

EFFECTO DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE ESPERMA CONGELADO DE BOVINO SOBRE LOS ÍNDICES DE FECUNDACIÓN Y DIVISIÓN *IN VITRO*

EFFECT OF THE BOVINE FROZEN-SPERM SELECTION METHOD ON *IN VITRO* FERTILIZATION AND CLEAVAGE RATES

Ocaña Quero, J.M.¹, M. Moreno Millán¹, M. Pinedo Merlín², M.A. Ortega Mariscal³ y A. Rodero Franganillo¹

¹Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara 7. 14005-Córdoba. España.

²Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Avda. Medina Azahara 7. 14005-Córdoba. España.

³Departamento de Bromatología y Tecnología de los alimentos. Complejo Agroalimentario Rabanales. Córdoba. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Vacuno. Ovocitos. Percoll.

ADDITIONAL KEYWORDS

Bovine. Oocytes. Percoll.

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de dos métodos de selección de espermatozoides congelados de bovino sobre los índices de fecundación y división *in vitro* de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro*. Para tal objetivo se emplearon dos sistemas habituales de selección de espermatozoides: el método de lavado por centrifugación y el de gradiente de densidad con Percoll. Los resultados obtenidos mostraron que los índices de fecundación *in vitro* obtenidos usando el método de gradiente de densidad con Percoll (61,7 p.100) fueron significativamente más altos ($p < 0.001$) que aquellos obtenidos utilizando el método de lavado convencional (40,2 p.100). Del mismo modo, el sistema de selección de espermatozoides mediante el uso del Percoll obtuvo unos índices de

división (65 p.100) muy superiores estadísticamente ($p < 0.001$) a los conseguidos por el sistema tradicional de lavado (44,8 p.100).

En conclusión, nuestros resultados han demostrado claramente que el uso del Percoll como método de selección de espermatozoides congelados de bovino, empleado en técnicas de fertilización *in vitro*, incrementó los índices de fecundación y división de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro*, en comparación con el método habitual de lavado.

SUMMARY

In the present work, the effect of two selection methods of bovine frozen sperm on *in vitro* fertilization and cleavage rates of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes was evaluated. Two usual sperm selection systems were used: the washing method and the Percoll density gradient.

*Correspondencia

Este trabajo ha sido financiado por una beca de investigación concedida por la Junta de Andalucía en colaboración con Cajasur.

The results obtained in our study showed that the *in vitro* fertilization rates obtained using the Percoll-sperm selection method (61.7 p.cent), were significantly higher ($p < 0.001$) than those obtained in the washing method (40.2 p.cent). Furthermore, the sperm selection system using Percoll gradient obtained cleavage rates (65 p.cent) which were statistically higher ($p < 0.001$) than those obtained in the washing system (44.8 p.cent).

In conclusion, our data have clearly showed that the use of Percoll gradient as a frozen bovine-sperm selection method, employed in *in vitro* fertilization techniques, was better as the fertilization and cleavage rates of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes increased, in comparison with the usual washing method.

INTRODUCCIÓN

La preparación del esperma congelado para su utilización en programas de fertilización asistida, tanto en la especie humana como en animales domésticos, lleva consigo algún tipo de protocolo inicial con el objetivo de separar los espermatozoides vivos del propio plasma seminal, crioconservantes, e incluso de los espermatozoides muertos (Parrish, 1991). En la especie humana, en donde puede existir un escaso número de espermatozoides móviles e incluso un elevado número de espermatozoides anormales, los procedimientos de selección de espermatozoides con una morfología óptima pueden ser de vital importancia.

Entre los sistemas más habituales para la preparación de esperma congelado de bovino, usado en programas de fecundación *in vitro*, destacan los siguientes: método de lavado por centrifugación, denominado también *washing* (Parrish *et al.*, 1986), gradiente de densidad con Percoll (Saeki *et al.*, 1990 y De los Reyes

et al., 1996), filtración mediante columna de fibra de vidrio (Stabbings y Wosik, 1991), y el método de migración/sedimentación (Risopatrón *et al.*, 1996). La técnica de selección espermática más ampliamente utilizada es la del lavado por centrifugación. Sin embargo, en los últimos años se está utilizando cada vez más el método del gradiente de densidad con Percoll*, debido probablemente al elevado porcentaje de espermatozoides móviles, viables y con morfología normal que pueden ser recuperados (De los Reyes *et al.*, 1996).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos diferentes métodos de selección de esperma congelado de bovino (lavado y gradiente de Percoll) sobre los índices de fecundación y división *in vitro* de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MÉTODO DE SEPARACIÓN DEL ESPERMA CONGELADO

Para llevar a cabo este trabajo se empleó semen congelado de toros de raza Limusin. Pajuelas de semen de 0,5 ml de capacidad fueron descongeladas en un baño a 37°C durante 1 minuto. Se usaron dos métodos de separación de esperma: el primero fue el método mediante lavado, descrito previamente por Parrish *et al.* (1986). Este método consistió en depositar el contenido de una pajuela de semen, previamente descongelada, sobre un tubo de plástico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio sp-TALP. Tras su centrifugación a 750x g durante 10 minutos, se

*Percoll, farmacia LBK Biotechnology AB, Uppsala, Sweden

SELECCIÓN DE ESPERMA CONGELADO DE BOVINO *IN VITRO*

eliminó el sobrenadante y se añadió 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió el botón celular y se volvió a centrifugar. Esta operación de cambio de medio tras la centrifugación se repite entre 2-3 veces, con el objetivo de eliminar los restos de crioconservantes y espermatozoides muertos. Finalmente, y una vez eliminado el sobrenadante en el último lavado, se ajustó la concentración de espermatozoides en 1-2 millones de espermatozoides/ml en medio sp-TALP. El segundo método empleado fue el llamado método de gradiente de densidad con Percoll, el cual consiste en colocar en un tubo de plástico de 15 ml de capacidad, 2 ml de una solución de Percoll al 45 p.100, y sobre éstos se colocaron otros 2 ml de otra solución de Percoll al 30 p.100. Posteriormente, el contenido de una pajuela de semen, previamente descongelada, se depositó sobre dichas capas de Percoll. Tras una primera centrifugación a 750x g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular conteniendo la mayor parte de los espermatozoides móviles, se resuspendieron en 5 ml de medio sp-TALP y se volvió a centrifugar. Esta operación de cambio de medio y centrifugación se realizó entre 2-3 veces. Finalmente, se ajustó la concentración final de espermatozoides entre 1-2 millones de espermatozoides/ml.

FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PREVIAMENTE MADURADOS *IN VITRO*

Se obtuvieron ovocitos bovinos, se maduraron durante 24 h, y se eliminaron las células del cúmulo siguiendo un método estándar descrito previamente por Parrish *et al.* (1988). A continuación, los ovocitos se distribuyeron al azar en pocillos de placas Terasaki (5 ovocitos/pocillo), y se añadió 1 ml de medio de fecun-

dación Fert-TALP. Aproximadamente 70 ml de espermatozoides previamente preparados según el método de lavado o de Percoll, fueron añadidos a los ovocitos. A las 24 h de la puesta en contacto con los dos tipos de gametos, los ovocitos se procesaron según el procedimiento descrito previamente por Ocaña *et al.* (1995), con el fin de estudiar el porcentaje de ovocitos en los diferentes estadios. A las 72 h se analizaron los ovocitos fecundados con el fin de analizar el estadio del desarrollo alcanzado por dichos ovocitos tras su fecundación.

CRITERIO DE CLASIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los ovocitos se clasificaron atendiendo al siguiente criterio: (a) los ovocitos que mostraban un pronúcleo macho y otro hembra fueron considerados como fecundados; (b) los ovocitos que presentaban más de dos pronúcleos y cabezas de espermatozoides descondensados se consideraron como polispermicos; (c) los ovocitos que mostraban un citoplasma vacuolizado ó fragmentado fueron catalogados como degenerados; (d) los ovocitos que no presentaban pronúcleos se consideraron como no fertilizados, (e) y finalmente, los cigotos que presentaron dos o más blastómeros se consideraron como divididos. Las diferencias entre los distintos índices de fecundación y división de los dos métodos de separación espermática se analizaron estadísticamente mediante una prueba de Chi-cuadrado con un nivel de significación del 99,9 p.100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los índices de fecundación *in vitro*

Tabla I. Efecto del método de separación de espermatozoides de bovino sobre los índices de fecundación *in vitro* de ovocitos de bovino madurados *in vitro*. (Effect of bovine sperm separation method on *in vitro* fertilization rates of bovine oocytes matured *in vitro*).

Sistema de selección	Número de ensayos	Ovocitos inseminados	Ovocitos (p.100)			
			Fertilizados	Polispermia	Degenerados	No fecundados
Lavado	6	231	93 (40,2) ^a	14 (6)	22 (9,5)	102 (44,1)
Percoll	6	235	145 (61,7) ^b	17 (7,2)	19 (8)	54 (22,9)

^{a,b}Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$)

obtenidos para cada uno de los dos métodos de separación de espermatozoides utilizados en el presente trabajo quedan reflejados en la **tabla I**. Como podemos ver en dicha tabla, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de fecundación, tras emplear el método de selección de espermatozoides basado en la utilización de un gradiente de densidad de Percoll (61,7 p.100), fue muy superior estadísticamente ($p < 0,001$) que el conseguido por el método tradicional mediante lavado (40,2 p.100). Sin embargo, no existieron diferencias significativas para los grupos de ovocitos polispermicos y degenerados en uno u otro método analizado. Del mismo modo, y como refleja la **tabla II**, los índices de división obtenidos usando el

método de gradiente de densidad con Percoll (65 p.100), fueron superiores significativamente ($p < 0,001$) a los conseguidos por el método de lavado (44,8 p.100). No observándose diferencias significativas, entre ambos sistemas de selección, para el estadio de ovocitos degenerados.

Uno de los inconvenientes fundamentales de la utilización de semen congelado en técnicas de fecundación *in vitro* es la reducida viabilidad de los espermatozoides, debido al efecto directo del proceso de congelación/descongelación sobre la membrana plasmática del espermatozoide (Watson *et al.*, 1992). Este daño del espermatozoide puede verse incrementado durante la centrifugación y lavado a que

Tabla II. Efecto del método de separación de espermatozoides de bovino sobre los índices de división *in vitro* de ovocitos de bovino madurados y fecundados *in vitro*. (Effect of bovine sperm separation method on *in vitro* cleavage rates of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*).

Sistema de selección	Número de ensayos	Ovocitos fecundados	Estadios del desarrollo (p.100)		
			Divididos	Degenerados	No divididos
Lavado	6	225	101 (44,8) ^a	25 (11,1)	99 (44)
Percoll	6	220	143 (65) ^b	22 (10)	55 (25)

^{a,b}Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$)

SELECCIÓN DE ESPERMA CONGELADO DE BOVINO *IN VITRO*

es sometido el espermatozoide durante su selección (Sánchez *et al.*, 1995). Por este mismo motivo, en los últimos años se están utilizando, cada vez más, técnicas alternativas de selección de espermatozoide congelado para su utilización en programas de fecundación *in vitro*. Uno de los métodos más usados es el de gradiente con Percoll. El Percoll es un medio de gradiente de densidad que puede ser utilizado para numerosas aplicaciones, tales como: purificación de células, virus e incluso orgánulos. La utilización de sistemas de gradientes de densidad discontinuos de Percoll, con el objetivo de la selección de espermatozoides móviles e inmóviles, esta siendo ampliamente adaptado en programas de fecundación *in vitro* en la especie humana, vacuno e incluso en otras especies de animales domésticos (Bollendorf *et al.*, 1994; De los Reyes *et al.*, 1996). La utilización de este medio de gradiente de densidad permite aislar hasta un 90 p.100 de los espermatozoides móviles, la eliminación de los residuos tóxicos de crioprotectores y de los espermatozoides muertos, así como de obtener un elevado porcentaje de espermatozoides con morfología normal y acrosomas íntegros.

Nuestros resultados fueron similares a

los conseguidos por Parrish *et al.* (1995) y De los Reyes *et al.* (1996), quienes además de obtener un mayor índice de fecundación, obtuvieron también un mayor número de embriones mediante el método del Percoll. Sin embargo, el grupo de Avery y Greve, (1995) encontraron unos resultados contrarios a los observados por nosotros. Avery y Greve afirman que la posible razón del efecto perjudicial del Percoll sea debido a la existencia de pequeñas cantidades del compuesto polivinilpirrolidona (PVP), que es un agente crioprotector y un estabilizante de la membrana del espermatozoide. Tiersh *et al.* (1994) encontraron que la PVP reduce la motilidad espermática. Del mismo modo, De Leeuw *et al.* (1993) también han demostrado que la PVP reduce la supervivencia espermática y la integridad de la membrana del espermatozoide.

En conclusión, la utilización del sistema de gradiente de densidad con Percoll en la selección de espermatozoide congelado de bovino para su uso en técnicas de fecundación *in vitro*, permite incrementar el índice de recogida de espermatozoides vivos por muestra, lo cual favorece la posibilidad de incrementar el número de ovocitos fecundados y por tanto de obtener un mayor número de embriones.

BIBLIOGRAFÍA

- Avery B. and T. Greve. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. *Theriogenology*, 44: 871-878.
- Bollendorf, A., J.H. Check, D. Katsoff and D. Lurie. 1994. Comparison of direct swim-up, mini-Percoll, and sephadex g 10 separation procedures. *Arch. Androl.*, 32: 157-162.
- De Leeuw, F.E., A.M. De Leeuw, J.H.G. Den Daas, B. Colenbrander and A.J. Verkleij. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.
- De los Reyes, M., C. Almendra, M. Berland, H. Del Campo and C. Barros. 1996. Selection of frozen bull spermatozoa for *in vitro* fertilization. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 28: 31-38.

- Parrish, J.J., A. Krogenaes and J.L. Susko-Parrish. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44: 859-869.
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
- Parrish, J., J.L. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38: 1171-1180.
- Parrish, J.J. 1991. Application of *in vitro* fertilization to domestic animals. In: Wassarman, P.M., (de). The biology and Chemistry of Mammalian Fertilization, Volumen II. New York: CRC Press, 111-132.
- Risopatrón, J., R. Sánchez, N. Sepúlveda, P. Pena, E. Villagran and W. Miska. 1996. Migration/sedimentacion sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization-comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*, 46: 65-73.
- Sánchez, R., J. Risopatrón, G. Sepúlveda, P. Peña, and W. Miska. 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of protease inhibitors. *Theriogenology*, 43: 761-768.
- Stabbings, R.B. and C.P. Wosik. 1991. Glass wool versus swim up separation of bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 35: 276 abstr.
- Tiersch, T.R., C.A. Goudie and G.J. Carmichael. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123: 580-586.
- Ocaña Quero, J.M., R. Gómez Villamandos, M. Moreno Millán and J.M. Santisteban Valenzuela. 1995. The effect of helium-neon laser irradiation on *in vitro* maturation and fertilization of immature bovine oocytes. *Lasers in Medical Sci.*, 10: 113-119.
- Saeki, K., M. Hoshi, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1990. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34: 1035-1039.
- Watson, P.F., E. Kutze, P. Cramer and R.H. Hammerstedt. 1992. A comparison of critical osmolarity and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *J. Androl.*, 13: 131-138.

Recibido: 19-9-96. Aceptado: 22-1-97.