



Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Roger D Salgado^{1,3}, MVZ,MSc; Clara C Rugeles^{2,3}, MVZ,MSc; Jaime Alvarez^{1,3}, MVZ, Esp
⁷Programa de Reproducción animal ²Programa de morfofisiología
³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba
 rodasao@yahoo.es

(Recibido: 21 octubre, 2004; aceptado: 9 junio, 2005)

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de heparina y de semen en el medio de fertilización sobre el porcentaje de oocitos bovinos fertilizados in vitro. En el experimento uno, los oocitos obtenidos de ovarios de matadero fueron madurados in vitro y distribuidos al azar en seis tratamientos para fertilización in vitro, de acuerdo a las concentraciones de heparina (2, 4, 8, 10, 16, 20 µg/ml). En el experimento dos, una vez seleccionada la concentración de heparina en el experimento 1, se evaluaron tres dosis de espermatozoides en el medio de fertilización (0.5x10⁶ espermatozoides/ml, 1x10⁶ espermatozoides/ml y 2x10⁶ espermatozoides/ml). En cada experimento se utilizó un diseño completamente al azar y los datos fueron analizados por ANAVA. La concentración de heparina tuvo efecto (p<0.05) en el porcentaje de oocitos fertilizados encontrándose los mejores resultados en la concentración de 10 µg/ml, con una tasa de penetración del 67%. La concentración espermática afecta la fertilización, encontrándose la mayor proporción de oocitos con fertilización normal (74%) al utilizar concentración 2x10⁶ espermatozoides/ml. Sin embargo, no fue significativamente diferente a la concentración de 1x10⁶ (p>0.05). Los resultados indican que la tasa de fertilización guarda relación directa con la dosis de heparina y la concentración espermática.

Palabras clave: bovino, fertilización in vitro, heparina, swim up.

Introducción

Los espermatozoides mamíferos no son capaces de fertilizar oocitos inmediatamente después que son depositados en el tracto reproductivo femenino; ellos primero tienen que sufrir un periodo de preparación llamado capacitación. Durante la capacitación se da la alteración de la membrana plasmática para permitir al espermatozoide realizar la fusión de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, denominada reacción acrosómica. *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 (14,15), mientras que *in vitro*, una de las formas ampliamente utilizadas consiste en la exposición del semen a la heparina para que puede adquirir la capacidad fertilizante. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones de heparina y número variable de células espermáticas para alcanzar óptimos resultados en fertilización de oocitos bovinos *in vitro*.

Materiales y métodos

Los ovarios fueron obtenidos de vacas sacrificadas en matadero, colocados en solución salina 9% a una temperatura de 30-35°C. y transportados al laboratorio en un tiempo de 30 minutos. La colección de oocitos y la maduración *in vitro* (IVM) fueron realizadas por el método previamente descrito por Chacón y Estrada (3). El medio de maduración consistió en: medio-199 con 0.026M de bicarbonato de sodio, pH 7.4; suplementado con 10% (v/v) de suero de vaca en estro recolectado el primer día del estro e inactivado a 56°C por 30 minutos.; 0.2mM piruvato de sodio, 50mg/ml gentamicina, 80UI/ml HCG, 1mg/ml de 17-β estradiol, y 45mg/ml de FSH porcina. Todos los cultivos fueron realizados con una tensión de 5% CO₂ en aire, a 39°C y humedad relativa del 90%.

De los oocitos seleccionados como buenos (complejo cumulus-oocito no expandido y citoplasma granulado y homogéneo) se seleccionaron grupos de 10-12 oocitos al azar, los cuales fueron transferidos dentro de gotas de 50ml en discos de cultivo estériles 60 x 15mm cubiertas con 10 ml de aceite mineral previa estabilización de las gotas mínimo 2 horas y cultivados en una incubadora por 24 horas a 39 °C en una atmósfera de aire con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 90 %.

Después de la maduración los oocitos fueron transferidos al medio de fertilización donde fueron divididos aleatoriamente en seis tratamientos de acuerdo a la concentración de heparina en el medio de fertilización (4, 8, 10, 16 y 20 mg de heparina/ml). Se realizaron tres réplicas por tratamiento con un número de oocitos alrededor de 20 por réplica y en cada réplica la concentración de esperma fue 1x10⁶ / ml. Después de 18 horas de fertilización los oocitos fueron fijados en una solución de una parte de ácido acético y tres de metanol, por 24 horas, después fueron teñidos con orceína al 2% para evaluación de fertilización. La concentración de heparina que se seleccionó fue aquella que produjo el mayor porcentaje de fertilización (oocitos con dos o más pronúcleos). La evaluación de fertilización se realizó teniendo en cuenta la descripción de los estados de desarrollo pronuclear realizada por Xu y Greve (20).

La técnica utilizada para preparar los espermatozoos bovinos para (fertilización *in vitro*)

IVF y aumentar el porcentaje de células espermáticas móviles fue el método conocido como Swim-up previamente descrito por Parrish *et al* (13).

Una vez seleccionada la concentración de heparina en la primera parte, se evaluaron tres dosis de espermatozoides del eyaculado de un toro de raza holstein (0.5x10⁶ espermatozoides/ml, 1x10⁶ espermatozoides/ml y 2x10⁶ espermatozoides/ml). A las 18 horas pos- fertilización los oocitos fueron fijados en una solución 1:3 de ácido acético y metanol, respectivamente, durante 24 horas. Luego fueron teñidos con una solución de orceína al 2% para evaluar la fertilización. La concentración de espermatozoides seleccionada fue aquella que produjo la máxima fertilización con el mínimo de polispermia. Se realizaron un total de tres réplicas por tratamiento.

Resultados

En las tablas 1 y 2 se observan la evaluación de la capacidad fertilizante del semen según la concentración de heparina y la concentración espermática. El mayor porcentaje de oocitos penetrados, 67% se presentó cuando el medio de fertilización fue suplementado con una concentración 10 mg/ml de heparina (p< 0.05). La mayor proporción de oocitos fertilizados 68% (n=55), con la menor presentación de poliespermia, 12%, se obtuvo con dosis seminales de 1 x 10⁶ espermatozoides. En la figura 1 se observa la presencia de pronúcleos en Oocitos bovinos fertilizados *in vitro* y teñidos con una solución de Orceína al 2%.

Tabla 1. Efecto de la concentración de heparina en el medio de fertilización sobre las proporciones de penetración *in vitro* de oocitos bovinos.

Concentración de heparina (mg/ml)	No. de oocitos examinados	n(%) de oocitos penetrados
2	78	14(18) e
4	67	25(37) c
8	89	44(49) b
10	74	50(67) a
16	95	26(27) d
20	108	22(20) e

Los resultados son de un total de tres réplicas

Números con diferentes letras difieren significativamente (p< 0.05).

Tabla 2. Efecto de la concentración de semen en el medio de fertilización sobre la proporción de oocitos con fertilización normal (2 pronúcleos).

Concentración de semen (espermatozoides/ml) Examinados	No. de oocitos	No. (%) de oocitos fertilizados	
		normal	polispermicos
0.5×10^6	81	20(25) b	0 (0) a
1×10^6	81	55(68) a	10(12) b
2×10^6	71	52(74) a	15(21) c

Los resultados son de un total de tres réplicas. Números con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

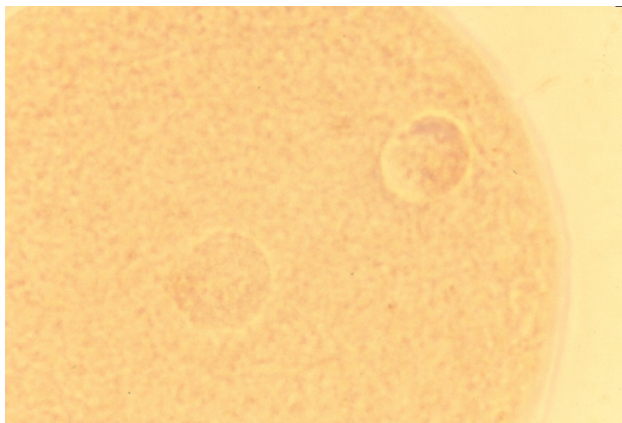


Figura 1. Oocitos bovinos fertilizados *in vitro* 18 hpi, obsérvase la presencia de dos pronúcleos. 400X, teñidos con una solución de Orceína al 2%.

Discusión

La proporción de penetración (67%) que se obtuvo con una concentración de 10 mg/ml es similar al valor reportado en la literatura, el cual oscila entre 2- 100 mg/ml, siendo la concentración de 10 g/ml la más comúnmente usada (19). Estas diferencias se deben a que el efecto de la heparina es dosis dependiente y varía para cada toro, como lo demuestran Parrish *et al* (13,14), Saeki *et al* (18) y Niwa y Ohgoda (11), y además puede estar relacionado con la mayor producción de proteínas fijadoras de heparina en el semen. De acuerdo con Kim (7), la presencia de proteínas fijadoras de heparina se relaciona con porcentajes de fertilidad de 67 a 87% y su funcionamiento es afectado por la osmolalidad del medio empleado.

La mayor proporción de oocitos con fertilización normal (74%) fue obtenida con una concentración de 2×10^6 espermatozoides/ml, pero al mismo tiempo produjo el mayor porcentaje de polispermia. Entretanto esta concentración de esperma no fue significativamente diferente a la de 1×10^6 ($p > 0.05$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Hernández-Ideezma *et al* (6); Saeki *et al* (18); Van Inzen *et al* (21); Lu KH, Seidel GE Jr. (10), los cuales encontraron que la concentración óptima de semen fue de 1×10^6 espermatozoides/ml y además reportaron que a medida que se aumentaba la concentración de espermatozoides en el medio de fertilización se incrementaba la incidencia de poliespermia, contrario a lo reportado por Kurtu *et al* (8) quienes no encontraron este efecto ($p < 0.05$) al aumentar la dosis seminales por encima de 0.5×10^6 espermatozoides/ml, cuando utilizaron el mismo toro. Por otro lado la incidencia de poliespermia, según Saeki *et al* (18), podría relacionarse con la presencia de proteínas séricas al suplementar el medio con suero de vaca en estro.

Saeki *et al* (18), Van Inzen *et al* (21), Lu KH, Seidel GE Jr (10), reportan concentraciones fertilizantes de por lo menos 1×10^6 espermatozoides/ml, si consideramos que trabajamos con gotas de 50 ul para grupos de 10 a 12 oocitos, la concentración de la dosis final sería de 50.000 espermatozoides /gota.

Otros autores como Pinyopummintr y Bavister (16), Ferry *et al* (5), Rieger *et al* (17), Leven K *et al* (9) y Camargo *et al* (1, 2) trabajaron con una concentración espermática superior, de 1.8 y de 2×10^6 , sin reportar el alto grado de polispermia. Camargo (2) con sistema de co-cultivo reporta un 87% de oocitos divididos y 37.5% de blastocitos eclosionados, con dosis espermática de 1.8×10^6 , sin embargo recomienda el uso de dosis fertilizante de concentraciones a partir de 1×10^6 .

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio podemos concluir que las concentraciones de heparina de 10 ug/ml y de semen de 1×10^6 esp./ml arrojaron las mejores tasas de penetración de oocitos bovinos *in vitro*, cuando se utiliza la técnica de swim up. Por lo tanto se recomienda el uso de esta concentración de heparina en la suplementación del medio de fertilización y de esta dosis inseminante, para alcanzar buenas tasas de fertilización con bajos porcentajes de poliespermia.

Summary

Heparin and spermatoc concentration effect over the percentage of *in vitro* fertilization of bovine oocytes.

*The objective of this study was to evaluate the effect of different heparin concentrations and of the semen in the percentage of bovine oocytes in fertilization medium. In the experiment 1, the obtained oocytes of slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* and distributed at random in six treatments for fertilization *in vitro*, according to the heparin concentration (2, 4, 8, 10, 16, 20 µg/ml). In the experiment 2, once selected the heparin concentration from experiment 1, three sperms doses were evaluated in fertilization medium (0.5x10⁶ espermatozoas/ml, 1x10⁶ espermatozoas/ml and 2x10⁶ espermatozoas/ml). In each experiment totally randomized design was used and data were analyzed by ANOVA. The concentration of heparin (p<0.05) affected the percentage of fertilized oocytes being the best results in the concentration of 10 µg/ml, with a rate of penetration of 67%. The spermatoc concentration affects the fertilization, the biggest oocytes proportion with normal fertilization (74%) when using concentration 2x10⁶ spermatozoas/ml. However, it was not significantly different to the concentration of 1x10⁶ (p>0.05). The results indicate that the fertilization rate keeps direct relationship with the heparine dose and the spermatoc concentration.*

Keywords: bovine, fertilization *in vitro*, heparin, swim up.

Referencias

- Camargo LS, Sá W, Ferreira AM, Viana JH. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. Arq Bras Med Vet Zootec 2001; 23:78-83.
- Camargo LS, Sá W, Ferreira AM, Viana JH, Freitas C. Concentração espermática na fecundação *in vitro*, com semen de touro da raça Guzará. Arq Bras Med Vet Zootec 2000; 52:59-64.
- Chacon LJ, Estrada JL. Evaluación de diferentes compuestos en la estandarización de la técnica de fertilización *in vitro* en bovinos. Tesis para Msc. Universidad Nacional Colombia (1997).
- Eyestone W, First N. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fertil 1989; 85:715-720.
- Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Bovine embryos culture in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocist stage. Theriogenology 1994; 42: 445-453.
- Hernández Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning cultura media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures. Theriogenology 1993; 39:1267-1277.
- Kim BK, Lee SC, Lee KS, Lee BK, Kim JH. Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology. 2002; 57:2093 -104.
- Kurtu JM, Ambrose JD, Rajamahendran R. Cleavage rate of bovine oocytes *in-vitro* is affected by bulls but not sperm concentrations. Theriogenology 1996; 45:257 – 265.
- Leven K, Clay A, Burnley A, Benjamin G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. Biology of reproduction 1995; 52:1410 – 1417.
- Lu KH, Seidel GE Jr. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. Theriogenology 2004; 62:819-30.
- Niwa, K, Ohgoda, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 1988; 30:733-741.
- Parrish JJ, Susko-Parrish, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology. 1985; 24: 537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried Ruffledge ML, Crister EJ Eyestone EH, First NL. Bovine *in-vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 1986; 25:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish MA, Winer A, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 1988; 38:1171-1180.
- Parrish JJ, Susko Parrish JL, Handrow RR, Sims MM and First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol Reprod 1989; 40:1020-1025.
- Pinyopummintr T. and Bavister B. *In vitro*- matured/*in vitro*- fertilized bovine oocytes can develop into morulae/

- blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. Biol Reprod 1991; 45: 736-742.
17. Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge KJ, *et al.* Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J Reprod Fertil 1995; 105: 91-98.
 18. Saeki K, Nagao Y, Hoshi M and Nagai M. Effect of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. Theriogenology 1995; 43:751-759.
 19. Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Reprod Dom Anim 1996; 31:613-622.
 20. Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. J Reprod Fertil 1988; 82:127-134.
 21. Van Inzen WG, Van Stekelenburg-Hamers AE, Weima SM, Kruip TA, Bevers MM, *et al.* Culture of bovine embryos to the blastocist stage using buffalo rat liver (BRL) cells. Theriogenology 1995; 43:723-738.