

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Departamento de Ciencias Pecuarias



**DESARROLLO DE UN TEST DE PENETRACION ESPERMATICA MULTIPLE
EN ZONAS PELUCIDAS INTACTAS CONSERVADAS EN SOLUCIONES
SALINAS HIPERTONICAS, EN BOVINOS.**

MEMORIA DE TITULO PRESENTADA
A LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS PARA OPTAR AL
TITULO DE MEDICO VETERINARIO.

BEATRIZ IVONNE GONZALEZ SALAS
CHILLAN – CHILE
2008

V. RESUMEN

DESARROLLO DE UN TEST DE PENETRACION ESPERMATICA MULTIPLE EN ZONAS PELUCIDAS INTACTAS CONSERVADAS EN SOLUCIONES SALINAS HIPERTONICAS, EN BOVINO.

El test de penetración espermática múltiple de zonas pelúcidas se basa en la inactivación de oocitos mediante la solución hipertónica STORE-UDEC, que aumenta el espacio perivitelino y neutraliza la reacción de zona, permitiendo cuantificar espermatozoides en el espacio perivitelino y aumentar la sensibilidad de los estudios destinados a evaluar la fertilidad potencial de machos y eyaculados.

Zonas pelúcidas obtenidas de oocitos madurados *in vitro*, fueron coincubadas con espermatozoides expuestos a condiciones de capacitación y dejados interactuar por 18 horas a 38,5°C y 5 %CO₂ en aire. Luego las zonas fueron limpiadas mecánicamente, de espermatozoides adheridos y aquellos que penetraron el espacio perivitelino fueron cuantificados rotándolas en un portaobjeto excavado bajo microscopía de contraste de fase diferencial. Se evaluó el efecto del tiempo de incubación de zonas pelúcidas (0,6 y 18 horas), la concentración de heparina en la incubación (0, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) y el grado de maduración de los oocitos (VG, MI y MII) sobre la eficiencia de penetración espermática.

La evaluación de la eficiencia de penetración espermática se hizo en términos de tasas de penetración espermática y número de espermatozoides en el espacio perivitelino (spz en EPV); el tiempo de incubación de zonas pelúcidas mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre 0 hr=60% (3,8 spz en EPV) v/s 6 hrs=97,1% (9 spz en EPV) y 18 hrs=100% (7,9 spz en EPV). La heparina en diferentes concentraciones no incide en la eficiencia de la penetración espermática 0µg/mL=81,3% (4,7 spz en EPV), 10µg/mL=79,5% (5,6 spz en EPV), 25µg/mL=90,5% (4,9 spz en EPV), 50µg/mL=83,6% (5,3 spz en EPV), 100µg/mL=83,6% (5,3 spz en EPV), y en la evaluación individual de toros se obtuvo similares resultados. En la evaluación del grado de maduración de oocito se evidenció el efecto de la maduración *in vitro* en términos de espermatozoides en el espacio perivitelino VG=78,5% (5,8 spz en EPV), MI=73,3% (6,6 spz en EPV) y MII=97,6% (9,1 spz en EPV).

Palabras claves: salt-stored, zona pelúcidas, fecundación *in vitro*

VI. SUMMARY

FACTORS AFFECTING THE MULTIPLE SPERM PENETRATION ASSAY IN SALT-STORED ZONE PELLUCIDA, IN BOVINE.

The multiple sperm penetration assay, is based on the inactivation of oocytes by using the hypertonic solution STORE-UDEC, that increases perivitelline space (PVS) and it neutralizes zone reaction; it allows the sperm quantification and increases the sensibility of studies directed to evaluate the potential fertility of males and ejaculated.

Zones pellucida obtained from matured oocytes were coincubated with spermatozoa for 18 hours at 38,5°C and 5 %CO₂ in air. Then the zones were mechanical cleaned of spermatozoa attached and those that penetrated to the perivitelline space were quantified under Hoffman phase contrast using an inverted microscope. The effect of incubation period of zones pellucida (0, 6 and 18 hours), heparin concentration in the incubation medium (0, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) and the degree of oocyte maturation (VG, MI and MII) on the efficiency of sperm penetration.

The time of incubation of zones pelúcidas showed significant effect on sperm penetration ($P < 0,05$) between 0 hours =60% (3,8 spz in PVS) v/s 6 hours = 97,1% (9 spz in PVS) and 18 hours=100% (7,9 spz in PVS). While the heparin concentration did not affected in the efficiency of sperm penetration: 0µg/mL = 81,3% (4,7 spz in PVS), 10µg/mL = 79,5% (5,6 spz in PVS), 25µg/mL = 90,5% (4,9 spz in PVS), 50µg/MI = 83,6% (5,3 spz in PVS), 100µg/mL = 83,6% (5,3 spz in PVS). In the evaluation of the degree of oocyte maturation effected efficiency of sperm penetration in terms of number of spermatozoa in the perivitelline space VG = 78,5% (5,8 spz in PVS), MI = 73,3% (6,6 spz in PVS) y MII = 97,6% (9,1 spz in PVS).

Key words: Salt-stored, zone pellucida, in vitro fertilization.