are suitable for *in vitro* embryo production.

Key words: Cryoprotective, post mortem oocytes, maturation, motile sperm fraction, embryo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los eventos importantes que regulan la fecundación, es la capacitación espermática y la reacción del acrosoma, esto debido a que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar al ovocito y deben permanecer por un cierto período de tiempo en el tracto reproductivo femenino para adquirir la capacidad fecundante, fenómeno éste que se ha denominado capacitación espermática, (Austin, 1951; Chang, 1951). Este período es variable en las diferentes especies y en los bovinos se ha descrito que duraría aproximadamente 4 horas (Morrow, 1986).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Se ha definido a la capacitación como los cambios que preparan al espermatozoide para la hiperactivación y reacción acrosómica. Esta última es un pre-requisito para la penetración de la zona pelúcida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, constituyendo un mecanismo de control para la fecundación (Barros y Berríos, 1977; Yanagimachi, 1988; Fraser, 1992).

De acuerdo con algunos autores (Yanagimachi, 1989; Fraser, 1990), entre los cambios que ocurren durante la capacitación, previo a la hiperactivación y reacción acrosómica, se encuentra la alteración de las glicoproteínas de la superficie del espermatozoide, las modificaciones de las proteínas y lípidos de la membrana plasmática al calcio y la activación del sistema adenilato ciclasa.

La reacción acrosómica puede considerarse como una secreción celular, durante la cual, las membranas plasmáticas y acrosómica externa se abren y se fusionan progresivamente entre sí (Bedford y Cooper, 1978; Roldan y Harrison, 1990), permitiendo que el espermatozoide establezca una unión secundaria con la zona pelúcida, iniciando así su paso a través de ella para más tarde fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Barros y Berríos, 1977).

In vivo, la capacitación espermática es adquirida durante la migración de los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino y la reacción acrosómica cuando los espermatozoides se unen a la zona pelúcida (Parrish et al., 1988; Parrish et al., 1989). Imitar *in vitro* estos fenómenos que ocurren naturalmente en el tracto reproductivo femenino, es de gran interés y representa un desafío importante en los estudios de fecundación; es por ello que para lograr este propósito, se han desarrollado diversas técnicas en las diferentes especies, utilizando variados regímenes de incubación, mientras que *in vitro*, este proceso puede ser mimetizado eliminando el plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal (Visconti et al., 2002).

Para realizar los estudios de fecundación *in vitro* (FIV) en la especie bovina se han desarrollado una serie de protocolos para inducir la capacitación espermática (Van Soom



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

y De Kruif, 1996). Un primer requisito en el proceso de preparación de los espermatozoides para la FIV bovina incluye la separación de los mismos del plasma seminal, del diluyente y/o del crioprotector. Este proceso permite la selección de una subpoblación espermática que presente una buena motilidad.

Entre los tratamientos espermáticos utilizados habitualmente en los laboratorios se encuentran los lavados que se realizan con medios con albúmina o a través de centrifugaciones en un gradiente. En la mayoría de los casos, el medio de capacitación contiene sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), un aceptor de colesterol (normalmente albúmina), bicarbonato y calcio, además de determinados electrolitos.

Entre los métodos de selección de espermatozoides bovinos destacamos el gradiente de Percoll® (Saeki et al., 1990), la técnica de swim-up (Parrish y Foote, 1987), la migración a través de una columna de ácido hialurónico (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994) y la filtración a través de lana de vidrio (Pereira et al., 1999).

El método de preparación de los espermatozoides determina los resultados de la FIV, por lo que el estudio de los patrones de capacitación puede ser fundamental para optimizar el proceso de allí que se hace necesario estandarizar un método de capacitación espermática que garantice la fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

Obtención y Maduración de los ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de vacas sacrificadas en matadero, colocados en solución salina fisiológica estéril + antibiótico (NaCl 0,9% + mezcla de penicilina-estreptomicina (0,75 mg/L) y transportados a temperatura ambiente al laboratorio de Biotecnología Animal del IDIAP. La colección de ovocitos y la maduración *in vitro* (MIV) fueron realizadas por el método previamente descrito por De León-García et al., 2012.

Capacitación Espermática

Para la fertilización *in vitro*, se utilizaron pajuelas comerciales de 0,5 cc con concentraciones de 30×10^6 de la misma casa comercial y el mismo toro. Dos horas antes de la fertilización *in vitro* (FIV) se procedió a la capacitación espermática (16 a 18 horas de



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

iniciada la MIV) de utilizando para la separación de la fracción espermática móvil las siguientes metodologías:

Método de “nadando hacia arriba” (Swim-up, Parrish et al., 1986).

Para ello se utilizaron 10 ml del medio de cultivo base TALP SPERM suplementado con 60,0 mg de Albúmina Bovina (BSA fracción V); 100,0 μ l de piruvato y 5,0 μ l de gentamicina.

Para separar la fracción móvil se tomó un tubo cónico de centrifuga de 10 ml al que se le añadió 1 ml de medio de capacitación (TAL SPERM suplementado) y se colocó en baño maría a 37,5 °C por 15 minutos. Luego se tomó una pajuela comercial de semen congelada-descongelada de 0,5 ml y se descargó el contenido en el fondo del tubo con el medio de capacitación, evitando la mezcla entre el semen y el medio de capacitación. Durante el proceso se tapó el tubo herméticamente; con el fin de evitar intercambio del medio con el aire. Una vez finalizado esta fase se colocó nuevamente el tubo con la dosis de semen en baño maría durante una hora más.

Pasada la hora, se retiró el tubo del baño maría y se extrajo la fase superior y la interface con una micropipeta de 1 μ l y se descargó, lo colectado, lentamente en un tubo cónico limpio y se le adiciono 1 μ l de medio dejándolo reposar por cinco minutos luego de los cuales se le agrego 4 ml más de medio y se centrifugó por 10 minutos (800 a 1,200 rpm). Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 200 μ l de medio en los cuales se mezcló el pellet (Figura 3) y se mantuvo a 37,5 °C durante la determinación de la concentración espermática (Figura 1).

Método de Gradiente de Percoll®

Para separar la fracción móvil de espermatozoides por este método, se colocaron, en un tubo de ensayo, dos cantidades del Percoll® a concentraciones distintas; la de mayor concentración (90%) se depositó al fondo del tubo y la menor concentración (45%) en la superior, con la intención de que se producirá una interface entre ambas concentraciones. Para preparar estas concentraciones, se tomaron 9 ml de Percoll® isotónico, al que se le agrego 1ml de medio de capacitación para preparar una dilución de 90%. De esta solución



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

al 90%, se tomaron 2 ml y se le añadieron 2 ml de medio de capacitación para obtener lo 45% de Percoll®.

El semen descongelado se depositó como una capa en la superficie de esta preparación y se sometió a centrifugación (Figura 2). Con este método, la migración de los espermatozoides está determinada por su vitalidad, por lo que los espermatozoides vivos se sedimentan formando un pellet, el cual se re-suspende y somete a conteo para determinar la concentrar espermática (Rosenkrans et al., 1993).

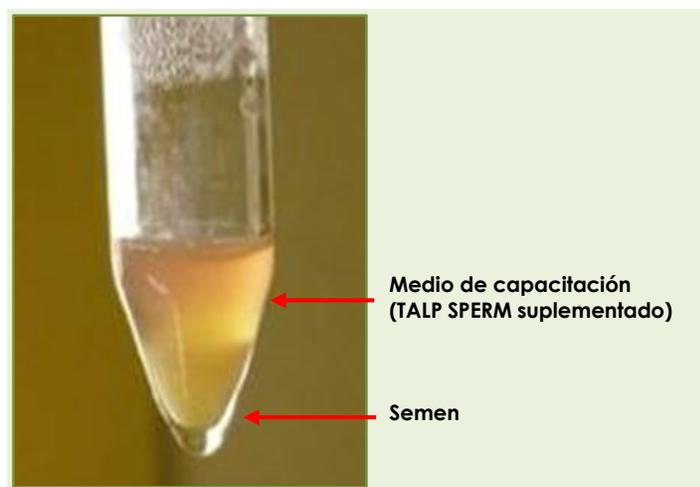
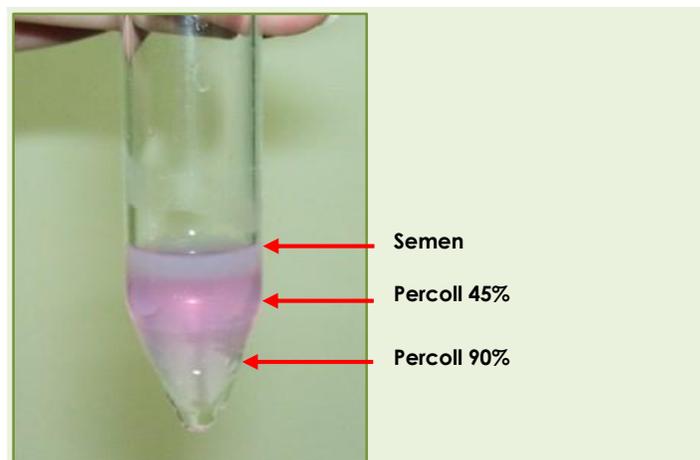


Figura 1. Método "nadando hacia arriba" (Swim up, Parrish et al., 1986) para la separación de la fracción espermática móvil.



(Montes, 2008).

Figura 2. Método de gradiente de Percoll® para separar la fracción espermática móvil



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Después de esta primera centrifugación y la formación del pellet, se retiró el líquido sobrenadante, añadiendo 3 cc de medio TALP SPERM para lavar el pellet y nuevamente se centrifuga por 10 minutos a 1,200 rpm. Una vez terminada la segunda centrifugación, se retira el medio de lavado para obtener el pellet final (Figura 3) y determinar su concentración espermática y motilidad para realizar la fertilización *in vitro*.



Figura 3. Pellet labil final resultado de la centrifugación con el que se realizó la fertilización *in vitro*.

Determinación de la concentración espermática

La determinación de la concentración espermática se realizó utilizando un SpermCue® (Figura 4). Para el cálculo del volumen de semen a agregar en cada pozo de 400 μ l y obtener una concentración de 1×10^6 espermios/ml se utilizó la siguiente fórmula aplicada por Lliteras (2007) y Montes (2008):

$$X = 400/C$$

Donde;

X= Volumen de medio TALP SPERM conteniendo los espermatozoides que se va a agregar en 400 μ l

C= Conteo en la cámara Neubauer o SpermCue®

400= Volumen en cada pozo (en micro litros (μ l))



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



Figura 4. SpermCue® utilizado para determinar la concentración espermática.

Fertilización

Previo a la fertilización, los complejos cúmulos ovocitos (CCOs), fueron transferidos del medio de maduración (MIV) al medio de fertilización *in vitro* (MFIV) el cual utiliza como base el TALP SPERM suplementado con 20,0 μ l de Piruvato; 100,0 μ l de Glucosa; 100,0 μ l de Heparina 60,0 mg de BSA y 10,0 μ l Gentamicina.

Antes de añadir el volumen calculado conteniendo una concentración de espermios de 1×10^6 , se evaluó la motilidad y luego se procedió a fertilizar los CCOs colocados en el MFIV. El volumen se depositó en cada pozo y luego se incubaron durante 22 horas a 38,5 °C; 5% de CO₂ y >90% de humedad relativa para su incubación.

Cultivo de posibles cigotos.

Transcurridas 22 horas desde el momento de la fertilización de los ovocitos, los posibles cigotos fueron colocados en un vial de 1,5 ml en medio de lavado TCM-199 con NaHCO₃ + Hepes y sometidos a agitación en un vórtex por un minuto para su denudación. Los cigotos recuperados se colocaron en un plato de 35 mm con medio de lavado para su búsqueda y clasificación. Luego de recuperados y clasificados, fueron transferidos al medio de cultivo CR1aa (Rosekrans y First, 1993) colocando 30 ovocitos/pozo.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Para la preparación del medio de cultivo CR1aa se utilizaron 9ml del medio CR1aa, al que se le adicionó, 50 µl de L- Glutamina; 10 µl de piruvato; 10 µl de gentamicina y 1,0 ml de SFB: La esterilización se realizó por filtración con filtros millipore de 0,2 µl. Luego se prepararon los platos de cultivo de cuatro pozos con 400 µl de medio por pozo, equilibrando el medio por una hora y media a 38,5 °C, 5% de CO₂ y >90% de humedad relativa antes de colocar los cigotos.

La incubación se realizó durante cinco días en una incubadora de CO₂ a 38,5 °C, 5% de CO₂ y >90% de humedad relativa, después de los cuales se procedió a renovar el 100% del medio de cultivo con medio nuevo previamente equilibrado por dos horas, hasta el día siete en que fueron evaluados los estadios de desarrollo embrionario y la calidad de los embriones producidos.

RESULTADOS

Los resultados mostraron una mayor concentración espermática móvil cuando se utilizó el método “*nadando hacia arriba*” (Swim up) que con Gradiente de Percoll® (4,8 x 10⁶ vs 3,5 x 10⁶). Otros autores reportan una mayor concentración espermática cuando utilizan Gradiente de Percoll®, lo que podría deberse a que en la técnica de Swim-up los espermatozoides motiles deben migrar al medio de cultivo, mientras que en Gradiente de Percoll® la selección es por centrifugación y se seleccionan espermatozoides con motilidad progresiva más heterogénea, así como también espermatozoides inmóviles (Englert et al., 1992 Parrish et al., 1995; De los Reyes et al., 1996).

La mayor tasa de fertilización se logró con el método Swim-up (83,68% ± 7,8), mientras que con Gradiente de Percoll® la tasa fue de 60,22% (± 6,3), concordando con los resultados logrados por Parrish et al. (1995), quienes indican que utilizando Swim-up se pueden alcanzar tasas de fertilización de hasta 74% mientras que con Gradiente de Percoll® se pueden lograr medias de 52%.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ambas metodologías utilizadas para la separación de la fracción espermática motil son eficaces en la producción de embriones *in vitro* (Figura 5).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

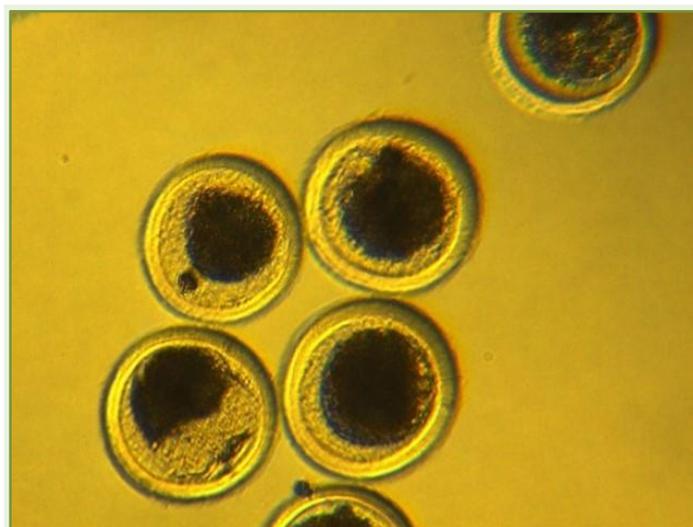


Figura 5. Embriones transferibles producido en el laboratorio de biotecnología animal fertilizado utilizando el método de swim up.

REFERENCIAS

- Austin, C.R. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Austr. J. Sc. b4, 581 - 96.
- Barros, C., y Berríos, M. (1977). Is the activated spermatozoon really capacitated? J. Exp. Zool. 201, 65 - 72.
- Bedford, J.M., y Cooper, G.W. (1970). Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate eggs. En: Membrane Fusion. Poste, G. & Nicholson, G. L. (Eds). Amsterdam: Elsevier. p. 65 - 125.
- De Leon-Garcia, R. H, González, R.A., y Guerra, P. (2012). Manual técnico para la producción de embriones *in vitro*. Instituto De Investigación Agropecuaria De Panamá. 38 p.
- Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposits into the fallopian tubes. nature 168, 697-698.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- De Los Reyes, M., Almendra, C., Berland, M., Del Campo, H., y Barros, C. (1996). Selección de espermatozoides de toro para fecundación *in vitro*. Arch. Med. Vet. 1, 31-38.
- Englert, Y., Van Den Bergh, M., Rodesch, C., Bertrand, E., Biramane, J.Y., y Legreve, A. (1992). Comparative auto-controlled study between swim-up and percoll preparation of fresh semen samples for *in-vitro* fertilization. Human Reproduction, 7(3), 399-402.
- Fraser, L. (1992). Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. Arch. Pathol. Lab. Med. 116, 345-350.
- Lliteras, E. (2007). Manual de Fertilización *in vitro*. La Habana, Cu. Centro de Investigación y Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical. p. 55.
- Montes, I. (2008). Manual de Semen. Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal y Ganadería Tropical. C.I.M.A.T.G.T. La Habana, Cuba. Inédito.
- Morrow, D.A. (1986). Current therapy in theriogenology 2° Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1143 p.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., y First, N.L. (1995). *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up Separated frozen- thawed bovine semen is repetable and results is high frequencies of fertilization theriogenology.
- Parrish, J.J., y Foote, R.H. (1987). quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. J. Androl. 8, 259-266.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, A., y First, N.L. 1988. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. Bio. Reprod. 38, 1171-1180.
- Parrish J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M., y First N.L. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol Reprod 1989; 40, 1020-1025.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

- Pereira, R.J., Tuli, R.K., Wallenhorst, S., y Holtz, W. (2000). The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore a23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 185- 192.
- Roldan, E., y Harrison, R. (1990). Molecular mechanism leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. En: *Fertilization in mammals*. Serono Symposia, U.S.A. Bavister, B.D., Cummins, J. & Roldan, E.R. (Eds), pp. 179-195.
- Rosenkrans, C.F., Zeng, G.Q., Namara, G.T., Schoff, P.K., y First, N.L. (1993). Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*.
- Saeki, K., Hoshi, K., Leibfreidrutledge, M.L., y Fisrt, N.L. (1990). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available FSH. *Theriogenology*, 34, 1035-1039.
- Shamsuddin, M., y Rodriguez-Martinez, H. (1994). A simple, nontraumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 61-75.
- Van Soom, A., y De Kruif, A. (1996). oocyte maturation, sperm capacitation and preimplantation development in the bovine: Implications for *in vitro* produciton of embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 687- 701.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., y Diezman, A.B. (2002). *J. Reprod. Immunol.* 53, 133-150.
- Yanagimachi, R. (1988). Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction E.* Knobil Y J.D. Neilly (Ed) 1, 135–185.
- Yanagimachi, R. (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fertil.* 38 (Suppl.) 27-33.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).