

## EFECTO DEL MEDIO DE FECUNDACIÓN IN VITRO SOBRE EL PATRON DE REACCION ACROSOMICA EN EL ESPERMATOZOIDE BOVINO<sup>1</sup>

In vitro fertilization medium effect on the bovine acrosome reaction pattern.

**J.C. Gardón\*\*+, J. Gadea<sup>+</sup>**

\*Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Argentina.

<sup>+</sup>Dept. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España. [jgadea@um.es](mailto:jgadea@um.es)

\* Correspondencia a: [jcgardon@yahoo.com.ar](mailto:jcgardon@yahoo.com.ar)

### RESUMEN

En este trabajo se ha analizado el proceso de reacción acrosómica de muestras congeladas de semen bovino cultivados en tres medios de cultivo utilizados para la fecundación in vitro TALP, TCM-199 y BO. El estado del acrosoma y la viabilidad espermática fue evaluada mediante una doble tinción fluorescente con lectinas unidas a fluoresceína y yoduro de propidio. El medio utilizado y el tiempo de cultivo ejercen un efecto significativo sobre los parámetros estudiados. Así el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos es superior en el medio TCM-199 (valor medio  $30.93 \pm 1.18$ ) que en TALP ( $28.79 \pm 1.40$ ) o BO ( $26.53 \pm 1.31$ ). El medio TALP es el que induce un mayor porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica (valor medio TALP  $9.33 \pm 0.81$ , TCM-199  $6.76 \pm 0.64$  BO  $7.33 \pm 0.54$ ), mientras que los espermatozoides cultivados en el medio TCM-199 presentan un retraso en el patrón de reacción acrosómica.

**Palabras clave:** bovino, espermatozoide, reacción acrosómica, fecundación in vitro, medio de cultivo, lectinas, yoduro de propidio

### SUMMARY

Frozen bull semen was thawed and diluted in three different in vitro fertilization media: TCM-199, TALP and BO. Assessment of cytoplasmic membrane integrity and proportion of acrosome reacted sperm were accomplished by FITC-PNA lectin and PI staining in a epi-fluorescent microscope. The results showed that the number of intact, acrosome reacted and damaged membrane spermatozoa was significantly affected by both IVF medium and time of culture ( $p < 0.001$ ). So, the number of sperm with intact acrosome and membrane

---

<sup>1</sup> Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto CICYT (AGL2000-0485-C02-01).

was higher when was cultured in TCM-199 (mean value  $30.93 \pm 1.18$ ) than in TALP ( $28.79 \pm 1.40$ ) and BO ( $26.53 \pm 1.31$ ) and it was decreasing during the culture time. For the number of reacted acrosome spermatozoa was significantly higher for TALP than the others media and it was increasing during the culture period (mean value TALP  $9.33 \pm 0.81$ , TCM-199  $6.76 \pm 0.64$ , BO  $7.33 \pm 0.54$ ). In relation to died sperm, BO was significantly higher than the others media and the relation between the number of acrosome reacted and total intact membrane spermatozoa was lower for TCM-199 than the other; finally, the process of acrosome reaction was slower than BO and TALP.

**Keywords:** bull, spermatozoa, acrosome reaction, in vitro fertilization, culture medium, lectine, propidium iodide

## INTRODUCCIÓN

Sobre el éxito de la fecundación in vitro (FIV) en la especie bovina incide una amplia variedad de factores (revisado por Brackett y Zuelke, 1993; Van Soom y de Kruif, 1996; Shamsuddin et al., 1996). De entre todos ellos, destaca por su importancia la composición de los medios de cultivo utilizados en los procesos de producción de embriones in vitro. De forma tradicional se ha empleado un medio de cultivo específico para cada una de las fases del sistema de producción in vitro de embriones (maduración, fecundación y cultivo embrionario), por lo que se busca la posibilidad de utilizar un único medio que cumpla los requisitos de cada una de las fases (Gandhi et al., 2000). Por otra parte, sabemos que el medio utilizado en la FIV podría tener una importancia fundamental al ejercer efectos tanto en la reacción acrosómica del espermatozoide como en la penetrabilidad de los ovocitos y en el desarrollo embrionario posterior.

La composición del medio de FIV va a condicionar la posibilidad de desarrollo de la reacción acrosómica, fase fundamental para el proceso de fecundación en la que se produce la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide. 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 del presente trabajo fue analizar el efecto del medio de FIV sobre los patrones de reacción acrosómica analizada mediante el uso de la lectina Peanut aglutinin (PNA) unida a fluoresceína.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras comerciales de semen bovino de raza Limousine, congeladas en medio Tris-yema de huevo en pajuelas de 0.25 ml fueron procesadas de acuerdo al método descrito por Gardón et al. (2001). Básicamente, las muestras son descongeladas mediante inmersión en un baño atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 sec. Posteriormente fueron diluidas en tres diferentes medios de FIV (tabla 1): TCM-199 (Coy et al., 1999); TALP (Parrish et al., 1988) y BO (Brackett y Oliphant, 1975), todos ellos suplementados con albúmina sérica bovina (Fracción V, libre de ácidos grasos, 20 mg/mL), heparina (0.02 mg/mL) y cafeína (3.88 mg/mL). Las muestras fueron centrifugadas a 500 g durante 10 min y los pellets fueron resuspendidos en el mismo medio sin heparina ni cafeína. La concentración final fue ajustada a  $1-2 \times 10^7$  espermatozoides/ml y mantenidos en condiciones de cultivo a  $38.5^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  en aire saturado de humedad. 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

Tabla 1. Composición de los medios utilizados expresados en mmol/L

Componentes	TALP	TCM-199a	BO
NaCl	114.06	116.35	112.00
KCl	3.20	5.36	4.02
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	1.80	2.25
Ca-Lactato · 5H <sub>2</sub> O	8.00	8.75	
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.50	-	0.52
MgSO <sub>4</sub>	-	0.81	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35	1.01	0.83
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	25.07	37.00
Lactato sódico (ml/L)	10.00		10.00
Na-Piruvato sódico	1.10	0.90	1.25
Glucosa	5.00	3.05	
BSA (mg/ml)b	20.00	20.00	20.00
Penicilina G		0.17	
Streptomina		0.07	
Sulfato de gentamicina (µg/L)			5
Sulfato de Kanamicina	0.17		

a Lista parcial de los componentes de TCM-199, Sigma, M-5017

b Fraction V, Sigma, A-9647

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 µg/ml) y 5 µl de IP (500 µg/ml) y finalmente fue fijada con 10 µl de una solución salina formulada al 1%. Tras una incubación de 10 min a 38°C se observaron dos muestras en un microscopio de epifluorescencia, contabilizándose 200 espermatozoides que fueron clasificados en tres categorías: a) espermatozoides intactos (I), con ausencia de tinción de ambos fluorocromos, b) espermatozoides con acrosoma reaccionado (AR), 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 (AM). Los parámetros evaluados para cada medio de fecundación han sido: porcentaje de espermatozoides intactos (I), con reacción acrosómica (RA), con alteración de la membrana (AM) y proporción de reaccionados del total de vivos (RA/VIVOS)

### Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías, siendo los factores fijos el tratamiento 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

Observamos que en todos los parámetros estudiados que caracterizan el patrón de reacción acrosómica: porcentaje de intactos (I), reaccionados (AR), con membrana alterada (AM) y la proporción de reaccionados frente al total de vivos (RA/VIVOS), hay un efecto significativo del medio de fecundación utilizado y del tiempo de incubación ( $p < 0.002$ ) (Tabla 2).

El porcentaje de espermatozoides vivos y con el acrosoma intacto es significativamente mayor cuando se utiliza el medio TCM-199 que

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 (RA/VIVOS) después de ser cultivados en tres diferentes medios de fecundación in vitro (TALP, TCM-199 y BO). Datos expresados en medias  $\pm$  error estándar de la media**

	Tiempo (min)	I	RA	AM	RA/VIVOS
TALP	0	44.31 $\pm$ 2.12	0.15 $\pm$ 0.38	55.53 $\pm$ 2.15	0.31 $\pm$ 0.21
	30	36.84 $\pm$ 2.07	5.15 $\pm$ 1.65	57.69 $\pm$ 2.61	11.07 $\pm$ 2.88
	60	29.69 $\pm$ 2.25	9.15 $\pm$ 1.07	61.92 $\pm$ 2.38	24.06 $\pm$ 2.49
	90	24.61 $\pm$ 2.68	11.46 $\pm$ 1.45	64.00 $\pm$ 2.72	32.41 $\pm$ 3.48
	120	19.46 $\pm$ 2.46	16.69 $\pm$ 1.59	63.53 $\pm$ 2.82	47.05 $\pm$ 4.20
	150	17.84 $\pm$ 2.01	13.38 $\pm$ 1.52	70.30 $\pm$ 3.10	42.85 $\pm$ 3.04
TCM-199	0	42.00 $\pm$ 1.91	0.07 $\pm$ 0.07	57.92 $\pm$ 1.90	0.20 $\pm$ 0.20
	30	38.84 $\pm$ 1.56	1.46 $\pm$ 0.35	59.69 $\pm$ 1.40	3.80 $\pm$ 0.91
	60	33.07 $\pm$ 1.85	6.31 $\pm$ 0.89	59.84 $\pm$ 1.45	16.50 $\pm$ 2.55
	90	29.61 $\pm$ 2.48	8.38 $\pm$ 1.18	61.15 $\pm$ 1.67	23.36 $\pm$ 3.64
	120	22.38 $\pm$ 1.81	11.61 $\pm$ 1.04	66.00 $\pm$ 1.70	34.56 $\pm$ 3.20
	150	19.69 $\pm$ 1.60	12.76 $\pm$ 1.18	67.46 $\pm$ 2.34	39.09 $\pm$ 2.39
BO	0	42.23 $\pm$ 1.52	0.23 $\pm$ 0.16	57.53 $\pm$ 1.59	0.48 $\pm$ 0.34
	30	32.08 $\pm$ 1.96	4.92 $\pm$ 0.76	63.00 $\pm$ 1.26	14.32 $\pm$ 2.76
	60	26.92 $\pm$ 2.34	8.46 $\pm$ 0.84	64.08 $\pm$ 1.64	25.58 $\pm$ 3.19
	90	23.84 $\pm$ 2.61	9.76 $\pm$ 1.06	66.38 $\pm$ 1.91	31.01 $\pm$ 3.87
	120	18.61 $\pm$ 2.25	9.61 $\pm$ 0.92	71.76 $\pm$ 1.88	36.33 $\pm$ 3.94
	150	15.76 $\pm$ 2.01	11.00 $\pm$ 1.06	71.69 $\pm$ 2.88	42.10 $\pm$ 3.05

#### Fuentes de variación

	I	RA	AM	RA/VIVOS
Medio de FIV	0.0018	0.0001	0.0037	0.0001
Tiempo de cultivo	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Medio*Tiempo	0.8467	0.0145	0.7377	0.2765

cuando se utiliza TALP o BO, no existiendo diferencias entre estos dos últimos (Fig 1 a). Sin embargo, la velocidad con la que el porcentaje de intactos disminuye a lo largo del tiempo es similar para todos los medios estudiados (interacción medio - tiempo,  $p=0.847$ ).

Por otra parte, la proporción de los espermatozoides vivos con acrosomas reaccionados es significativamente superior para el medio TALP que para TCM-199, mientras que el medio BO

mantiene una situación intermedia. De modo que la reacción acrosómica para los espermatozoides en el medio TCM-199 está retrasada en el tiempo y no alcanza valores importantes hasta los 90-120 minutos de cultivo cuando esos valores son alcanzados en 60 minutos en los espermatozoides cultivados en medio TALP, como puede observarse al estudiar la proporción de espermatozoides vivos con reacción acrosómica (AR/VIVOS) (Tabla 2 y Fig 1b).

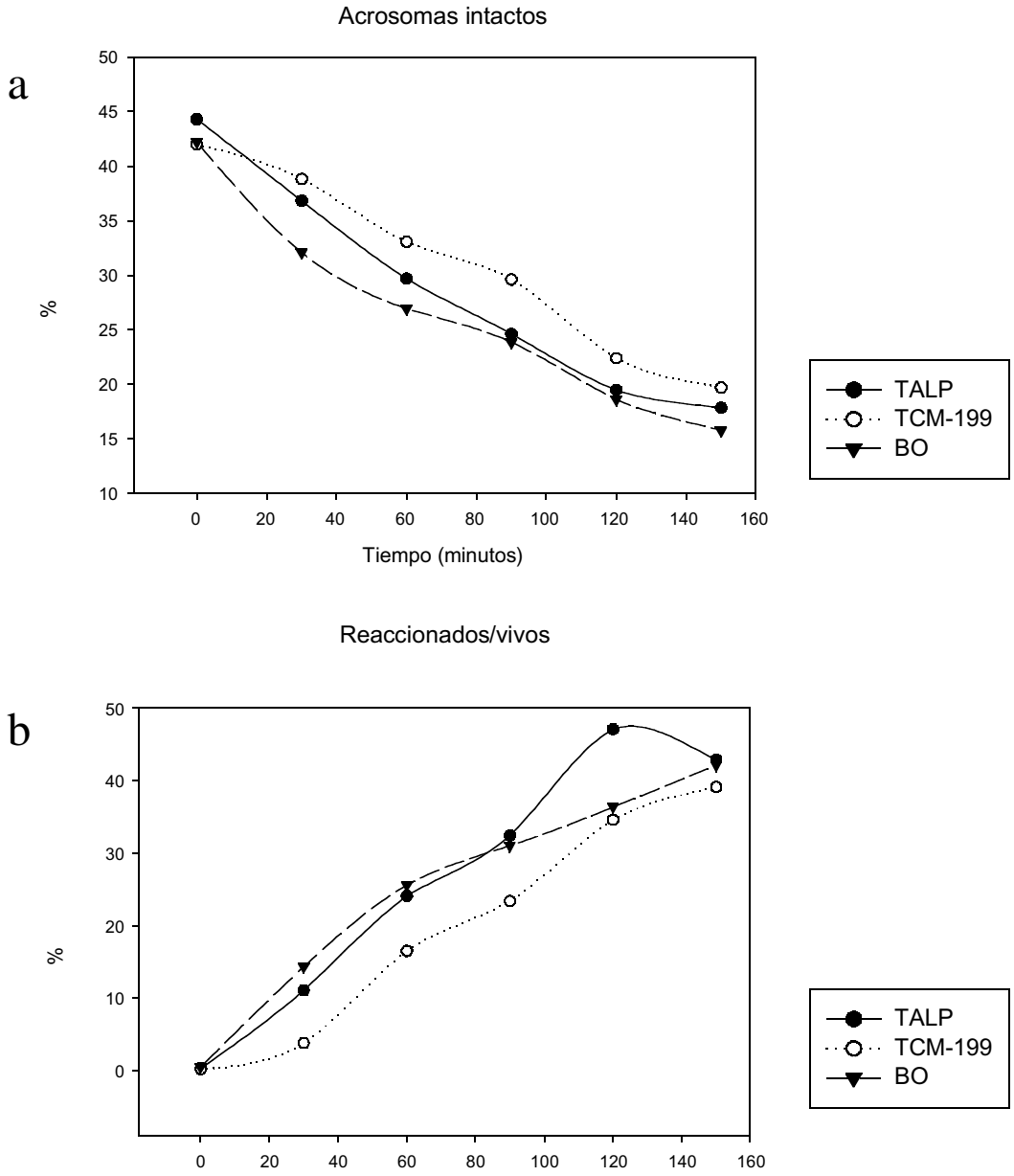


Figura 1. Evolución del porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (a) y la relación reaccionados/vivos a lo largo del tiempo de cultivo para los tres medios estudiados (TALP, TCM-199 y BO).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides que tienen alterada su membrana es creciente a lo largo del proceso de incubación y es significativamente superior para los espermatozoides cultivados en medio BO frente al resto (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

La capacitación espermática 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 debe ser inducido *in vitro* para poder obtener fecundaciones *in vitro* y para ello, en este estudio, todos los medios utilizados fueron suplementados con heparina y cafeína. Estas sustancias favorecen el proceso de capacitación y reacción acrosómica (Parrish et al., 1988, Pereira et al., 2000; Gardón et al., 2001).

La reacción acrosómica es un proceso que se produce inmediatamente después de la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito y básicamente consiste en la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa permitiendo la salida del contenido acrosomal (Saling et al., 1979). Los medios de FIV para los espermatozoides bovinos congelados no deben inducir una reacción acrosómica prematura que daría lugar a espermatozoides incapaces de fecundar ovocitos sino inducir la capacitación de una pequeña subpoblación espermática que sea capaz de reaccionar ante la presencia de la zona pelúcida del ovocito durante el periodo de cocultivo (Flesh y Gadella, 2000).

El medio TCM-199 es tradicionalmente utilizado para la maduración *in vitro* y para el cultivo de embriones en la especie bovina. Este es un medio complejo con una amplia variedad de componentes que puede usarse con suplementación de suero (Lonergan et al., 1994) o sin este aditivo (Keskinetepe y Brackett, 1996). Por otra parte, tanto el medio TALP como el

BO son soluciones salinas relativamente sencillas que se utilizan para el proceso de fecundación. La posibilidad de utilizar con éxito un solo medio en todas las fases del proceso facilitaría las tareas en el laboratorio y el trabajo experimental.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que el medio utilizado para la fecundación *in vitro* afecta al patrón de reacción acrosómica. De manera que la reacción acrosómica está acelerada en los medios TALP y BO en relación con la producida en el medio TCM-199.

Aunque se ha descrito una relación entre la concentración de  $Ca^{++}$  en el medio asociado a la capacidad para desarrollar la reacción acrosómica (Fraser y McDermott, 1992) y producir una mayor tasa de penetraciones *in vitro* (Matás et al., 2000). Sin embargo, en este estudio no se confirma esta relación directa, ya que el medio TCM-199 es el que contiene una mayor concentración de  $Ca^{++}$  que los otros estudiados y sin embargo, la reacción acrosómica está retrasada, por tanto otros factores deben estar implicados.

Un factor a tener en cuenta es la compleja composición del medio TCM-199, que incluye una amplia variedad de aminoácidos, lípidos y vitaminas. Estos componentes podrían modular la biodisponibilidad de calcio. Del mismo modo, la albúmina sérica bovina adicionada a los medios puede ejercer un efecto directo sobre la membrana espermática, como la fijación del colesterol presente en la membrana modificando cambios en la arquitectura de la misma (Flesh y Gadella, 2000).

Otro factor implicado en el proceso de capacitación y reacción acrosómica está asociado a los niveles de bicarbonato presentes en el medio, estando en mayor concentración en el medio BO. Este bicarbonato se une directamente a una enzima adenil ciclasa específica del espermatozoide incrementándose considerablemente los niveles de AMPc intracelular (Okamura et al., 1985). Esta señal actúa como activador de

una cadena de reacciones que llevan a la capacitación y reacción acrosómica (Benoff, 1998).

La elección de los medios de cultivo y los 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*. Del mismo modo, en otras especies ha sido demostrado el efecto del medio de fecundación sobre los patrones de reacción acrosómica y sobre los resultados de fecundación y desarrollo embrionario, tanto en la especie caprina (Izquierdo et al., 1998) o la porcina (Coy et al., 2002).

Para utilizar con éxito el medio TCM-199 en el proceso de fecundación bovina sería necesaria ajustar otras variables como la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  y de los inductores de la capacitación (en este caso heparina y cafeína) que permitan acelerar los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Benoff S. 1998. Modelling human sperm-egg interactions *in vitro*: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 453-471.
- Brackett B.G., Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2: 260-274.
- Brackett B.G., Zuelke K.A. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39: 43-64.
- Coy P., Gadea J., Romar R., Matás C., García E. 2002. The effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and *in vitro* development in the pig. *Reproduction*. 142: 279-288.
- 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.
- Flesh F.M., Gadella B.M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 197-235.
- Fraser L.R., McDermott C.A. 1992.  $\text{Ca}^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J Reprod Fertil.* 96: 363-377.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reprod* 15: 395-401
- Gardón J.C., Matás C., Gadea J. 2001. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *An. Vet. (Murcia)* 17: 19-26.
- Izquierdo D., Villamediana P., Palomo M.J., Mogas T., Paramio MT. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49:1501-13.
- Keskintepe L., Brackett B.G. 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 55: 333-339.
- Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. 1994. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod Nutr Dev* 34: 329-339.
- Matás C., Romar R., Coy P., Campos I., Gadea J., Sellés E., Ruiz S. 2000. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  in IVF medium on penetration of boar spermatozoa into pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 53: 425 abstr. 2000.
- Okamura N., Tajima Y., Soejima A., Masuda H., Sugita Y. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 260: 9699-9705.

- Parinaud, J., Labal, B., Vieitez, G., Richoilley, 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., 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.
- Saling P.M., Sowinski J., Storey B.T. 1979. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool.* 209: 229-238.
- Shamsuddin M., Niwa K., Larsson B., Rodruiguez-Martínez H. 1996. In vitro Maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 613-622.
- Van Soom A., de Kruif A. 1996. Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro produciton of embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 31:687-701.
- 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.