

Evaluación de la capacidad fertilizante *In-Vitro* del semen de toros San Martinero y Brahman

Héctor Obando Correa ¹
Olga Lucía Luque Benavides ²
Rodrigo Martínez Sarmiento ³



Desde tiempo atrás, investigadores colombianos como Castro (1979), Hernández (1981) y Martínez, y col (1983) han enfatizado en las ventajas reproductivas de los bovinos criollos, obtenidas gracias a su largo tiempo de adaptación (más de 450 años), a las difíciles condiciones medio ambientales del trópico colombiano, y que se manifiestan en una mayor fertilidad, cuando se comparan con las de otros toros de razas introducidas.

De otro lado, se sabe que el espermatozoide mamífero es incapaz de fertilizar los ovocitos inmediatamente son eyaculados, debe pasar por un período de capacitación, que ocurre normalmente en el tracto reproductivo femenino (Austin, 1951; Chang, 1951). Con el desarrollo de técnicas de fertilización *In-Vitro*, se ha podido llevar a cabo éste proceso con buenos resultados, que han permitido establecer la existencia de la gran variabilidad de la capacidad fertilizante del espermatozoide entre las diferentes especies, razas, toros de la misma raza y entre eyaculados del mismo toro. (Hillery, 1990; Saeki, 1995; Amn, 1996; Parrish, 1999; Lobo 1999 y col).

El objetivo de éste estudio fue determinar las diferencias en el grado de fertilidad del semen de toros de las razas san martinero y brahman y la concentración óptima de heparina que debe utilizarse en programas de fertilización *in-vitro*, para éstas razas, ya que no hay información en la literatura.

Materiales y métodos

Este trabajo se hizo en el CNI- Tibaitatá (Mosquera-Cundinamarca), en el laboratorio de Biotecnología del Programa Nacional de Fisiología y Genética Animal del ICA.

¹ MVZ-MSc. Ejercicio Particular. e-mail: hectorobando@hotmail.com

² Zootecnista. Ejercicio Particular.

³ Zootecnista. Investigador Corpoica.

Semen

Se obtuvo de seis toros san martinero y seis toros brahman. La edad de éstos animales osciló entre 5 y 7 años. El semen se congeló con un diluyente a base de Tris-glicina. En cada pajilla de 0.5 ml, se incorporaron 100 millones de espermatozoides y sólo se utilizaron las pajillas que a su descongelación presentaron una movilidad espermática igual o superior al 40%.

Para la capacitación y lavado de espermatozoides se usó medio TALP y el día de su uso, se le suplementó con 0.11 mM/ml de piruvato, 100 U.I./ml de penicilina y 3 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, por su sigla en inglés) fracción V. En un tubo cónico que contenía 1 ml del medio TALP suplementado, se depositó en el fondo el contenido de una pajilla y se dejó incubando durante 2 horas a 39°C con aire y 5% de CO₂, humedad relativa alta. Al cabo de éste período se extrajo 0.85 ml del sobrenadante y se transfirió a otro tubo que contenía 5 ml de medio TALP suplementado, se homogenizó la mezcla en un agitador automático (vortex) e inmediatamente después se centrifugó a 320 g/10 minutos, luego se eliminó el sobrenadante por volcamiento del tubo y el precipitado se resuspendió en 5 ml de medio TALP, se homogenizó y se centrifugó por segunda vez, el precipitado se diluyó en 0.5 ml de medio TALP y se hizo el recuento espermático en una cámara de Neubauer. Se adicionó medio TALP para que cada 2 ml contuvieran 25.000 espermatozoides, volumen que se adicionaría a cada gota con células del cúmulo con ovocitos (COCs) y también se adicionaría 2 ml de solución de heparina a los niveles de 2, 5 y 10 µg/ml que se establecieron para este estudio. (Parrish, et al 1988).

Ovocitos

Se obtuvieron de ovarios de vacas recién sacrificadas en un matadero que estaba 15 km del laboratorio. Los ovarios se lavaron con solución salina fisiológica (SSF) precalentada a 30 – 35°C y se transportaron en termos que contenían SSF a la misma temperatura antes mencionada. En el laboratorio se les hizo tres lavados así: 1) con SSF, 2) con alcohol a 75% y 3) con SSF. A cada ovario se le aspiró (con aguja G18) los folículos, cuyo diámetro varía entre 2 y 8 mm. Posteriormente el ovario se cortó en dos mitades y sobre la superficie de cada hemiovario se pasó un instrumento con 10 cuchillas separadas entre sí por 2mm, (Hamano, et. al 1993), este procedimiento se hizo dentro de cajas de petrí desechables (diámetro 9 cm), que contenían

medio de maduración, luego se colocaron los complejo ovocito - cúmulos, (COCs) que tuvieran más de 2 capas compactas de células del cúmulo (figura 1). Estos COCs se lavaron 3 veces con medio TL-Hepes suplementado con Piruvato (11 mM/ml), penicilina (100 U.I./ml) y BSA (3 mg/ml). Los COCs se cultivaron en 50 ml (10-15 COCs por gota) de medio 199, sales de Earle's (Gibco lab Grand Island, NY-USA), suplementado con 10% de suero de vaca en estro, 11 mM/ml de Piruvato, 0.02 mg/ml de FSH, 0.02 mg/ml de LH y 1 mg/ml de 17 beta- estradiol. La maduración de éstos ovocitos se hizo durante un período de 24 a 27 horas a 39°C, cubiertos con aceite mineral, humedad relativa alta y 5% de CO₂. Después los COCs, se transfirieron a 46 ml de medio Tirode-lactato (Sirard, y col 1988) suplementando con piruvato, BSA y penicilina a las mismas concentraciones mencionadas antes, a cada gota se le adicionó 2 ml de solución con espermatozoides y 2 ml de solución de heparina.

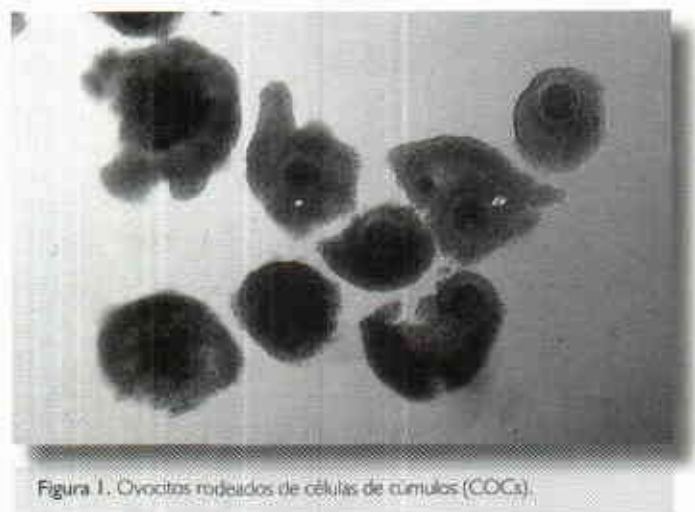


Figura 1. Ovocitos rodeados de células de cumulos (COCs).

Heparina

Se establecieron tres concentraciones 2, 5 y 10 µg/ml de heparina. Las gotas que contenían los COCs, espermatozoides y heparina se cubrieron con aceite mineral y se incubaron durante 15-17 horas a 39°C, humedad relativamente alta y 5% de CO₂ en aire. Después de éste período de fertilización, las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos se removieron del ovocito por agitación (vortex), luego los ovocitos se montaron en láminas portaobjetos, se fijaron con ácido acético: etanol (3:1) y se tiñeron con orceina (Sirard y el 1988). Los ovocitos que se consideraron fertilizados fueron aquellos en los cuales se observaron: dos pronúcleos

(figuras 2 y 3), un pronúcleo y una cola del espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito, más de dos pronúcleos y más de una cabeza de espermatozoides descondensados y asociados a colas dentro del citoplasma del ovocito que se registraron como fertilización polispermica, (Saeki, y col. 1995).

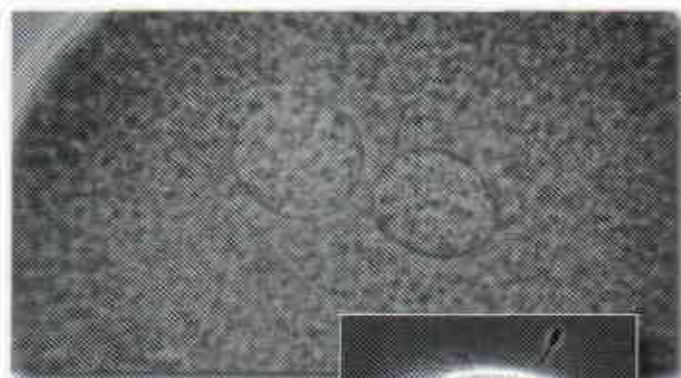


Figura 2. (Arriba) Pronúcleos masculino (grande) y femenino (pequeño) en el citoplasma de un ovocito bovino fertilizado.



Figura 3. Ovocito con vesícula germinal. Nótese el tamaño del espermatozoide.

Análisis estadísticos

Se empleó un diseño factorial 3X2 (concentraciones de heparina x raza), se utilizó análisis de varianza de modelo lineal general de SAS, con 3 repeticiones por raza y se establecieron las diferencias por Duncan a ($p < 0.05$) (Steel y Torrie, 1990).

Resultados

Capacidad fertilizante *in-vitro* del semen bovino

Según la raza: El semen proveniente de la raza criolla colombiana san martinera, superó significativamente ($p < 0.05$) en 10.7% la capacidad fertilizadora de ovocitos de matadero a la raza cebuina brahman: SM=49.7% - Vs Br=39.0% (Tabla 1)

Según el toro: La evaluación de la capacidad de penetración espermática de cada uno de los toros de una misma raza, utilizando 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, reveló que no existen diferencias entre los toros de la misma raza (tabla 2)

Efecto de la concentración de heparina sobre la fertilización *in-vitro* del semen bovino

Al analizar las tres concentraciones de heparina (2, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) que se adicionaron al medio de fertilización en que se encontraban los ovocitos (COC'), se determinó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los porcentajes de fertilización al incrementarse la dosis de heparina: 34.3%, 42.7% y 56.8% respectivamente, lo cual permite recomendar como concentración óptima la de 10 mg/ml , para ser usada en fertilización *in-vitro*, cuando se emplee semen de razas SM (*Bos taurus*) y Br (*Bos indicus*).

La polispermia, que se presentó fue 8.9% en promedio, pero no hubo diferencias entre las tres dosis de heparina ni entre razas, ni se detectó ninguna tendencia definida (Tabla 3).

TABLA 1. Evaluación de la capacidad fertilizante (*In-Vitro*) del semen bovino de las razas San Martinera y Brahman

	SAN MARTINERO (<i>Bos-taurus</i>)	BRAHMAN (<i>Bos-indicus</i>)
Ovocitos inseminados	619	598
Ovocitos fertilizados (%) ^a	315 (49.7)	235 (39.0)

^a: Diferencias significativas ($p < 0.05$)
Datos de tres repeticiones

TABLA 2. Clasificación de los toros por su capacidad fertilizadora de ovocitos (*In-Vitro*) con Heparina a 10 µg/ml.

SANMARTINERA (<i>Bos taurus</i>)			BRAHMAN (<i>Bos indicus</i>)		
Identificación del toro	Ovocitos Inseminados	Ovocitos Fertilizados (%)	Identificación del toro	Ovocitos Inseminados	Ovocitos Fertilizados (%)
86-035	30	20 (66.7)	Arco-2	28	17 (60.7)
88-013	37	24 (64.9)	Mesa	33	18 (54.5)
89-107	43	27 (62.8)	Macheta	39	21 (53.8)
88-073	24	15 (62.5)	841-1	31	15 (48.4)
89-051	21	13 (61.9)	Arb-1	32	14 (46.7)
89-019	40	23 (57.5)	171-3	39	17 (43.6)

Datos de tres repeticiones.

TABLA 3. Efecto de la concentración de heparina sobre la fertilización *In-Vitro* con semen de las razas San Martinera y Brahman.

Concentración heparina µg/ml	SANMARTINERA (<i>Bos-taurus</i>)			BRAHMAN (<i>Bos – indicus</i>)		
	Ovocitos inseminados	Ovocitos fertilizados (%) ^a	Ovocitos con polispermia (%)	Ovocitos inseminado	Ovocitos fertilizados (%) ^a	Ovocitos con polispermia (%)
10	195	122 (62.6)	10 (8.2)	200	102 (51.0)	9 (8.8)
5	228	115 (50.4)	10 (8.7)	199	73 (36.7)	5 (6.8)
2	196	78 (39.8)	10 (12.8)	199	60 (30.2)	5 (8.3)

^{a, b}: Diferencias significativas ($p < 0.05$)

Datos de tres repeticiones.

Discusión

Raza

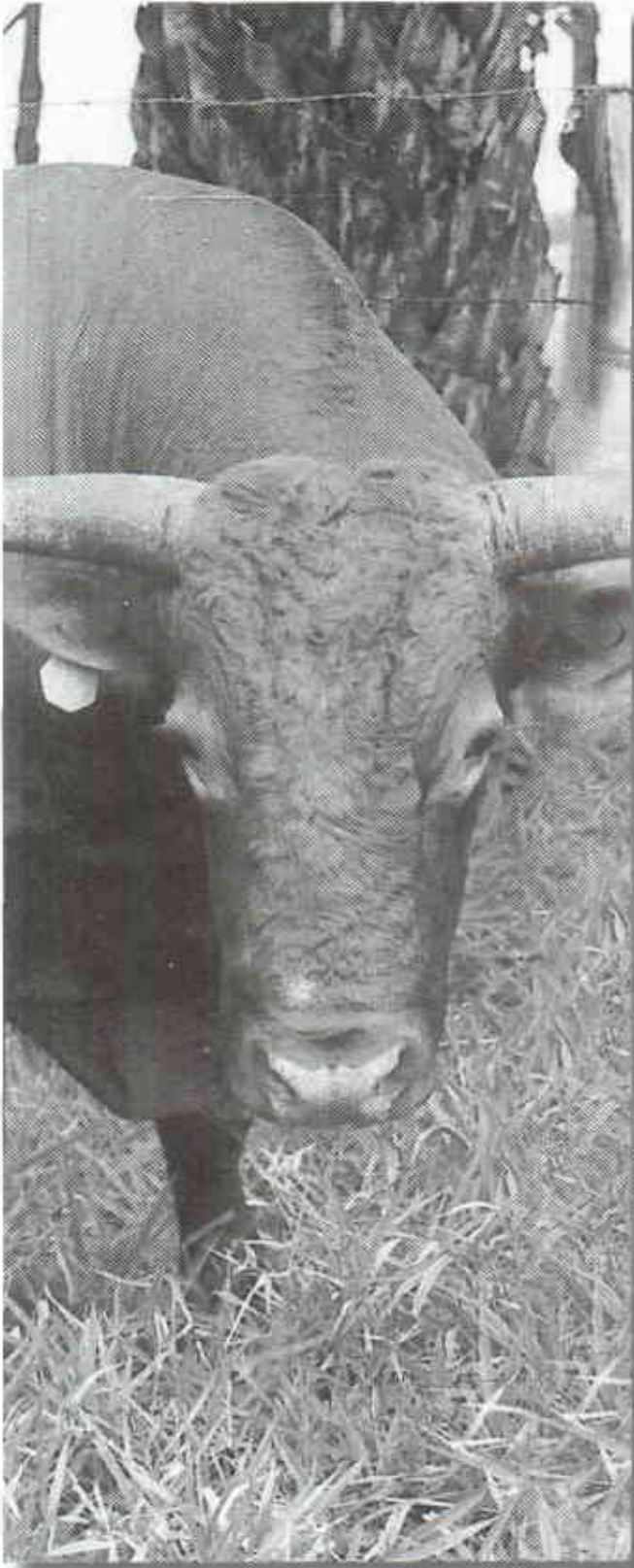
La penetración espermática en ovocitos, *in-vitro* fue superior en la raza san martinera (*Bos taurus*): 49.7% que en la brahman (*Bos indicus*): 39.0%. Estos resultados están corroborados con los reportados *in-vivo* por Hernández (1983); Martínez y col (1983) y Castro (1979), quienes encontraron mayor natalidad en vacas cebú apareadas con toros san martinero que con toros cebú y por el trabajo de Obando y Holguin (2003), quienes induciendo la reacción acrosómica *in-vitro*, demostraron también la superioridad de la raza san martinera frente a la Cebú.

Toros

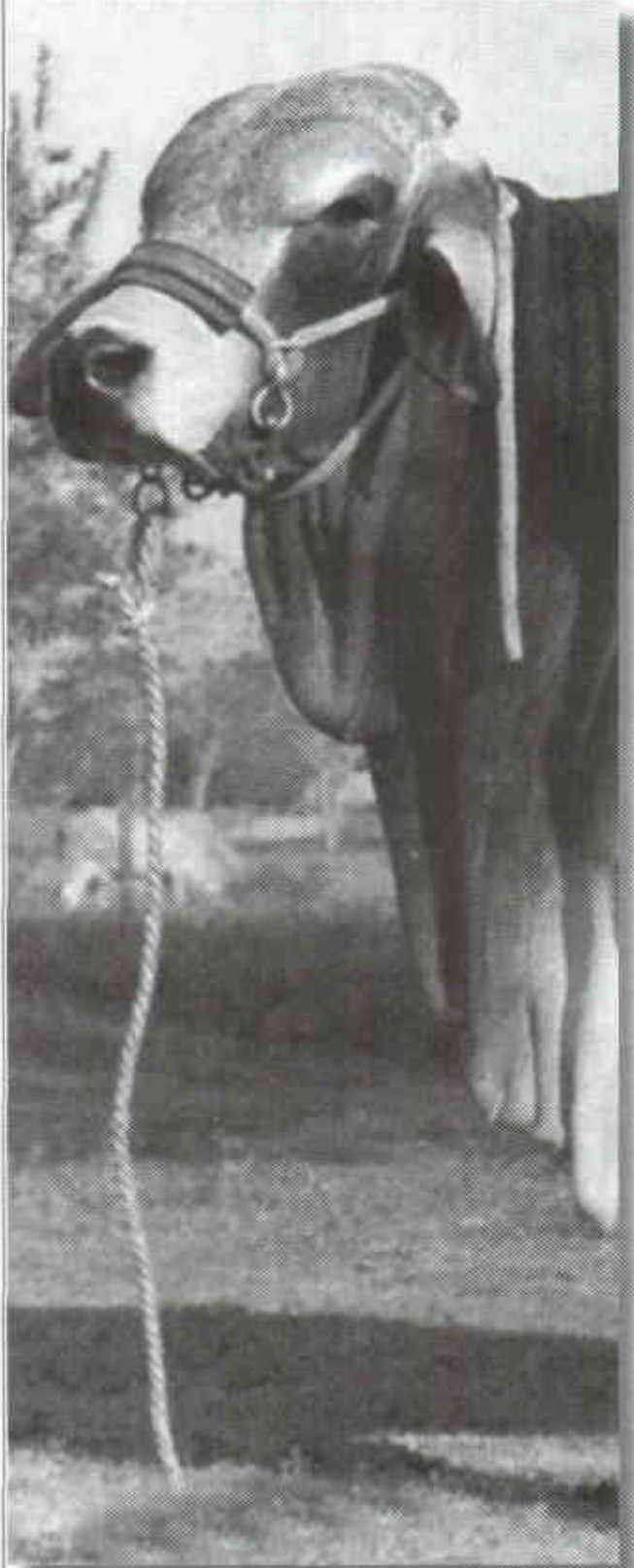
No se encontraron, diferencias de penetración espermática entre los toros de una misma raza como sí se reporta en la literatura (Hillery 1990; Oliveira, 1994; Saeki 1995, Lobo 1999 y col). Sin embargo, Obando y Holguín (2003) con la inducción de la reacción acrosómica *in-vitro* y la misma concentración de heparina (10 µg/ml) y semen de san martinero y Cebú, establecieron diferencias entre toros de la misma raza.

Heparina

Las tres concentraciones de heparina (2, 5 y 10 µg/ml) que se adicionaron a las gotas que contenían los ovocitos



SANMARTINERO (*Bos taurus*).



BRAHMAN (*Bos indicus*).

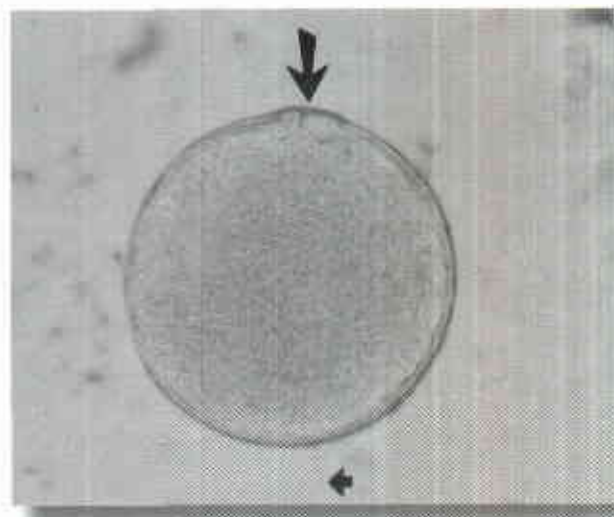


Figura 4. Ovocito madurado con cuerpos polares.

y espermatozoides aumentaron proporcionalmente los porcentajes de fertilización tanto en la raza san martinera (39.8%, 50.4% y 62.67%), como en la raza brahman (30.2%; 36,7% y 51.0%), sin embargo, Chacón, y col 2003, usando niveles de heparina de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml con semen gyr no obtuvieron una tasa de fertilización directamente proporcional a la dosis de heparina, logrando la mejor respuesta con 6 ug/ml = 85.4%. ($p < 0.05$). Esta diversidad de resultados hace énfasis para que se determine el nivel óptimo de heparina a usar en cada raza.

Polispermia

En éste estudio se encontró que los ovocitos fertilizados, que presentaron polispermia no fueron influenciados por la raza ni por la dosis de heparina en forma significativa, en cambio, Fukui, y col (1990) y Sacki, y col (1995), encontraron que al aumentar la concentración de heparina se aumentaba la polispermia sin afectar el porcentaje de fertilización.

Los porcentaje de polispermia de éste estudio de 6.8 a 12.8%, están por encima de los encontrados por Chacón, y col (2003), que oscilaron entre 1.6 a 5.6% con semen de gyr, pero similar al obtenido por De – Bem (1990): 7.5 a 12% (Figura 5).

Conclusiones

- La penetración espermática en ovocitos de matadero fue superior 10.7% en la raza san martinera (*Bos taurus*) que en la raza brahman (*Bos indicus*).

- La concentración de heparina de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la fertilización *in-vitro* es óptima para las razas san martinera y brahman.
- La presencia de polispermia en los ovocitos fertilizados fue independiente de la concentración de heparina y de la raza.

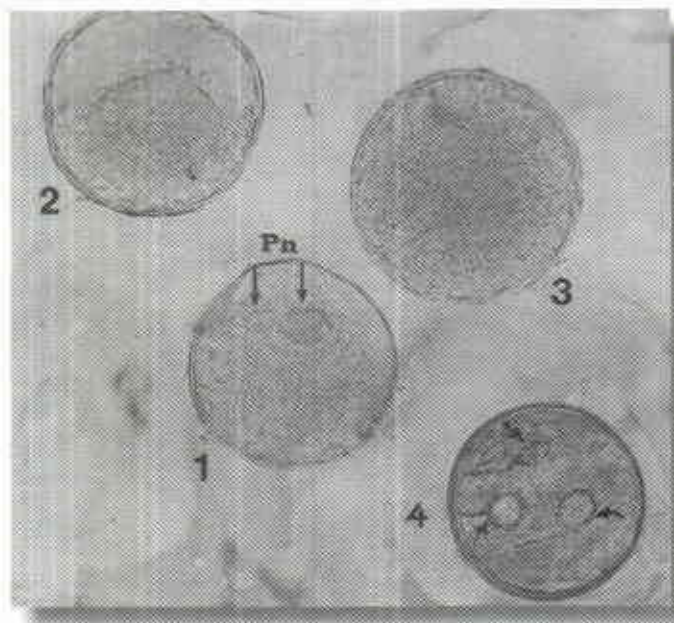


Figura 5. (Derecha) Ovocitos bovinos en diferentes estadios después de la fertilización: 1) pronúcleos, 2) atrésico, 3) normal sin signos de fertilización y 4) con polispermia (más de dos pronúcleos).

Bibliografía

AMANN, R. P. Developmental and age-Related changes in bulls that impact on semen production. Proceedings 16th NAAB Technical Committee. Pag. 22-27. 1996.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sc. Res. B. 4:581-596. 1951.

CASTRO, A. Importancia de la eficiencia reproductiva en la producción de carne, en: Encuentro Tecnológico sobre producción de bovinos para carne. ICA. Documento de Trabajo N°. 13, p.127. 1979.

CHACON, L, Estrada, J.L, Bernal, S.M. y Páez, J.C. Capacitación espermática y fertilización *In-Vitro* con semen de toro de la raza Gir en Colombia. ACOVEZ, Vol. 28 N°. 1. Pág. 13-19, marzo 2003.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, Nature 168:697-698, 1951.

DE-BEM, R. FIV una especie bovina. Mimeografiado. EMBRAPA – CENARGEN, Brasilia – Brasil, 1990.

- FUKUI, Y., Sonoyama, T., Mochizuki, H., Ono, H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 34:579-591, 1990.
- HAMANO, S. and Kuwayama, M. *In-Vitro* Fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39:703-712, 1993.
- HERNÁNDEZ, G. Recursos genéticos: Animales. Estudio FAO, producción y sanidad animal. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma N°. 22, p. 52-76 (2) 1981.
- HILLERY, F.L., Parrish, J.J. and First, N. L., Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*, 33 (1): 249, 1990.
- LOBO, R.B., Watanabe, M.R., Vila, R.A., Galerani, M.A.V. and Watanabe, Y.F., Effect of Nelore bull variation on embryo *In-Vitro* production. *Theriogenology* 51:348, 1999.
- MARTINEZ, C.G. y Hernandez, G. Factores ambientales que afectan el intervalo entre partos en ganado Blanco Orejinegro. *Revista ICA* Vol. XVIII, p. 311, 1983.
- OBANDO, H. y Holguin, N.J. Inducción de la reacción acrosómica *In-Vitro*, como prueba de fertilidad del semen bovino. *Revista ICA-INFORMA* Vol 30 N°. 1, 2003; p. 42-46
- OLIVEIRA, E.B., Watanabe, Y.F. and García, J.M. Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriogenology* 41:188, 1994.
- PARRISH, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, M.A. and First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180, 1988.
- PARRISH, J.J., Susko Parrish, J.L. and Graham, J.K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51:461-472, 1999.
- SAEKI, K., Nagao, Y., Hoshi, M. and Nagai, M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43: 751-759, 1995.
- SIRARD, M.A. Parrish, J.J. Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39:546-552, 1988.
- STEEL, R.G., and Torrie, J.H. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Segunda edición, Mexico, 618 pp, 1990.