

EFECTO DEL PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS SOBRE EL PATRÓN DE REACCIÓN ACROSÓMICA

Effect of sperm preparation protocol on the bovine acrosome reaction pattern

J.C. Gardón*⁺, C. Matás⁺, J. Gadea⁺

*Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Argentina e-mail:gardon@agrarias.net, ⁺Dept. Biología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España.

RESUMEN

En este trabajo se ha analizado el proceso de reacción acrosómica mediante la tinción con lectinas de muestras de semen bovino congelado que han sido sometidos a diferentes tratamientos de preparación. La adición de heparina y cafeína supone un aumento significativo del número de espermatozoides con los acrosomas reaccionados. Al seleccionar los espermatozoides en un columna de Percoll se acelera el proceso de reacción acrosómica. Estos datos confirman que la preparación de los espermatozoides para la fecundación in vitro afecta al patrón de capacitación y reacción acrosómica, de manera que pueden ser determinantes para el proceso de fecundación.

Palabras clave: bovino, reacción acrosómica, lectinas, heparina, Percoll

SUMMARY

The acrosome reaction of bovine frozen-thawed semen samples, under different preparation processes, was analysed by the lectin binding staining. The addition of heparin and caffeine to the medium significantly increased the number of sperm with acrosome reaction. When sperm was selected by the use of a Percoll gradient column, the process of acrosome reaction was accelerated. These data confirm that the sperm preparation for the in vitro fertilisation has an effect on the capacitation and acrosome reaction pattern, and it could be determinant for the fertilisation process.

Keywords: bull, acrosome reaction, lectins, heparine, Percoll

¹ Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos FEDER (1FD97-0501), PROFIT (FIT-010000-2000-76) y CICYT (AGL2000-0485-C02-01).

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides, inmediatamente después de la eyaculación, son incapaces de llevar a cabo el proceso de fecundación. Esta característica es adquirida a lo largo del paso por el tracto reproductivo femenino y tradicionalmente se le ha denominado capacitación (CHANG, 1951).

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 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 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 RODRIGUEZ MARTINEZ, 1994) y la filtración a través de lana de vidrio (PEREIRA et al., 1999).

Otro de los requisitos es la inducción de la capacitación de los espermatozoides que puede realizarse mediante el uso de sustancias fisiológicas como las células del cúmulus (MATTIOLI et al., 1998), el fluido folicular (SUAREZ et al., 1986), el fluido oviductal (GRIPPO ET AL., 1995), la progesterona (CHENG et al., 1998), las proteínas de la zona pelúcida (WASSARMAN, 1990) y los glicosaminoglicanos como la heparina (PARRISH et al., 1988). También se han usado con éxito sustancias no fisiológicas como

el ionóforo de calcio A23187 (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

El método de preparación de los espermatozoides determina los resultados de la FIV, por lo que el estudio de los patrones de capacitación y reacción acrosómica pueden ser fundamentales para optimizar el proceso.

Para estudiar la reacción acrosómica se ha utilizado con éxito diversas técnicas como la clásica microscopía de contraste interdiferencial (SAAKE y MARSHALL, 1968), diversas tinciones y microscopía de campo claro (WAY et al., 1995), lectinas unidas a fluoresceína y anticuerpos monoclonales (PARINAUD et AL., 1993).

El objetivo de este trabajo fue el análisis del efecto de la presencia de la heparina y la cafeína en el medio de capacitación, así como el uso del gradiente de Percoll sobre los patrones de reacción acrosómica analizada mediante el uso de la lectina PNA unida a fluoresceína.

MATERIAL Y MÉTODO

Prueba 1. Evaluación del efecto de la heparina y la cafeína en el medio de capacitación.

Muestras comerciales de semen bovino de raza Limousine, congeladas en medio Tris-yema de huevo en pajuelas de 0.25 ml, fueron descongeladas mediante inmersión en un baño a temperatura de 37°C durante 30 sec. Seguidamente fue diluido en 1 ml de medio TCM-199 modificado (COY et al., 1999) y suplementado con heparina (0.02 mg/ml) y cafeína (3.88 mg/ml), las muestras sin este suplemento fueron usadas como control. Las muestras fueron centrifugadas a 500 g durante 10 min y los pellets fueron resuspendidos en el mismo medio sin heparina ni cafeína. La concen-

tración final fue ajustada a $1-2 \times 10^7$ espermatozoides/ml y mantenidos en condiciones de cultivo a 38.5°C y 5% de CO_2 en aire saturado de humedad. Esta experiencia se realizó en 5 replicados.

Prueba 2. Evaluación del uso del gradiente de Percoll

Las muestras fueron procesadas con heparina-cafeína y tras la centrifugación a 500g durante 10 min. el pellet fue resuspendido en 0.5 ml de TCM-199 y fue procesado en una columna de Percoll 45-90 (PARRISH et al., 1995) y de nuevo centrifugado a 500 g x 30 min. El pellet resultante fue finalmente resuspendido en medio fresco, se ajusto la concentración y se mantuvo en cultivo. Esta experiencia se realizó en 5 replicados.

Evaluación de la reacción acrosómica

Cada 30 minutos, hasta un total de 150, se evaluó el estado del acrosoma mediante una tinción con la lectina (Peanut aglutinin) unida a fluoresceína (PNA-FITC) y Ioduro de Propidio (IP). A una alícuota de 100 μl de la suspensión espermática se le añadió 5 μl de PNA-FITC (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 5 μl de IP (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y finalmente fijada con 10 μl de una solución salina formolada al 1%. Tras una incubación de 10 min a 38°C se observaron dos muestras en un microscopio de epifluorescencia, para contabilizar 200 espermatozoides por muestra que fueron clasificados en tres categorías: a) espermatozoides intactos, con ausencia de tinción de ambos fluorocromos, b) espermatozoides con acrosoma reaccionado, cuando el área acrosomal estuvo teñida con PNA-FITC de color verde y c) espermatozoides con pérdida de integridad de

membrana cuando el espermatozoide se tiñe con IP de color rojo.

Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías, siendo los factores fijos el tratamiento (Heparina en exp. 1, Percoll en exp. 2) y el tiempo de incubación. Se consideró estadísticamente significativo cuando se alcanzó un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. Los datos se muestran como media \pm sem.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la prueba 1 muestran un efecto de la heparina y la cafeína sobre el patrón de reacción acrosómica, reduciendo de forma significativa el número de espermatozoides intactos ($p=0.017$), para aumentar el número de espermatozoides con reacción acrosómica ($p < 0.001$), mientras que el número de espermatozoides con lesión de la membrana no se ve afectada (Tabla 1). La heparina y la cafeína inducen la capacitación y reacción acrosómica como puede observarse en la variable número de espermatozoides reaccionados del total de vivos ($p < 0.001$) (Figura 1). En todas las variables estudiadas se ve un efecto del tiempo de cultivo ($p < 0.001$) salvo una tendencia para el número de espermatozoides con alteración de las membranas ($p=0.60$).

Cuando además de inducir la capacitación con heparina y cafeína los espermatozoides son procesados en un gradiente de percoll, se observa una disminución del número de espermatozoides intactos ($p=0.011$), para aumentar el número de espermatozoides reaccionados ($p=0.073$)

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides intactos (I), con reacción acrosómica (RA), con alteración de la membrana (AM) y proporción de reaccionados del total de vivos (REAC/VIVOS) después de ser sometidos a un tratamiento con heparina y cafeína.

	Tiempo (min)	I	RA	AM	REAC/VIVOS
Control	0	42.33±2.76	0.67±0.42	57.00±2.96	1.40±0.89
	30	39.50±0.50	1.83±0.79	58.67±1.08	4.23±1.76
	60	40.00±0.77	1.83±0.60	57.33±1.45	4.24±1.34
	90	37.67±1.33	2.67±0.88	58.17±1.80	6.25±2.10
	120	38.00±1.29	2.33±0.67	59.50±1.93	5.51±1.49
	150	37.40±1.50	2.80±0.80	59.80±2.11	6.67±1.73
Heparina y cafeína	0	47.80±3.44	0.00	52.20±3.44	0
	30	43.60±2.61	0.60±0.24	55.80±2.45	1.46±0.60
	60	36.00±3.30	5.40±0.40	55.60±2.91	13.43±1.52
	90	35.80±3.66	6.20±1.01	56.00±2.37	15.50±3.47
	120	27.60±3.29	8.40±1.43	64.00±4.30	23.14±2.95
	150	23.20±3.51	11.40±2.54	65.40±5.99	32.01±2.11
Anova					
Heparina		0.017	<0.001	0.963	<0.001
Tiempo		<0.001	<0.001	0.060	<0.001
Heparina*Tiempo		<0.001	<0.001	0.407	<0.001

Tabla 2. Porcentaje de espermatozoides intactos (I), con reacción acrosómica (RA), con alteración de la membrana (AM) y proporción de reaccionados del total de vivos (REAC/VIVOS) después de ser sometidos a un tratamiento con Percoll.

	Tiempo (min)	I	RA	AM	REAC/VIVOS
Control	0	38.40±1.37	1.10±0.41	60.50±1.38	2.75±1.00
	30	30.40±1.19	5.20±0.90	64.40±0.88	14.62±2.46
	60	22.90±0.91	9.10±0.50	68.50±0.95	28.53±1.52
	90	23.60±1.07	10.30±0.87	66.10±0.84	30.41±2.48
	120	18.90±1.96	12.20±0.61	68.90±2.04	40.56±3.22
	150	16.50±1.57	13.60±1.44	70.10±1.26	45.35±4.30
Percoll	0	37.40±0.79	3.10±0.53	59.50±0.60	7.66±1.28
	30	24.62±2.03	10.37±1.45	64.87±0.89	30.15±4.86
	60	23.40±0.99	7.60±0.72	68.90±0.95	24.56±2.20
	90	22.12±2.33	9.37±0.75	68.50±2.01	30.76±3.27
	120	15.12±1.02	14.12±0.97	68.25±1.13	48.28±2.98
	150	15.20±1.28	12.60±1.12	72.20±1.08	45.52±3.72
Anova					
Percoll		0.011	0.073	0.387	0.017
Tiempo		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Percoll*Tiempo		0.299	0.002	0.674	0.023

como puede verse en el número de reaccionados/vivos ($p=0.017$) (Tabla 2). De manera que el Percoll parece acelerar el proceso de capacitación y reacción acrosómica. Así, a los 30

minutos de cultivo ya se alcanza el 30% de espermatozoides reaccionados/vivos, y las tasas no se igualan con las del grupo control hasta los 60 minutos de cultivo (Figura 2).

Figura 1. Evolución del porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica frente al total de vivos a lo largo del tiempo de cultivo. Se estudia el efecto de la adición de heparina y cafeína al medio de cultivo.

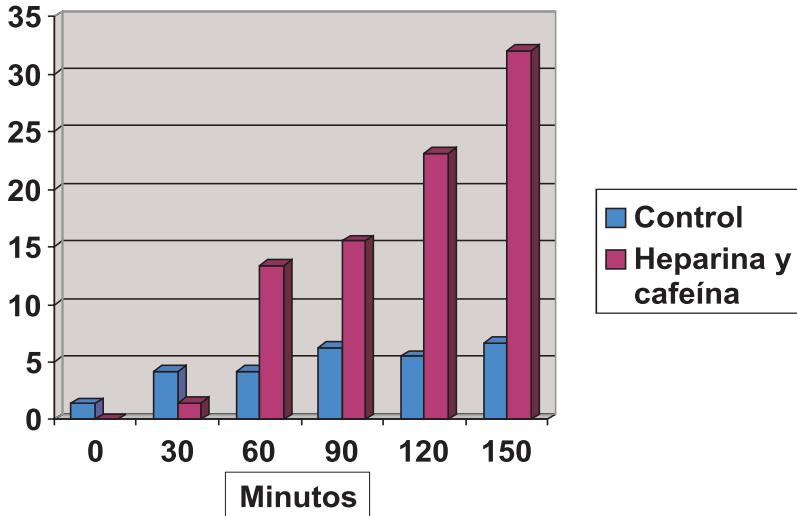
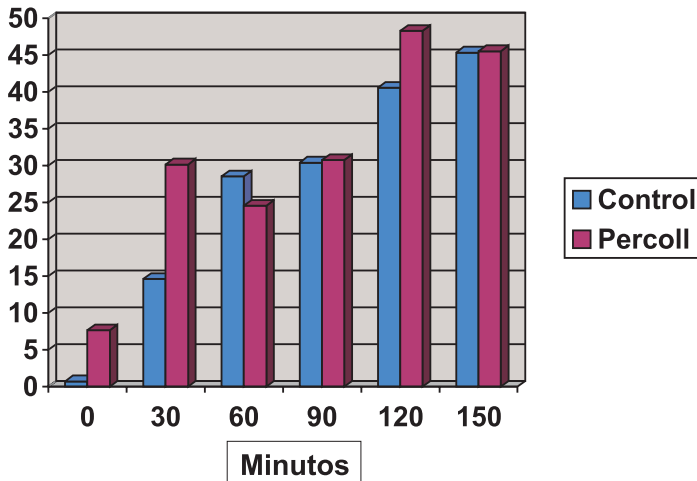


Figura 2. Evolución del porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica frente al total de vivos a lo largo del tiempo de cultivo. Se estudia el efecto de la separación de los espermatozoides en una columna de Percoll.



DISCUSIÓN

La capacitación es un proceso que incluye una secuencia de cambios bioquímicos que lleva a la desestabilización de las membranas del espermatozoide para que finalmente pueda desarrollar la reacción acrosómica. Este proceso que in vivo se produce durante la transporte espermático en el tracto femenino (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951), debe ser inducido in vitro para poder obtener fecundaciones in vitro.

En el oviducto bovino hay grandes concentraciones de glicosaminoglicanos como la heparina, llegando a alcanzar la concentración máxima en las cercanías de la ovulación (PARRISH et al., 1989). La heparina tienen un efecto positivo en la capacitación in vitro y en la penetración de los ovocitos bovinos in vitro. Del mismo modo, la posibilidad de desarrollar la reacción acrosómica in vitro tras la correspondiente inducción parece estar bien correlacionada con la fertilidad in vivo (THUNDATHIL et al., 1999; JANUSKAUSKAS et al., 2000). El mecanismo de acción no ha sido aclarado totalmente, pues se ha postulado que podría eliminar factores decapacitantes presentes en la membrana plasmática del espermatozoide, además de intervenir directamente en el control del intercambio de calcio (FIRST y PARRISH, 1987). En cuanto a la cafeína, parece tener un efecto sinérgico con la heparina, incrementando las tasas de penetración (NIWA y OHGODA, 1988).

El Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) es un gradiente de densidad que consiste en partículas coloidales de sílice de 15–30 nm de diámetro recubiertas de PVP. La separación en gradiente de Percoll permite obtener un alto número de espermatozoides móviles y es un sistema de alta repetibilidad. Con este

técnica se obtiene una tasa menor de fecundación in vitro que cuando se utiliza el sistema de swim-up. Sin embargo la tasa de blastocistos que se alcanza con ambos sistemas es similar (PARRISH et al., 1995).

Estas diferencias en las tasas de penetración podrían ser debidas al diferente patrón de capacitación y reacción acrosómica que presentan los espermatozoides sometidos a la columna de Percoll. De este modo, la aceleración del proceso daría lugar a que un gran número de espermatozoides estuvieran capacitados rápidamente tras la preparación pero su vida media acortada, de modo que las tasas de penetración estarían reducidas, como apuntan FUNAHASHI y NAGAI (2001) al estudiar el proceso de fecundación in vitro porcina.

Estos datos confirman que la preparación de los espermatozoides para la fecundación in vitro afecta al patrón de capacitación y reacción acrosómica, ya que la adición de heparina y cafeína produce un incremento significativo de espermatozoides con acrosomas reaccionados y el empleo de columnas de Percoll acelera el proceso de reacción acrosómica. Estos procesos de preparación de los espermatozoides van a ser determinantes para el proceso de fecundación y suponen un área de gran interés para el desarrollo de los estudios de fecundación in vitro en la especie bovina.

BIBLIOGRAFÍA

- AUSTIN, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austr. J. Vet. Res.* 4: 581-596.
- COY, P., RUIZ, S., ROMAR, R., CAMPOS, I., GADEA, J., 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under

- different systems, *Theriogenology* 51: 799-812.
- CHANG, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- CHENG, F.P., FAZELI, A.R., VOORHOUT, W.F., TREMOLEDA, J.L., BEVERS, M.M., COLENBRANDER, B. 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *Int. J. Androl.* 21: 57-66.
- FIRST, N.L., PARRISH, J.J. 1987. In-vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34: 151-65.
- FUNAHASHI, H., NAGAI, T. 2001. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.* 58:424-431.
- GRIPPO, A.A., WAY, A.L., KILLIAN, G.J. 1995. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 105: 57-64.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*. 53: 859-875.
- MATTIOLI, M., LUCIDI, P., BARBONI, B. 1998. Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 445-453.
- NIWA, K., OHGODA, O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*. 29: 1375-1381.
- PARINAUD, J., LABAL, B., VIEITEZ, G., RICHAILLEY, G., GRANDJEAN, H. 1993. Comparison between fluorescent peanut agglutinin lectin and GB24 antibody techniques for the assessment of acrosomal status. *Hum. Reprod.* 8: 1685-1688.
- PARRISH, J.J., 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., KROGENAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. 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., SUSKO-PARRISH, J.L., HANDROW, R.R., SIMS, M.M., FIRST, N.L. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020-1025.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A., FIRST, N.L. 1988. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
- PEREIRA, R.J., TULI, R.K., WALLENHORST, S., 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.
- SAAKE, R.G., MARSHALL, C.E. 1968. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 16: 511-514.

- SAEKI, K., HOSHI, K., LEIBFREID-RUTLEDGE, M.L., FISRT, N.L. 1990. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available FSH. *Theriogenology*. 34: 1035-1039.
- SHAMSUDDIN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1994. A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 61-75.
- SUAREZ, S.S., WOLF, P.D., MEIZEL, S. 1986. Induction of the acrosome reaction by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14: 107-122.
- THUNDATHIL, J., GIL, J., JANUSKAUSKAS, A., LARSSON, B., SODERQUIST, L., MAPLETOFT, R., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1999. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int. J. Androl.* 22: 366-373.
- VAN SOOM, A., DE KRUIF, A. 1996. Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 31:687-701.
- WASSARMAN, PM. 1990. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42: 79-87.
- WAY, A.L., HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa, *Theriogenology* 43: 1301-1316.