

# EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA SOBRE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO* CON SEMEN DESCONGELADO DE TOROS DE LA RAZA RUBIA GALLEGA

N. Madrid-Bury, M. Oter, S. Pérez-Garnelo, A. Gutiérrez-Adán y J. de la Fuente

Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA. Carretera de la Coruña km 5.9, Madrid 28040. e-mail. nmadrid@inia.es

## INTRODUCCIÓN

Durante la capacitación se producen una serie de cambios fisiológicos en el espermatozoide que le permitirán fertilizar al ovocito. Uno de los principales eventos es la alteración bioquímica de la membrana plasmática, que incluye la retirada o alteración de glicoproteínas periféricas provenientes del plasma seminal, y cambios en los fosfolípidos de membrana (1), todo esto está muy influenciado por el ambiente al que está expuesto el espermatozoide.

La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado con un efecto positivo sobre la capacitación (2), ha sido considerado el inductor más potente de la reacción acrosómica (3). Se ha observado que incrementa el número de embriones producidos *in vitro*, al utilizar tanto semen fresco como descongelado (2, 4). La concentración óptima de heparina utilizada para la inducción *in vitro* de la capacitación espermática en bovino, varía mucho entre los diferentes estudios realizados (5, 6), esto, unido a la gran variación existente entre toros en relación con la tasa de fertilización *in vitro* (7, 8, 9), son razones suficientes para determinar la concentración óptima de heparina para cada toro.

En este estudio se analizó el efecto de 4 concentraciones de heparina sobre el porcentaje de penetración de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* utilizando semen descongelado de cinco toros de la raza Rubia Gallega.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Maduración de ovocitos.*

Los ovarios procedentes de matadero, fueron transportados al laboratorio en solución salina (0.9% NaCl) a 35°C. Se aspiraron los folículos de entre 2 y 8 mm. Los ovocitos seleccionados (10) después de 3 lavados en PBS, fueron madurados *in vitro* (50/pocillo) en pocillos con 500 µl de medio TCM 199, suplementado con FCS (10%), Epitelial Growth Factor (EGF, 10 ng/ml), L-Glutamina (0,1 gr/ml) y gentamicina (50 µg/ml) (11), cubiertos de aceite mineral. Se incubaron durante 24h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire y saturada de humedad.

### *Preparación del semen.*

Se utilizó el semen descongelado de 5 toros adultos de la raza Rubia Gallega, con edades comprendidas entre 4 y 6 años. Tres pajuelas (0,25ml) de un mismo eyaculado de cada toro, fueron descongeladas en baño María a 37°C durante 1 min. El semen descongelado se lavó en Hepes-buffer Tyrodé's, centrifugando a 1000 g durante 10 min, el pellet se resuspendió y se añadió, con cuidado de no mezclarlo, 1 ml de medio FIV sin heparina para prodecer a hacer el *swim-up* (4). Después de 1h a 38,5°C el sobrenadante (650µl) del tubo fue recogido y centrifugado a 1000 g

durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en medio FIV sin heparina hasta ajustarlo a una concentración final de  $50 \times 10^6/\text{ml}$ .

#### *Fecundación in vitro*

Los ovocitos madurados se lavaron 3 veces en PBS y se transfirieron a placas de 4 pocillos con medio de fertilización TALP suplementado con amino ácidos, hipotaurina ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y heparina a concentraciones de 0, 4, 10 y  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ , cubiertos con aceite mineral. La inseminación se realizó con una dosis fija de  $10 \mu\text{l}/\text{pocillo}$ . Se mantuvo el cocultivo durante 18h a  $38,5^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$  en aire y saturada de humedad.

#### *Evaluación de los ovocitos.*

Tras 18h de cocultivo, los presuntos cigotos fueron fijados en acético:etanol (1:3) y guardados en refrigeración por 24h para su observación en el microscopio de contraste de fases, después de teñirlos con Lacmoid (1%). Los ovocitos se consideraron fertilizados cuando se observaron en su citoplasma 2 pronúcleos, 2 pronúcleos más una cola o 1 pronúcleo más la cola. Los ovocitos con más de 2 pronúcleos o con 2 pronúcleos y 2 colas fueron considerados poliespérmicos y no fueron incluidos en los datos de fertilización, aunque se muestra su incidencia.

#### *Análisis estadístico*

El efecto de los dos factores estudiados: la concentración de heparina y las variaciones entre toros, se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías y la diferencia entre medias fue determinada por la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza para el porcentaje de fecundación de ovocitos mostró que en la concentración de heparina de  $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ , había diferencias entre toros ( $p < 0,02$ ), es decir algunos toros mostraban mayores índices de penetración que otros. Para el resto de las concentraciones de heparina analizadas no se observaron diferencias significativas. Estos resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Porcentajes de ovocitos fecundados *in vitro* con semen descongelado de toros de la raza Rubia Gallega.

Toro	r	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$		4 $\mu\text{g}/\text{ml}$		10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
		n° ovoc.	% fec.±DE	n° ovoc	% fec.±DE	n° ovoc.	% fec.±DE	n° ovoc.	% fec.±DE
A	3	105	$14.4 \pm 4.4^{ab}$	105	$40.5 \pm 8.8$	106	$60.7 \pm 12.4$	108	$44.1 \pm 14.0$
B	3	102	$4.9 \pm 4.7^b$	97	$31.5 \pm 10.5$	102	$60.9 \pm 5.1$	100	$39.7 \pm 15.7$
C	3	100	$13.0 \pm 6.4^a$	102	$44.8 \pm 8.2$	103	$72.7 \pm 2.7$	103	$49.3 \pm 10.2$
D	3	92	$2.2 \pm 1.9^{ab}$	91	$42.8 \pm 2.2$	91	$67.4 \pm 8.8$	87	$48.1 \pm 3.2$
E	3	95	$7.4 \pm 2.0^{ab}$	93	$31.1 \pm 4.6$	95	$63.2 \pm 3.9$	95	$43.2 \pm 4.6$

r: n° de réplicas del experimento.

columnas con letras diferentes  $p < 0.02$

El porcentaje de ovocitos fecundados de acuerdo a las diferentes concentraciones de heparina estudiadas se presentan en la tabla 2. Bajos niveles de penetración fueron observados a 0, 4, y  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  de heparina y todos los toros

mostraron máxima penetración ( $P < 0,001$ ) a concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ . El porcentaje de ovocitos penetrados se incrementó en todos los toros a medida que aumentaba la concentración de heparina hasta 10  $\mu\text{g/ml}$ , llegando a un máximo de 65% para luego declinar a 44.9% cuando los niveles de heparina fueron incrementados a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados coinciden con trabajos anteriores (5, 12). Se sabe que para tener capacidad fertilizante, los espermatozoides deben estar capacitados, y cualquier condición que acelere, retarde o prevenga los eventos fisiológicos que ocurren durante la capacitación afecta al porcentaje de ovocitos fertilizados (1). Esto parece explicar los bajos porcentajes de fertilidad conseguidos en las concentraciones subóptimas de heparina de 0, 4 y concentraciones superiores al óptimo como es el caso de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 2:** Efecto de la concentración de heparina en la fecundación *in vitro* de ovocitos inseminados con semen descongelado de toros de la raza rubia gallega

Concentración de Heparina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Repeticiones n°	Ovocitos n°	Porcentaje de ovocitos			
			Fertilizados		Polispérmicos	
			n°	% $\pm$ DE	n°	%
0	15	492	42	8.4 $\pm$ 6.0 <sup>c</sup>	0	0.0
4	15	488	188	38.2 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	10	2.0
10	15	497	325	65.0 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	7	1.3
20	15	493	223	44.9 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	9	1.7

Columnas con letras diferentes  $p < 0.05$

Los resultados indican que para los toros de la raza Rubia Gallega la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  podría ser la recomendada para ser utilizada en la fertilización *in vitro* con semen descongelado. Debido a la variación entre toros y al número de animales analizados, se recomienda realizar más experimentos con mayor cantidad de pajuelas, diferentes eyaculados y más cantidad de animales para confirmar los hallazgos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Yanagimachi R. J. *Reprod. Fert. Suppl.* 1989.38:27-33.
- (2) Parrish, J.J. *et al. Theriogenology.* 1985. 24:537-549.
- (3) Handrow, R.R. *et al. Bioch. Biophys. Res. Com.* 1982. 107:1326-1332.
- (4) Parrish, J. J. *et al. Theriogenology.* 1986. 25:591-600.
- (5) Fukui, Y. *et al. Theriogenology.* 1990. 34:579-591.
- (6) Lu, K.H and Gordon, I. 1988. *Proc. 11<sup>th</sup> Inter. Cong. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Dublin.* 3:339.
- (7) Astiz Blancos, S. *et al. 15<sup>th</sup> Scientific Meeting of the A:E:T:E.* 1999. 118.
- (8) Hillery, F. L. *et al. Theriogenology.* 1990. 33:249.
- (9) Shi, D. S. *et al. Theriogenology.* 1990. 33:332 Abstr.
- (10) Le Guienne, B. 1998. *Petit atlas de l'ovocyte bovin. Élevage et Insemination.* 288:24-30.
- (11) Lonergan, P. *et al. Biol. Reprod.* 1996. 54:1420-1429.
- (12) Parrish, J.J. *et al. Biol. Reprod.* 1988. 38:1171-1180.