

FUNCIONES DE LOS PRINCIPALES ADITIVOS UTILIZADOS EN EL PROCESO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO EN BOVINOS

UNIVERSIDAD DE
LA SALLE

Nataly Alfonso Avilán



Tutor: Dra.Liliana Chacón Jaramillo, MV, MSc, PhD

TABLA DE CONTENIDOS

1. Justificación
2. Objetivos
3. Introducción
4. Marco teórico
5. Conclusiones
6. Agradecimientos
7. Bibliografía

¿PORQUE HABLAR DE ADITIVOS PARA LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO*?

- ▶ Uso de las biotecnologías
- ▶ Preservar animales de alto valor genético
- ▶ Disminuir intervalo intergeneracional
- ▶ Optimizar el uso de las células sexuales
- ▶ Estrategias para mejorar los resultados y rentabilidad (30% – 40% PIV)

OBJETIVOS

► General

Comprender la interacción de los diferentes aditivos utilizados para la fertilización *in vitro*

► Específicos

Relacionar los eventos en la fertilización *in vivo* e *in vitro*

Presentar los efectos de los aditivos en el proceso de fertilización *in vitro*

Presentar la efectividad de los aditivos durante el proceso de la FIV con base a la revisión bibliográfica

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* (PIV)

¿Cuáles son los objetivos?

Promover el
mejoramiento
genético.

Multiplicar
ejemplares de
alto valor
productivo.

Disminuir el
intervalo
generacional.

Dar soluciones
a problemas
específicos de
infertilidad.

Mejoras en la
adaptabilidad
ambiental.

Optimizar la
utilización de
células
sexuales.

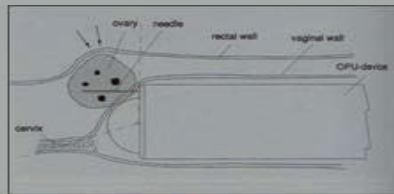
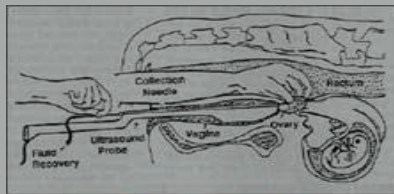
(Palma, 2008; Caicedo, 2011)

PASOS DE LA *PIV*

Recolección
de ovocitos

Vacas muertas

Vacas vivas



Etapas *in vitro*

Maduración

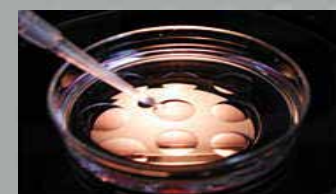
Fertilización

Cultivo

24 horas

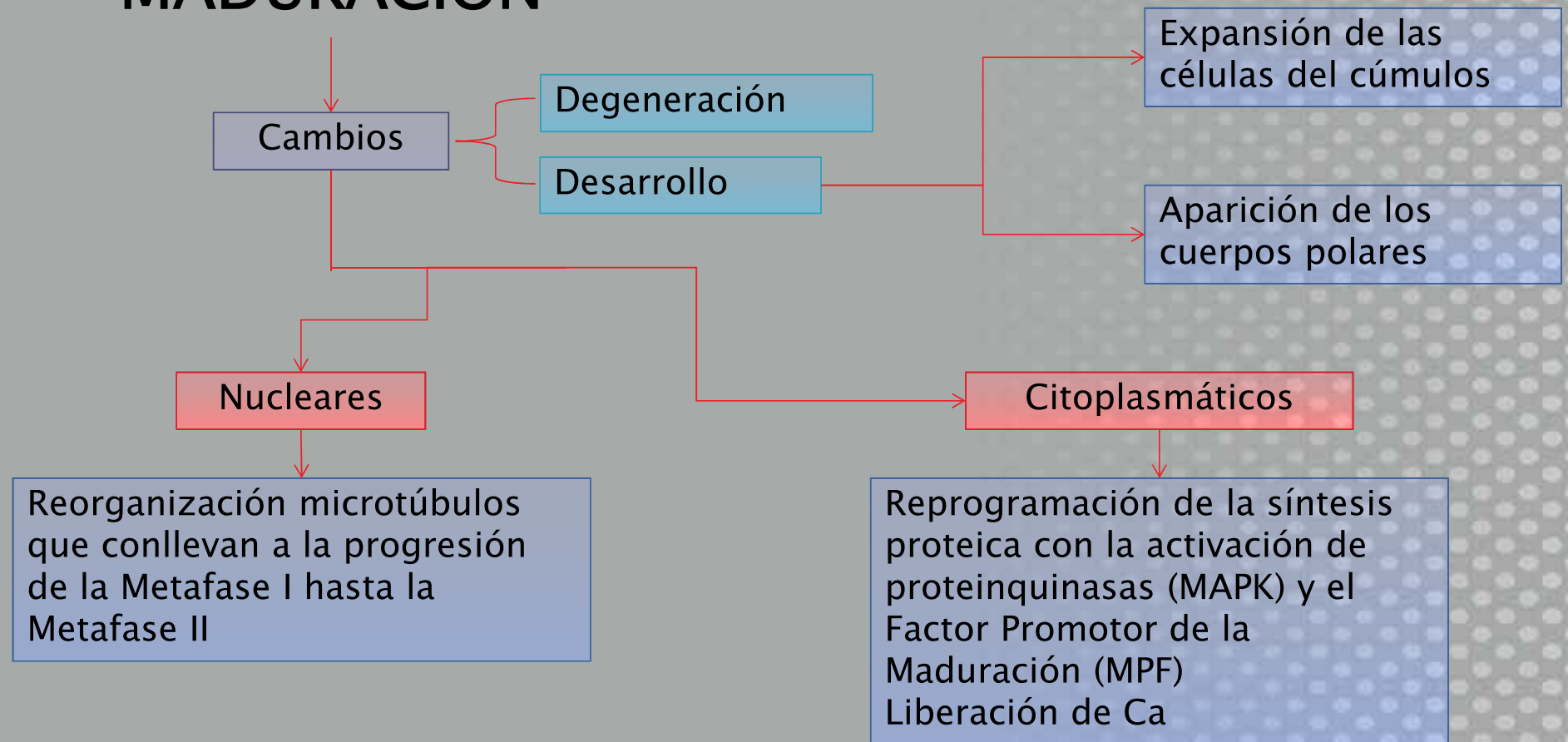
6 - 18 horas

7 días



(Palma, 2008)

MADURACIÓN



FERTILIZACIÓN *IN VITRO*



Seleccionar semen



Descongelar semen (35°C - 30seg)



Depositar en tubo eppendorf con medio de capacitación



Centrifugar durante 5 minutos a 3000 gravedades



Retirar sobrenadante



Centrifugar nuevamente durante 5 minutos a 3000gravedades



Retirar el sobrenadante, dejar únicamente pellet



Adicionar medio de fertilización



Revisar calidad del semen



inseminar

Preparación del semen

CONDICIONES DEL CULTIVO

Desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocito

Proporcionan los requerimientos metabólicos y bioquímicos al embrión

Agua ultra
pura (99% del
medio)

Osmolaridad
adecuada
(270 – 300
mOsm)

Temperatura
38.5°C

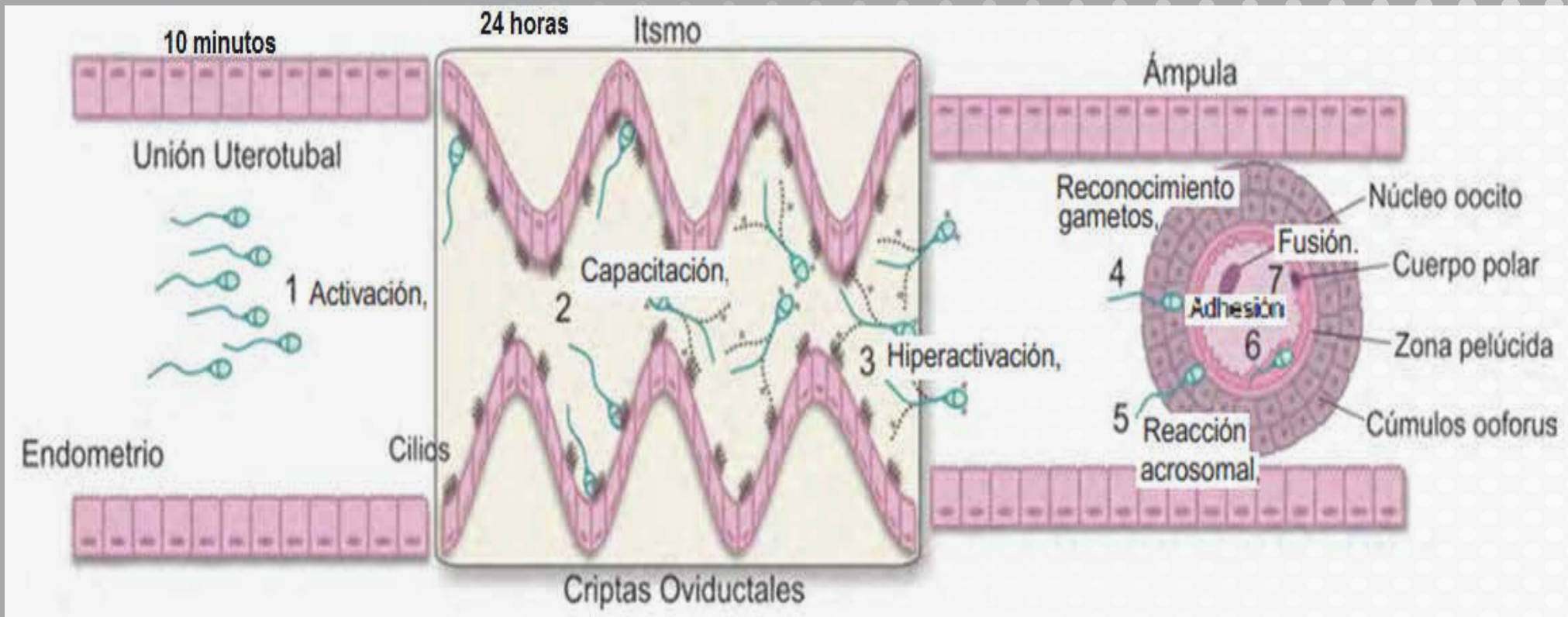
Aminoácidos =
fuentes de
energía -
regulación de
pH -
precursores de
proteínas y
ácidos
nucleicos

pH optimo
7.2 – 7.4

ROS (O_2 – H_2O_2)
Antioxidantes
(SOD – GPX –
taurina e
hipotaurina,
glutatión,
piruvato,
Vitaminas C, E, A)

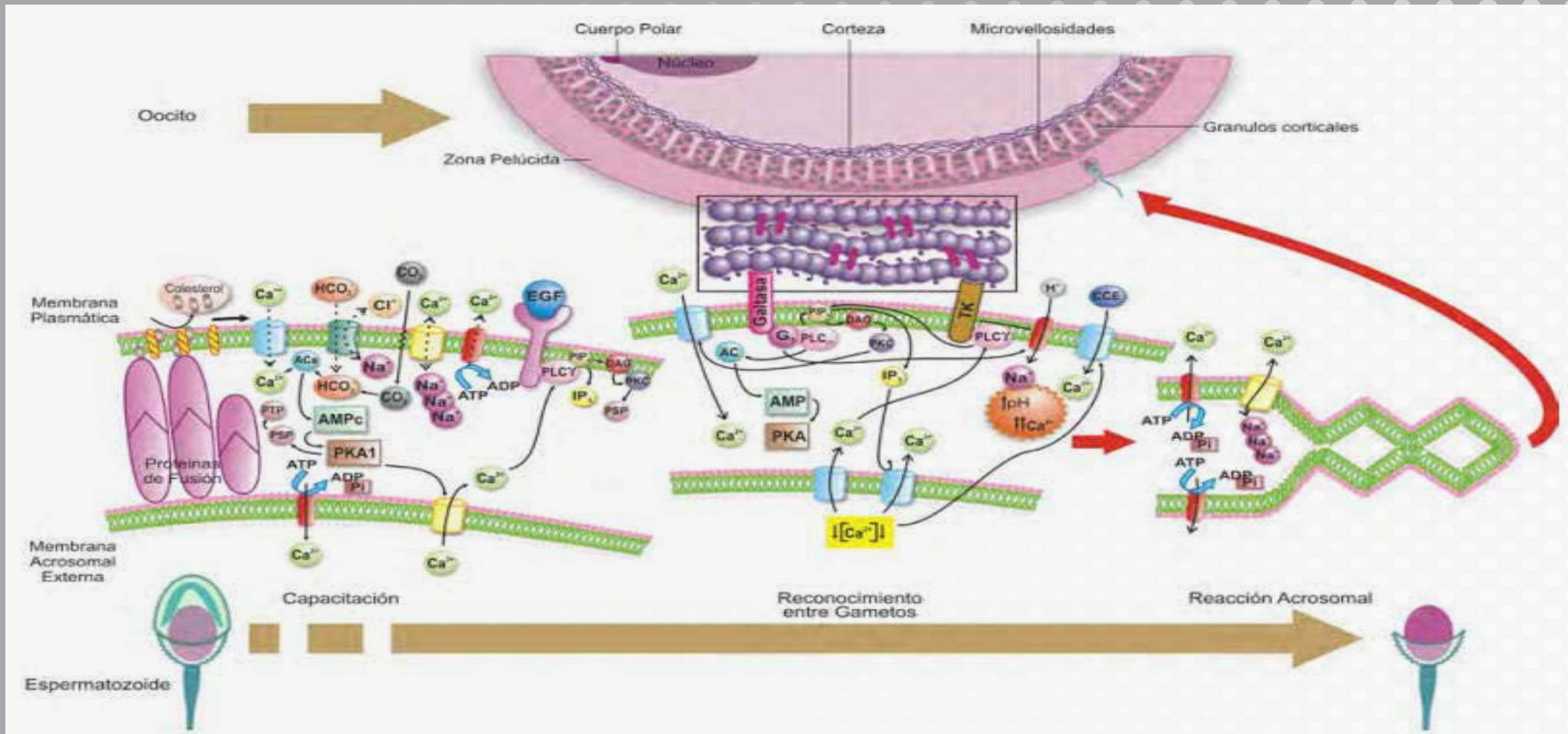
(Palma, 2008)

FERTILIZACIÓN IN VIVO



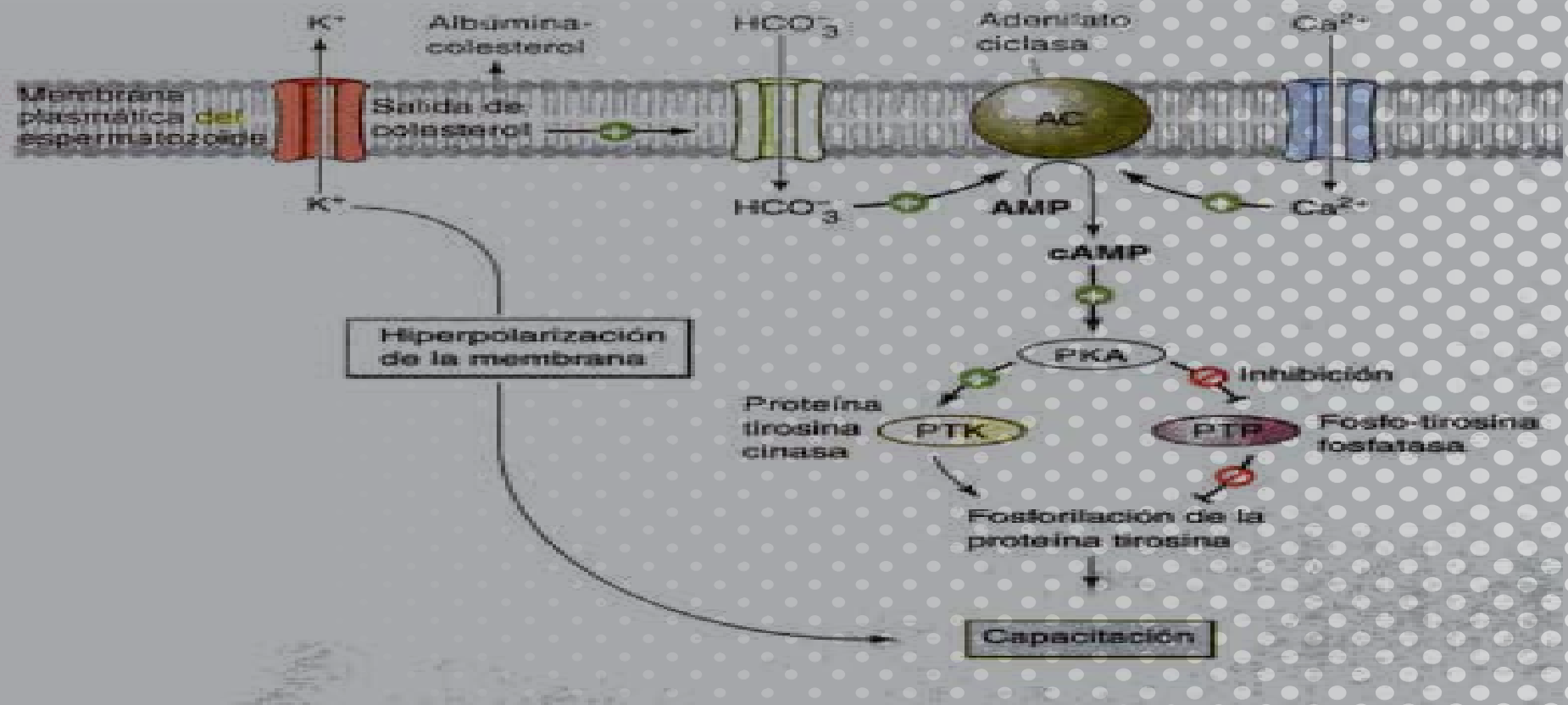
(Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006; Rath, Schuberth, Coy, & Taylor, 2008)

EVENTOS MOLECULARES INTRAUTERINOS EN LA FERTILIZACIÓN

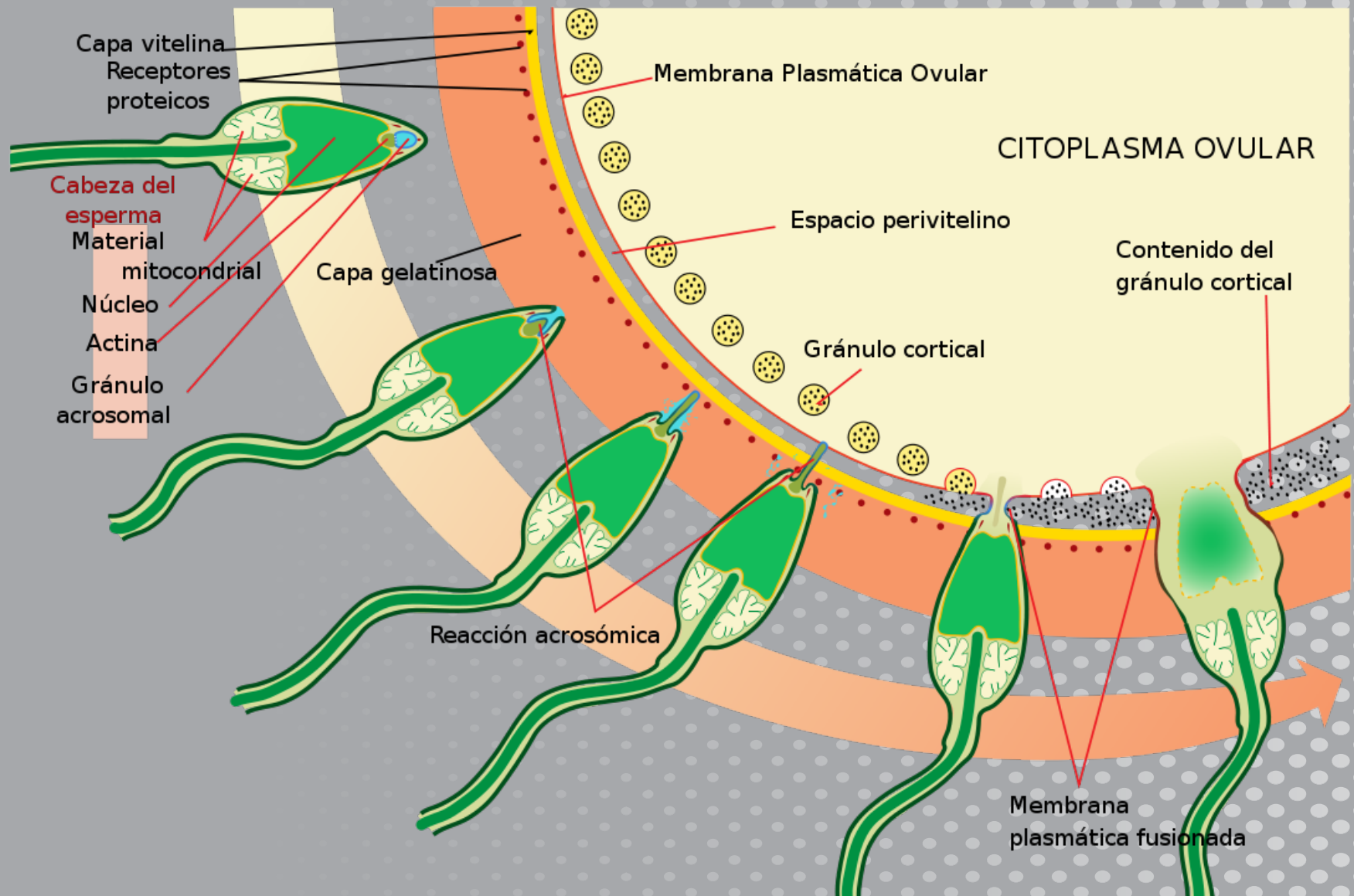


(Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006)

EVENTOS MOLECULARES QUE LLEVAN A LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE



REACCIÓN ACROSÓMICA



ADITIVOS

HEPARINA

Uno de los componentes de las secreciones uterinas y tubaricas, permite la entrada de calcio.

↑ la [] intracelular de Ca.

↑ la síntesis de AMPc.

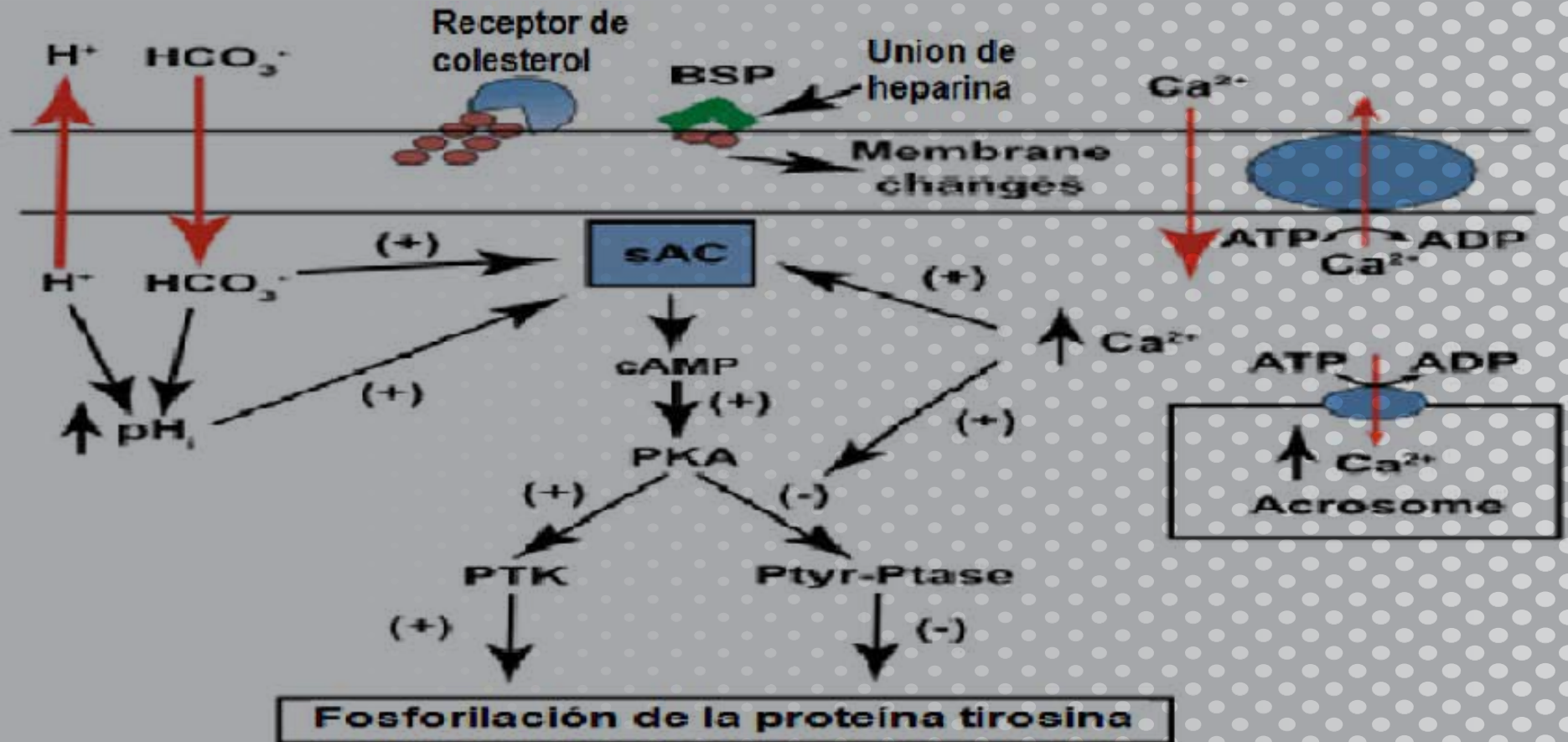
↑ pHi.

↑ la fosforilación de tirosinas proteicas.

Mejora la tasa de fertilización al cabo de una hora de incubación .

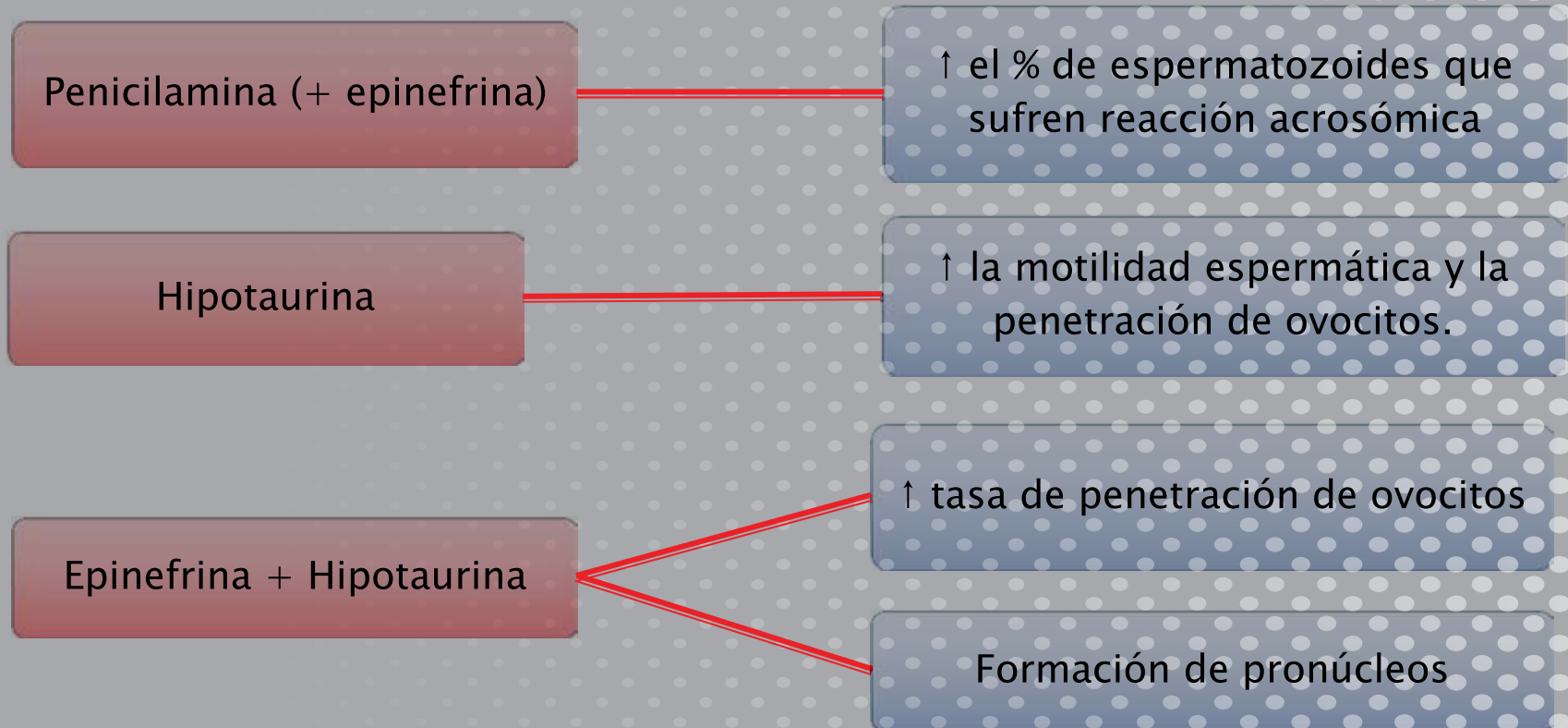
(Benavides, 2010; Parrish, Susko-Parrish, Winer, & First, 1988)

HEPARINA



(Parrish, 2014)

PENICILAMINA + HIPOTAUURINA + EPINEFRINA (PHE)



(Kang, Huang, Yanagawa, & Nagano, 2015)

Journal of Reproduction and Development, Vol. 61, No 2, 2015

—Original Article—

Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts *in vitro*

**Sung-Sik KANG¹⁾, Keisuke KOYAMA²⁾, Weiping HUANG¹⁾, Yinghua YANG¹⁾,
Yojiro YANAGAWA¹⁾, Yoshiyuki TAKAHASHI^{1, 3)} and Masashi NAGANO¹⁾**

Table 1. The effects of the PHE mixture and sperm concentration on sperm penetration rate at 18 h after IVF using medium including theophylline

Bulls	Sperm concentration ($\times 10^6$ cells/ml)	PHE	No. of oocytes (Replicates)	Percentages of			
				Total penetration	2PN	Poly	Others*
A	1	+	31 (3)	100.0 ^a	74.2	9.4 ^{ab}	16.4 ^a
		–	31 (3)	84.2 ^b	75.1	0 ^b	9.1 ^{ab}
	2	+	31 (3)	97.0 ^{ab}	68.2	13.0 ^{ab}	15.8 ^a
		–	31 (3)	96.7 ^{ab}	77.0	10.0 ^{ab}	9.7 ^{ab}
	5	+	42 (3)	97.8 ^{ab}	75.9	21.8 ^a	0 ^b
		–	37 (3)	100.0 ^a	87.0	13.0 ^{ab}	0 ^b
B	1	+	31 (3)	95.8 ^a	78.7 ^a	4.2 ^a	13.0 ^a
		–	32 (3)	59.4 ^b	50.0 ^b	0 ^a	9.4 ^{ab}
	2	+	34 (3)	93.9 ^a	82.5 ^a	11.5 ^{ab}	0 ^b
		–	33 (3)	97.0 ^a	84.8 ^a	6.4 ^a	5.8 ^{ab}
	5	+	31 (3)	100.0 ^a	73.6 ^{ab}	23.0 ^b	3.3 ^{ab}
		–	42 (4)	95.0 ^a	81.7 ^a	9.2 ^{ab}	4.2 ^{ab}
C	1	+	40 (3)	81.7 ^{ab}	73.3 ^{ab}	3.3 ^a	5.0 ^{ab}
		–	40 (3)	69.5 ^a	49.0 ^b	6.7 ^a	13.8 ^a
	2	+	51 (4)	97.9 ^c	82.4 ^a	15.7 ^{ab}	0 ^b
		–	48 (4)	89.2 ^{bc}	79.2 ^{ab}	3.9 ^a	9.4 ^{ab}
	5	+	35 (3)	97.0 ^{bc}	53.6 ^b	30.6 ^b	12.8 ^a
		–	32 (3)	100.0 ^c	80.8 ^a	15.9 ^{ab}	3.3 ^{ab}

a, b, c Values with different letters within each bull differ significantly ($P < 0.05$). *Others: an enlarged sperm head with an anaphase II/telophase II chromosome or a male pronucleus was observed. 2PN, two pronuclei; poly, penetrated with more than two sperm.

(Kang, Huang, Yanagawa, & Nagano, 2015)

TEOFILINA

PHE + teofilina: Acelera la motilidad espermática y la penetración espermática.



La teofilina activa la motilidad del espermatozoides con el aumento de AMPc intracelular.



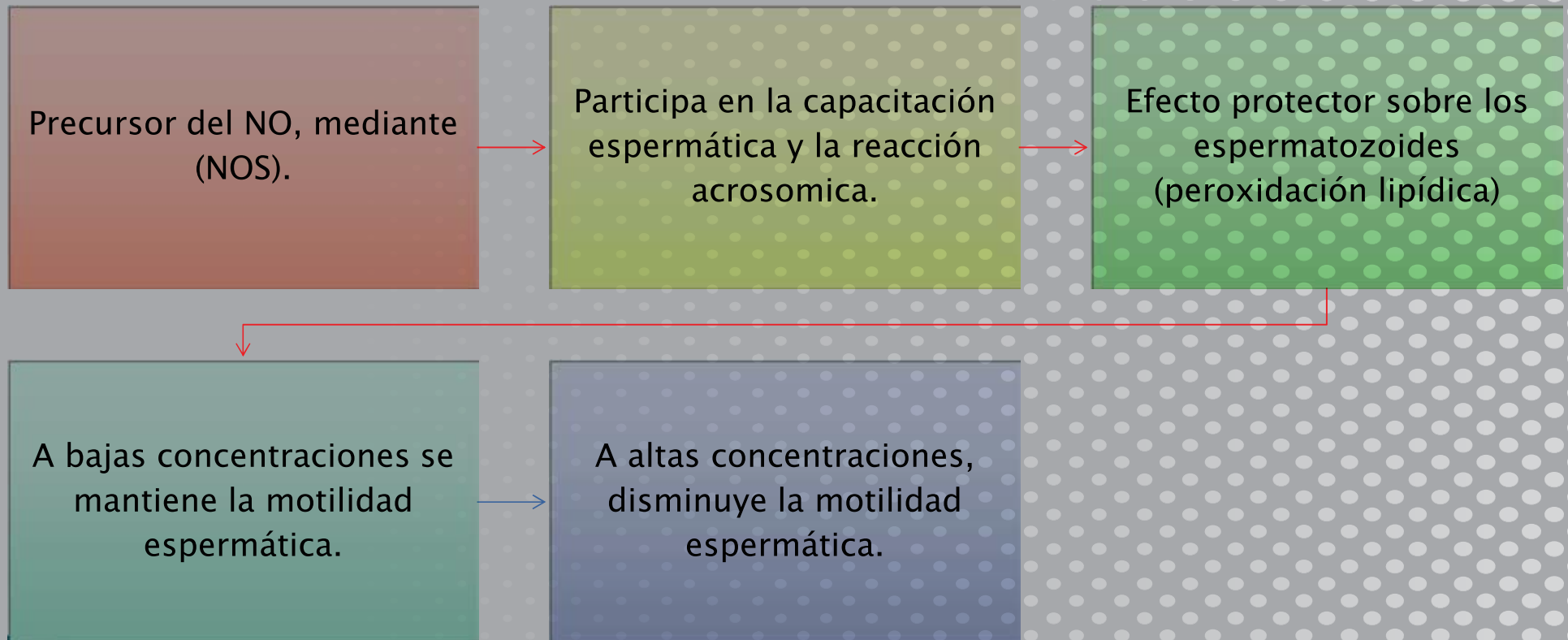
PHE previene un aumento AMPc y mantiene la motilidad del espermatozoides sin hiperactivación.



PHE + teofilina para la FIV

a una concentración de espermatozoides de 2×10^6 células/ml, da como resultado una fecundación normal, estable y un desarrollo de blastocito de cualquier toro.

L – ARGININA





Available online at www.sciencedirect.com



Biochimica et Biophysica Acta 1674 (2004) 215–221



L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa

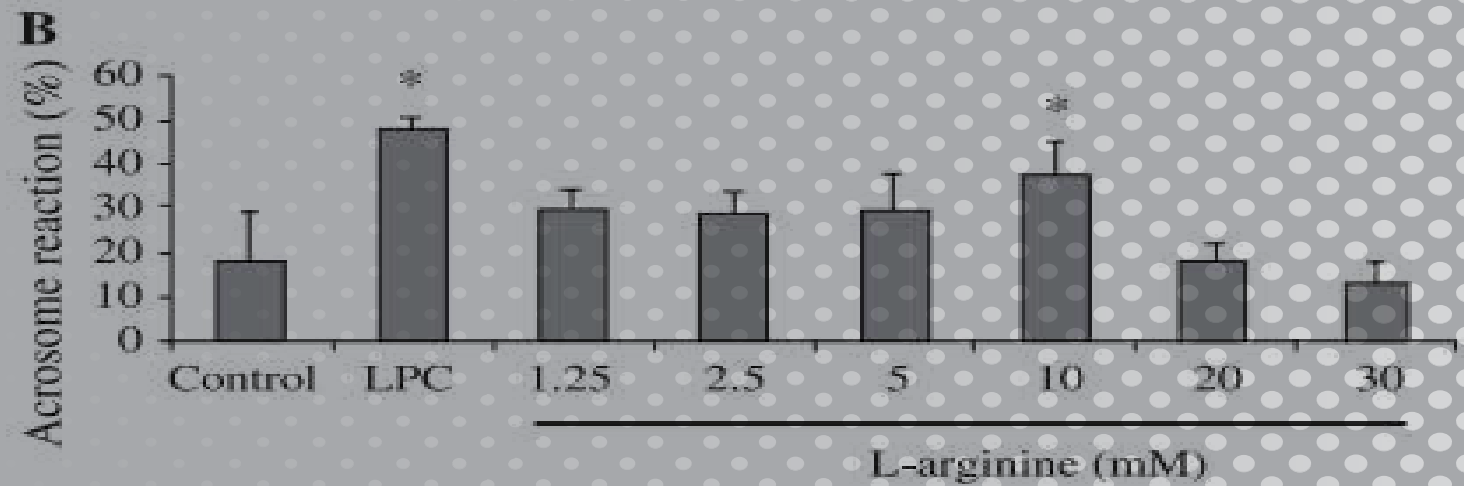
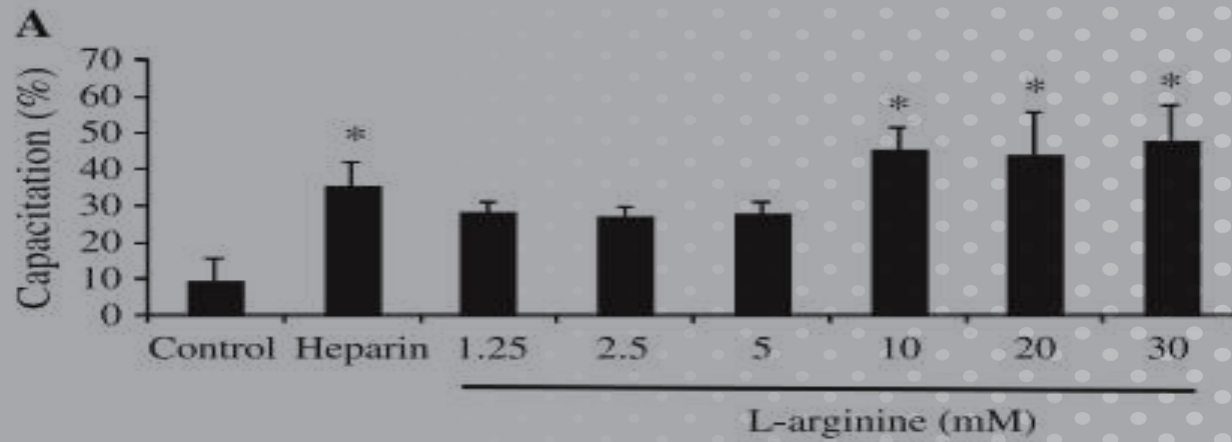
Cristian O'Flaherty^{a,*}, Pablo Rodriguez^a, Sudha Srivastava^b

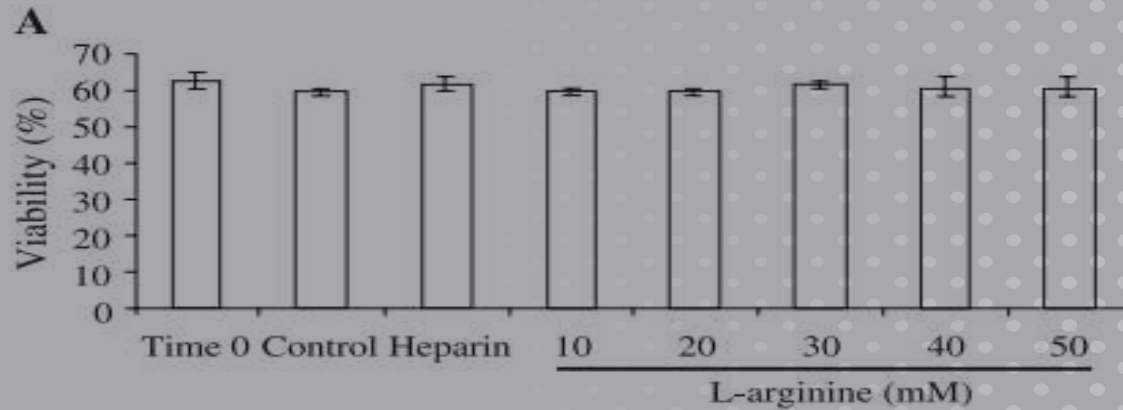
^a*Biochemistry Area, School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires, Av. Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina*

^b*National Facility for High Field NMR, Tata Institute of Fundamental Research, Homi Bhabha Road, Mumbai-400005, India*

Received 20 October 2003; received in revised form 22 June 2004; accepted 24 June 2004

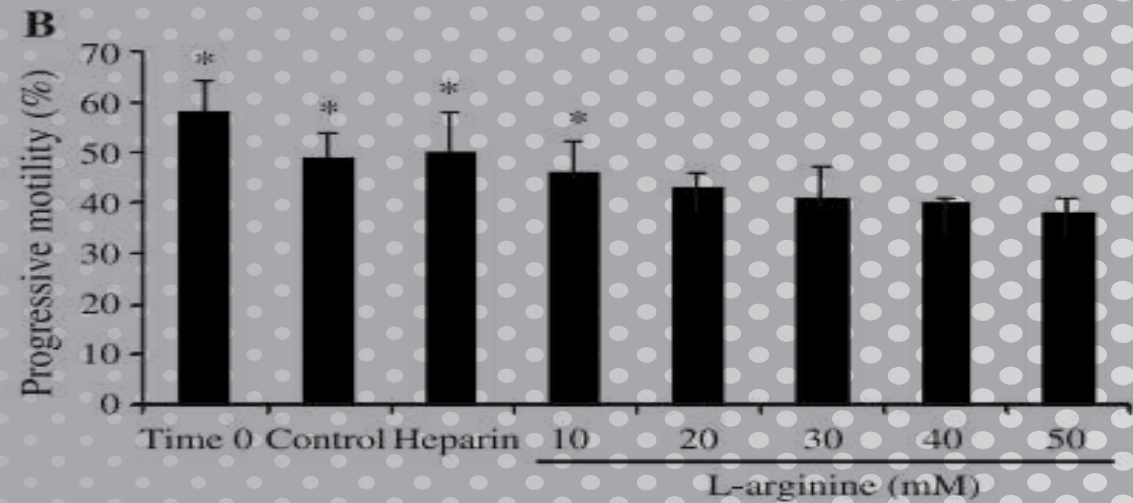
Available online 23 July 2004





Incubación del grupo control
durante 45 minutos con heparina
a razón de 10UI/mL

Diferentes concentraciones de L-
Arginina (10 a 50mM)



CONCLUSIONES

- ▶ La existencia de una composición bioquímica similar en la fertilización *in vivo* e *in vitro*, permite comprender la favorable interacción de los aditivos en el proceso de FIV
- ▶ Bajo la influencia de la PHE hay una mayor penetración de los ovocitos y formación de pronúcleos.
- ▶ Aditivos como la PHE, Heparina y L – Arginina favorecen los procesos de capacitación y reacción acrosómica, incrementando la producción de embriones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

- ▶ En primer lugar a Dios, a mi Familia por el apoyo incondicional.
- ▶ A la Doctora Liliana Chacón por su orientación en este proceso de culminación de la etapa académica.
- ▶ A el maravilloso equipo de trabajo de Embriogen S.A. por contribuir con mi crecimiento profesional y personal.
- ▶ A mis compañeros con quienes pude compartir y discutir conocimientos y formas de aprendizaje.
- ▶ A la universidad de La Salle por haberme permitido hacer parte de tan maravillosa institución y guiarme para cumplir uno de mis sueños.

GRACIAS

BIBLIOGRAFÍA

- Benavides Torres, R. D. (2010). Evaluación de tres protocolos de capacitación espermática bovina in vitro a través de la penetración oocitaria. Recuperado a partir de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6002/T14.08%20B431e.pdf?sequence=1>
- Caicedo, J. E. (2011). Aplicación de la aspiración folicular-fertilización in-vitro en bovinos y factores que pueden afectar su eficiencia. Recuperado a partir de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/1146/T77.08%20C12a.pdf?sequence=1>
- Gonçalves FS, B. L., Arruda RP, P. S., & Mingoti GZ. (2014). Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50(1), 39-47.
- K. L. Moore, & T. V. Persaud, (2008). *Embriología Clínica* (pág. 44). Barelona, España: ELSEVIER.
- Kang SS, K. K., Huang W, Y. Y., Yanagawa Y, T. Y., & Nagano M. (2015). Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. *J Reprod Dev*, 61(2), 99-105.
- Oflaherty, C., Rodriguez, P., & Srivastava, S. (2004). -Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1674(2), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.06.020>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Palma, G. (2008). *Biotechnología de la Reproducción*. Mar de plata: REPROBIOTEC.
- Parrish JJ. (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67-73.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*, 38(5), 1171-1180.
- Rath, D., Schuberth, H., Coy, P., & Taylor, U. (2008). Sperm Interactions from Insemination to Fertilization: Sperm Interactions. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 2-11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01250.x>
- Santana, P. D. P. B., Silva, T. V. G., da Costa, N. N., da Silva, B. B., Carter, T. F., Cordeiro, M. da S., ... Miranda, M. dos S. (2014). Supplementation of bovine embryo culture medium with L -arginine improves embryo quality via nitric oxide production: L -A RGININE I MPROVES E MBRYO Q UALITY. *Molecular Reproduction and Development*, 81(10), 918-927. <https://doi.org/10.1002/mrd.22387>
- Scott F, G. (2005). *Biología del desarrollo*. Buenos Aires – Argentina: MÉDICA PANAMERICANA S.A
- Senger, P. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition*. Washington State University: Current Conceptions, Inc.