

Artículo corto:

PARÁMETROS DE CINÉTICA ESPERMÁTICA ANTES Y DESPUÉS DE LA SELECCIÓN CON GRADIENTE DE PERCOLL 45/90 EN SEMEN CONGELADO DE BOVINOS

Kinetic parameters of sperm before and after selection by percol gradient 45/90% frozen bovine semen

E. Ancco, C. Quispe , E. Mellisho

*Laboratorio de Biotecnología Reproductiva “Carlos Rodríguez Villegas”, Departamento de Producción Animal,
Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.*

E-mail (Edith Ancco): edith_ag18@hotmail.com

RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* requiere espermatozoides seleccionados por características morfológicas y cinéticas, para garantizar una fecundación normal y desarrollo embrionario eficiente. El objetivo del trabajo fue comparar los parámetros de cinética espermática antes y después de selección mediante columna de densidad con gradiente de percoll 45/90 en bovinos. Se utilizaron (n=8) pajillas de semen congelado comercial de toros de fertilidad conocida, que fueron descongeladas a 37°C por 30 segundos y analizadas antes y después de la centrifugación (percoll 45/90) con el computer assisted sperm analysis (CASA) para evaluar los siguientes parámetros cinéticos VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB y BCF. Para la selección espermática se colocó 500 µl de percoll 45 en la parte superior y 500 µl de percol 90 en la parte inferior en un microtubo cónico y 200 µl semen descongelado en la parte superior, centrifugando a 3000RPM (1077G) por 15 minutos. En este trabajo la cinética espermática definida por CASA se demostró que las muestras seleccionadas (después) tuvieron mayor velocidad que las muestras descongeladas (antes).

Palabras clave: *Cinética, espermatozoide, bovino*

ABSTRACT

Production of embryos *in vitro* requires selected by morphological and kinetic features, to ensure normal fertilization and embryo development efficient sperm. The objective was to compare the kinetic parameters of sperm before and after selection by column percoll density gradient 45/90 in cattle. (n = 8) straws of frozen semen commercial bulls known fertility were thawed at 37 ° C for 30 seconds and analyzed before and after centrifugation (percoll 90/45) with computer assisted sperm analysis (CASA) were used for evaluate the following kinetic parameters VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB and BCF. To 500 µl sperm selection Percoll 45 in the top and 500 µl of Percoll 90 in the bottom was placed in a microtube and 200 µl conical thawed semen top, centrifuging at 3000 RPM (1077G) for 15 minutes. In this paper defined by CASA sperm kinetics showed that the selected samples (after) were faster than thawed samples (before).

Keywords: *Kinetics, spermatozoa, bovine*



INTRODUCCIÓN

El espermatozoide de mamífero consiste en cabeza, con un núcleo altamente compactado de genoma haploide y el flagelo conteniendo las mitocondrias que generan la energía necesaria y la propulsión para la motilidad espermática (Turner, 2003). La medida de motilidad espermática es subjetiva debido a que depende individualmente del observador y la precisión de la estimación de la motilidad es muy importante, siendo de alta correlación con la fertilidad, si se usa como variable el promedio de la estimación de diferentes técnicos (Foote, 2003). El sistema computarizado de análisis de semen (CASA-Computer - Assisted Sperm Analyzer) ha sido usado para resolver el problema de la variabilidad y se ha encontrado una correlación significativa con la fertilidad (Hirai *et al.*, 2001).

La producción de embriones *in vitro* requiere espermatozoides seleccionados por características morfológicas y cinéticas, para garantizar una fecundación normal y desarrollo embrionario eficiente. Según Henkel y Schill (2003) la selección ideal de espermatozoides con alta capacidad fecundante debe ser rápida, fácil y económica. Clasificar espermatozoides móviles, sin causar daños o alteraciones no fisiológicas en las células espermáticas es muy importante, asimismo se debe eliminar los espermatozoides muertos u otras células, tales como leucocitos, bacterias y sustancias tóxicas o bioactivos tales como factores de decapitación o especies reactivas de oxígeno (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2011). Los métodos de selección espermáticamente comúnmente usados son lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de Percoll, filtración Sephadex y la lana de vidrio. La centrifugación en gradiente de densidad (Percoll) es el método más utilizado y ha sido utilizado para la separación de espermatozoides en diferentes especies (Pertoft, 2000).

El objetivo del trabajo es comparar los parámetros de cinética espermática antes y después de selección mediante columna de densidad con gradiente de percoll 45/90 en semen congelado de bovinos, previo a la exposición de los espermatozoides a los ovocitos madurados en gotas de fecundación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva “Carlos Rodríguez Villegas” de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima – Perú. Se utilizaron (n=8) pajillas de semen congelado comercial de toros de fertilidad conocida, que fueron descongeladas a 37°C por 30 segundos y analizadas antes y después de la centrifugación (percoll 45/90) con el computer assisted sperm analysis (CASA- ISAS®, Proiser, España) los siguientes parámetros cinéticos velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), frecuencia de batida de la cola (BCF).

La selección espermática se realizó en gradiente de densidad (percoll 45/90). Se colocó una muestra de 500 µl de percoll 45 en el gradiente superior y 500 µl de percoll 90 en el gradiente inferior en microtubo cónico y 200 µl semen descongelado en la parte superior, llevándose a la primera centrifugación a 3000RPM (1077 G) por 15 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el pellet (porción espermática), se diluyó a una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml

y se realizó el análisis CASA post procedimiento a la selección. Este procedimiento se realizó con modificaciones de Ripamonte *et al.* (2011).

Para la comparación de parámetros de cinética espermática, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con igual número de repeticiones por tratamiento, para la comparación de medias antes y después se utilizó la prueba de Tukey ($P \geq 0.05$).

RESULTADOS

Los resultados del análisis CASA de las comparaciones de antes y después de la selección para los parámetros evaluados se enumeran en la tabla 01.

Tabla 01: Comparación de los parámetros de cinética espermática post descongelación (ANTES) y post selección espermática (DESPUES).

Parámetros de cinética	n° toros	antes “post descongelación”	después “post selección”
VSL (µm/s)	8	26,09±3,54 ^a	35,79±13,14 ^a
VAP (µm/s)	8	41,38±4,65 ^b	53,55±13,11 ^a
VCL (µm/s)	8	73,16±9,09 ^b	88,4±19,07 ^a
LIN (%)	8	35,76±3,85 ^a	39,74±8,32 ^a
STR (%)	8	63,05±4,17 ^a	65,3±10,05 ^a
WOB (%)	8	56,6±2,92 ^a	60,36±4,35 ^a
BCF (Hz)	8	8,06±1,32 ^a	7,78±1,69 ^a

^{ab} Letras diferentes dentro de una misma fila muestran diferencias significativas ($P < 0.05$)

DISCUSIÓN

El análisis espermático es comúnmente realizado en laboratorios, debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo, sin embargo, la correlación con la fertilidad es muy variable, baja y en muchos casos contradictoria (Tardif *et al.*, 1999). La subjetividad de los resultados de motilidad espermática depende individualmente del observador y la precisión de la estimación de la motilidad, siendo esto muy importante cuando se correlaciona con la fertilidad.

La cinética espermática puede ser definida objetivamente, utilizando un sistema computarizado de análisis de semen (CASA) y se ha encontrado una correlación significativa con la fertilidad (Hirai *et al.*, 2001). En este trabajo la cinética espermática fue definida por CASA (ISAS®, Proiser, España) y se demostró que las muestras seleccionadas tenían mayor velocidad curvilínea de 73,16±9,09b a 88,4±19,07a antes y después respectivamente y la velocidad promedio de 41,38±4,65b a 53,55±13,11a antes y después respectivamente. Mostrándonos diferencias significativas para estos parámetros. (ver tabla 1). Según Benon y Linet (2008), reportan que hay un aumento significativo en ALH, VCL, y en menor proporción VSL. Esto parece caracterizar un aumento significativo en el espermatozoide hiperactivado. Samardzija *et al.* (2003) reportan que las muestras de semen congelado bovino procesadas con percoll (90/45) y Bovipure® (Nidacon, Suecia) incrementaron la proporción de motilidad progresiva en 14 y 16%, la reacción osmótica (HOS) en 16 y 13% y la proporción de vivos (SYBR-14/PI) en 26 y 28%, respectivamente, correspondientemente se observó una tasa de división embrionaria de 65 y 75% y tasa de

blastocistos (día, 7) de 28 y 21%, indicando que una mayor motilidad y viabilidad espermática post selección puede incrementar la tasa de fecundación y producción de blastocistos *in vitro*.

CONCLUSIÓN

El método de selección espermática utilizada, percoll 45/90 es eficiente para la separación de espermatozoides con velocidades rápidos medios, lentos y estáticos, siendo mayor la velocidad curvilínea y promedio.

REFERENCIAS

- Benon M, Linet T. Spermatique d`hiperactivation: Influence du milieu de capacitation. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;34: 488-492
- Gomendio M., A. F. Malo, J.Garde and E. R. Roldan. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction*. 2007,134:19–29
- Henkel R, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 108.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller, TR. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*, 2001; 22:104-10.
- Morrell J.M. and H. Rodriguez-Martinez. Practical Applications of SpermSelection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*. 2011, Article ID 894767, 9 pp.
- Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with percoll. *Biochem Biophys, Methods*. 2000; 44: 1-30.
- Ripamonte P, L. Garcia, S.Sanches, J. C. de Carvalho, G.K. Fonseca, Y. F. Watanabe, A. Rodrigues and F. Vieira. Differential gene expression and developmental competence in *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote* 2011, 1-10
- Samardzija M., M. Karadjole, M. Matkovic, M. Cergolj, I. Getz, T. Dobranic, A. Tomaskovic, J. Petric, J. Surina, J. Grizelj, T. Karadjole. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVE. *Animal Reproduction Science*, 2006, 91: 237–247
- Tardif S, Laforest J, Cormier N, Bailey J. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology* 1999; 52:447–59.
- Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology*, 2003, 24 790–803.

