



## Aspectos relacionados con la fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos, una revisión bibliográfica

Related aspects of *in vitro* fertilization (IVF) in cattle, a bibliographic review

Pablo Aragonés Vargas<sup>1</sup>, Ignacio Bermúdez Fernández<sup>2</sup>, Ignacio Ortiz Cardenas<sup>3</sup>, Josette Sánchez Alpízar<sup>4</sup>, Mónica Madrigal-Valverde<sup>5</sup>

### Palabras clave

*Bovinos, fertilización in vitro, FIV, capacitación espermática, reacción acrosoma, viabilidad espermática, maduración ovocitaria, maduración embrionaria.*

### Resumen

La fertilización *in vitro* es una técnica cada vez más aceptada y utilizada por los laboratoristas, con el fin de producir animales que alcancen los estándares del productor. El objetivo de esta revisión fue examinar la información más reciente, publicada en medios electrónicos, sobre la maduración ovocitaria y embrionaria, así como sobre la capacitación espermática durante el proceso de fertilización *in vitro*. En los últimos años, la fertilización *in vitro* ha experimentado un importante desarrollo en cuanto a conocimiento, técnicas y procedimientos, mejorando significativamente su efectividad. Se describen técnicas como la maduración embrionaria *in vitro*, guiadas a obtener embriones de alta calidad, y se evalúan las variables y factores que posibilitan a que dicha técnica tenga éxito, tales como el uso de suero sanguíneo, aminoácidos, piruvatos, lactatos adicionados al medio como fuente de proteínas, energía, entre otros. Así mismo, se describe el proceso de capacitación espermática, siendo este de gran importancia en programas de fertilización *in vitro*, así como complejo de conseguir en condiciones *in vitro*, por lo que se examinan diferentes técnicas y métodos que promueven su éxito.

### Key words

*Bovines, in vitro fertilization, IVF, sperm capacitation, acrosomal reaction, sperm variability, oocyte maturation, embryo maturation.*

### Abstract

*In-vitro* fertilization is a technique that is increasingly accepted and used by laboratory workers, in order to produce animals that meet the producer's standards. The objective of this review was to examine the most recent information available in electronic media, about oocyte and embryo maturation, as well as sperm capacitation during the *in vitro* fertilization process. In recent years, *in vitro* fertilization has undergone significant development in terms of knowledge, techniques and technologies, significantly improving its effectiveness. Techniques such as *in vitro* embryo maturation are described, aimed at obtaining high-quality embryos, and the variables and factors that make it possible and successful are evaluated, such as the use of blood serum, amino acids, pyruvates, lactates added to the medium as a source of protein, energy, among others. Likewise, the sperm capacitation process is described, being this of great importance in *in vitro* fertilization programs, as well as complex to achieve in *in vitro* conditions, for which reason different techniques and methods that promote their success are examined.

- 1 Ing. Agrónomo, pablodx15@gmail.com
- 2 Estudiante Escuela de Agronomía, CTL-SC ITCR, josei.bermudez94@gmail.com
- 3 Estudiante Escuela de Agronomía, CTL-SC ITCR, ortizcardenasignacio@gmail.com
- 4 Estudiante Escuela de Agronomía, CTL-SC ITCR, josette2333@gmail.com
- 5 Área Académica Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, CTL-SC-ITCR, [mmadrigal@itcr.ac.cr](mailto:mmadrigal@itcr.ac.cr)

Recibido: Enero del 2021  
Aceptado: Octubre del 2021  
Publicado: Diciembre del 2022  
DOI: 10.18860/rath.v3i1.6507

## Introducción

La producción *in vitro* de embriones bovinos es una biotecnología reproductiva de gran impacto en los sistemas ganaderos. Como técnica tuvo su origen en la década de los años setenta del siglo pasado, en los Estados Unidos [1] generando un amplio interés y un aumento significativo de la demanda de embriones a nivel mundial, lo que ha llevado a que los procedimientos asociados a esta técnica hayan evolucionado a pasos agigantados en los últimos treinta años [2], gracias a los avances en el desarrollo de nuevas biotecnologías encaminadas a la reproducción asistida en humanos y a la manipulación genética y reproductiva de especies animales, especialmente de mamíferos [3]. La buena aceptación e implementación de estas metodologías por parte de los productores de muchos países ha permitido aumentar considerablemente el hato bovino a nivel mundial. En el 2016, el número de embriones bovinos viables producidos *in vitro* superó al número de embriones producidos *in vivo*, que fueron transferidos a receptoras en todo el mundo [4].

El objetivo de esta revisión fue examinar la información más reciente, publicada en medios electrónicos, sobre procesos de gran importancia en el éxito de la fecundación *in vitro* en bovinos, como lo son la maduración ovocitaria y embrionaria, así como la capacitación espermática y la reacción acrosomal. Las técnicas de maduración *in vitro* del ovocito deben asegurar que el ovocito sea capaz de ser fecundado dando origen a un cigoto competente, que logre desarrollarse luego de ser trasplantado [5]; mientras que la capacitación espermática y la reacción del acrosoma se encuentran dentro de los eventos claves que regulan la fecundación, dado que los espermatozoides eyaculados no tienen capacidad de fecundar al ovocito hasta después de un cierto período de tiempo de permanecer en el tracto reproductivo femenino [5].

## Metodología

Los documentos incluidos en la presente revisión fueron recopilados a partir del recurso electrónico de bases suscritas al sitio web de la biblioteca del Instituto Tecnológico de Costa Rica y el material disponible en la web [www.scholar.google.com](http://www.scholar.google.com). Esta revisión bibliográfica se encuentra dividida en varias secciones. Inicialmente, se incluyen diversos

conceptos relacionados al proceso de fertilización *in vitro*, para ello se detallan los siguientes conceptos: fertilización *in vitro*, maduración ovocitaria y maduración embrionaria *in vitro*, medios de cultivo *in vitro* para desarrollo embrionario y función de la zona pelúcida en la implantación del embrión, así mismo se incluyen algunos de los factores que son relevantes para estos procesos. Posteriormente, se define el concepto de capacitación espermática y se detallan los procedimientos requeridos para efectuar las técnicas de capacitación espermática. Finalmente, se explica la relación entre la reacción acrosomal y la viabilidad espermática.

## Resultados

### Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización *in vitro* (FIV) es una técnica empleada en la medicina humana [6] y en la de las especies domésticas [7] tales como ovinos [8, 9], equinos [10, 11] y bovinos [12], siendo modelos de investigación para el semen bovino las células de roedores [13] y porcinos [14]. La técnica de FIV se basa en la maduración artificial de células germinativas no fecundadas de la hembra llamados oocitos, que pueden ser recolectados de los ovarios de vacas sacrificadas en una planta de cosecha, por ejemplo, para fines de investigación o bien puede realizarse la colecta *in vivo* mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido de donadoras vivas. Posteriormente, los oocitos son fecundados con espermatozoides crío-conservados previamente capacitados [15], los cuales deben cumplir criterios de calidad de movimiento [16] y forma [17], asociados al desempeño de los mismos durante la capacitación espermática [18]. Cabe señalar que de este proceso se obtienen embriones en la etapa de cigotos, los cuales son incubados hasta la etapa de blastocisto, siendo esto relevante debido a que esta técnica permite obtener un gran número de embriones en una etapa específica de desarrollo [19].

Los embriones resultantes del proceso FIV pueden ser utilizados en conjunto a otras biotecnologías, como lo son la transferencia de núcleos, clonación o inyecciones de material genético a otras células para la producción de embriones transgénicos, lo que resulta de gran importancia en las estrategias de reproducción [20]. Así mismo la técnica de

fertilización *in vitro* conlleva múltiples ventajas como lo son la producción de embriones con sexo conocido utilizando semen sexado, lo cual haría posible una racionalización de la explotación de hatos [16, 17]. Otra ventaja que genera esta clase de técnicas de reproducción animal es la producción de embriones de madres con un alto valor, pero que por alguna razón presentan algún problema reproductivo, como lo puede ser adherencias ováricas, baja respuesta ovulatoria, desarrollo de quistes, infecciones, entre otras [19].

### Maduración ovocitaria *in vitro*

La maduración ovocitaria conlleva una serie de procesos, que van desde la obtención de la materia prima, es decir el ovocito, hasta el medio utilizado para la maduración del ovocito una vez que este ha pasado por una previa selección y clasificación. La obtención de ovocitos se puede realizar de ovarios provenientes de una planta de matanza o bien de animales vivos mediante la técnica de aspiración folicular u “*ovum pick up*” (OPU) [21], en donde el animal es tratado con hormonas para lograr obtener una superovulación. Sin embargo, en ganado bovino dicho manejo hormonal ha variado, ya que actualmente se trabaja con la técnica de ovulación múltiple y transferencia de embriones frescos o criopreservados [22].

La clasificación de los ovocitos debe hacerse con base al *cumulus oophorus*, en donde esta idealmente debe tener cuatro o más capas de células compactas, con presencia de un citoplasma homogéneo que en su periferia presenta un color oscuro [22]. Existe un sistema de clasificación de los ovocitos según su calidad, que analiza como variables de calidad el número de capas de células que circunscriben al ovocito y la homogeneidad del citoplasma [22].

Una vez aspirados los ovocitos estos pasan por una fase de clasificación y selección, descartando todos aquellos que presenten algún tipo de daño y que en consecuencia no son considerados para la maduración, dado que son poco competentes [23]. En el proceso de selección y clasificación de los ovocitos se busca que estos presenten un citoplasma homogéneo y que cuenten con al menos tres capas de células alrededor (*cumulus oophorus*) [22, 23].

El fluido folicular aporta las condiciones ambientales ideales para el desarrollo folicular. Alteraciones en

este microambiente conduce a cambios en la composición del suero y del líquido folicular que desencadena una serie de factores de riesgo como lo es la reducción en el número de ovocitos, embriones y la calidad de estos dando como resultado una insuficiencia reproductiva [24]. Estos cambios en el microambiente del fluido folicular pueden estar asociados a elevadas concentraciones de ácidos grasos no esterificados, los cuales están asociados a un decrecimiento en la capacidad de desarrollo de los ovocitos, alterando la calidad y el metabolismo del futuro embrión [24].

A nivel *in vitro*, actualmente se cuentan con diferentes protocolos para llevar a cabo la maduración de los ovocitos, los cuales ofrecen un ambiente similar al que tendrían los ovocitos en condiciones *in-vivo* para llevar a cabo su desarrollo y maduración. Dentro de dichos protocolos de maduración ovocitaria, los más utilizados actualmente son el TCM-199, Whittens, Waymouth, TLP, entre otros [25].

### Maduración embrionaria *in vitro*

Los programas que se utilizan en procesos como la maduración *in vitro* (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) buscan obtener embriones que sean de alta calidad, es decir, que posean la capacidad de producir una gestación normal que conlleve al nacimiento de crías, a través del uso de animales receptores [26]. Para cumplir con estas expectativas, se realiza una evaluación de variables y factores que puedan ayudar a que dicha técnica tenga éxito, como lo es que sean de fácil acceso y que tengan un costo reducido respecto al medio de maduración, esto sin afectar la eficiencia de los resultados [26].

Dentro de los factores que pueden ayudar a que la técnica tenga mayor probabilidad de éxito se puede mencionar la adición de suero sanguíneo, el cual es utilizado como suplemento de los medios de maduración, ya que es una combinación altamente compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos esenciales y factores de crecimiento [27].

Otro factor que influye en el desarrollo embrionario *in vitro* es la energía. Algunas de las fuentes energéticas más utilizadas en los medios son el lactato, el piruvato y la glucosa. Antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando la utilización de

glucosa en estadios más avanzados del desarrollo [28, 29]. Por otra parte, incluir aminoácidos dentro del medio beneficia al embrión, ya que los mismos tienen como función la regulación del pH, síntesis de proteínas y sustratos energéticos [30].

En cuanto a la fase de maduración, cabe indicar que esta impacta en las fases sucesivas en los protocolos de fecundación *in vitro*, ya que si se da una adecuada maduración del ovocito, que sea sustentada en cambios moleculares a nivel citoplasmático y nuclear, se verán favorecidos los aspectos de fecundación y el desarrollo posterior de los cigotos [26].

Sustancias como las gonadotropinas hipofisarias tienen un rol muy importante con respecto a la regulación de la maduración de los oocitos [30]. Asimismo, la hormona folículo estimulante (FSH) actúa en la maduración *in vitro* mediante las células del cumulus, de esta manera se estimula la producción de ácido hialurónico y la expansión de estas células, facilitando así la capacitación espermática, mejorando la fertilización y el desarrollo embrionario [31].

### Medio de cultivo *in vitro* para desarrollo embrionario

Los resultados actuales de la producción *in vitro* de embriones son fruto de grandes cambios en los medios de cultivo originalmente usados, los cuales además de ser complejos, estaban suplementados con frecuencia con suero [31]. Durante décadas, se trabajó en el desarrollo de medios con mayor definición, en función de su efecto sobre el desarrollo embrionario, en aspectos como la sobrevivencia post crio-preservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables [31, 32]. Actualmente, los componentes de los medios de cultivo son parámetros biofísicos y elementos inorgánicos. Algunos de los componentes más importantes y que se deben controlar en los medios de cultivo embrionarios corresponden a osmolaridad, pH, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, fluido oviductal y agua [31] (Cuadro 1).

Por otro lado, se encuentran los elementos orgánicos. Dos de los componentes que resultan ser constantes para las formulaciones finales de los medios de cultivos utilizados en la producción *in vitro* de embriones corresponde a la fuente de energía y a la fuente de proteína.

- Fuentes de energía: el lactato, el piruvato y la glucosa [28, 29, 32], utilizados durante los primeros estadios, esto antes de la activación del genoma embrionario. Se menciona que los embriones hacen uso preferiblemente de piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía y de esta manera se ve un aumento considerablemente en la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo [29, 32].
- Fuente de proteína: se utilizan aminoácidos, siendo los elementos más importantes que participan en la regulación del desarrollo embrionario, son utilizados como fuente de energía, buffer intracelular [36] y en la síntesis de proteínas; asimismo se utilizan macromoléculas, es decir, se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) a los medios de cultivo embrionario como fuente de proteínas [32]. El suero bovino fetal (SBF) altera algunos parámetros de calidad embrionaria tales como el perfil de expresión génica, la criotolerancia, la acumulación de lípidos citoplasmática e el índice apoptótico, mientras que el suplemento de albúmina mejora estas características embrionarias [37].

A su vez, en los diluyentes para la maduración embrionaria se incluyen sales de cloro y sodio (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl, entre otras) [38].

### Función de la zona pelúcida en la implantación del embrión

La zona pelúcida es la membrana externa de glicoproteína que rodea al ovocito, y cuya función más importante es permitir la entrada de un solo espermatozoide para fecundar al óvulo. Mediante el mecanismo de la "eclosión", que involucra diversos procesos, el blastocisto se deshace de la zona pelúcida para implantarse en el útero materno, por lo que las anomalías intrínsecas (ya sea del blastocisto o de la zona pelúcida) resultan ser uno de los muchos factores que pueden limitar la eficiencia reproductiva [39]. Antes y después de la fertilización, la zona pelúcida actúa como barrera para evitar la polispermia (entrada de más de un espermatozoide dentro del óvulo), y protege al embrión contra la infiltración de leucocitos y microorganismos patógenos del aparato reproductor materno. La zona pelúcida

**Cuadro 1.** Componentes de los medios de cultivo requeridos para el desarrollo embrionario en procesos de fertilización *in vitro*.

**Table 1.** Components of culture media for embryonic development in *in vitro* fertilization processes.

Componente	Rango óptimo	Observación	Fuente
Osmolaridad	280 ± 20 mOsm/Kg	Del mismo modo valores que se encuentren alrededor de 245 mOsm/Kg podrían favorecer el desarrollo embrionario.	[31, 33]
pH	7,2 y 7,6	Mayoría de los embriones de mamíferos que son cultivados en condiciones <i>in vitro</i> pueden desarrollarse a un pH neutro, o bien, ligeramente alcalino	[31, 32]
CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub> , 90% N <sub>2</sub> y 5% CO <sub>2</sub> para maduración ovocitaria y fertilización 5% CO <sub>2</sub> en aire para desarrollo embrionario	La fase gaseosa, que es la más utilizada, es la que se encuentra constituida por 5% CO <sub>2</sub> .	[31, 32]
Fluido oviductal	Bajos niveles de Na y altos niveles de K (bovinos) en comparación con los niveles plasmáticos.	Tanto el Na como el K son balanceados a la hora de formular los medios de cultivo.	[31, 32]
Agua	Obtenida por sucesivas destilaciones, o bien, las producidas por sistemas de purificación que hacen uso del principio de ósmosis reversa.	Este es el componente que interviene en mayor proporción en cuanto a la formulación del medio de cultivo; su grado de pureza se encuentra relacionado con el desarrollo embrionario.	[31, 34, 35]

también mantiene el orden y el acomodo celular, esto en el embrión temprano, con el fin de tratar de asegurar su desarrollo después de la fecundación [39].

En la fertilización *in vitro*, la eclosión asistida consiste en crear artificialmente un orificio en la zona pelúcida del embrión para facilitar el proceso natural de eclosión [39]. Cabe mencionar que los embriones implantados en zonas pelúcidas adelgazadas tienen mayor tasa de implantación, que aquellos en zonas pelúcidas más gruesas [39].

### Capacitación espermática

La capacitación espermática es un proceso de gran importancia en programas de fertilización *in vitro*, dado que los espermatozoides eyaculados no tienen capacidad de fecundar al ovocito hasta después de un cierto período de tiempo de permanecer en el tracto reproductivo femenino, que en los bovinos se estima en aproximadamente cuatro horas [4].

De manera general, en el proceso de capacitación espermática se generan una serie de cambios fisiológicos en el espermatozoide, los cuales le permiten fertilizar al ovocito. Uno de los principales cambios corresponde a la alteración bioquímica de la membrana plasmática, lo cual incluye la retirada o alteración de glicoproteínas periféricas que provienen del plasma seminal, así como modificaciones en los fosfolípidos de membrana, todo ello bajo la influencia del ambiente al que está expuesto el espermatozoide [40].

En el caso particular de bovinos, se han empleado compuestos como heparina, bicarbonato de sodio, cafeína y adenosina, para la activación de los espermatozoides [38, 40]; además, se ha encontrado que el incremento en la concentración de bicarbonato de sodio en el diluyente provoca la disminución de la motilidad progresiva espermática [31]. Por otra parte, la integridad del acrosomo es indiferente al emplear compuestos como bicarbonato de sodio, heparina, adenosina, cafeína o anión superóxido [31]. En el caso de la heparina se

ha demostrado que evita la formación de coágulos en la solución espermática mejorando la capacidad fecundante de los espermatozoides, su efecto anticoagulante se da como resultado de la unión entre la heparina y residuos de sulfatos; removiendo a su vez factores incapacitantes adheridos a la membrana plasmática del espermatozoide tales como la calmodulina [41].

La heparina corresponde a un glicosaminoglicano altamente sulfatado que tiene un efecto positivo sobre la capacitación, este mismo es considerado como el inductor más potente de la reacción acrosómica; además, la heparina genera un aumento en el número de embriones producidos *in vitro*, tanto en semen fresco como descongelado [42], lo anterior puede deberse a que el uso de heparina incrementa la tasa de clivaje en el embrión [20, 31]. La concentración de heparina considerada como óptima para ser utilizada para la inducción *in vitro* de la capacitación espermática en bovino es muy variable [38, 40].

La capacitación espermática empleando un compuesto como la heparina provoca eventos intracelulares, donde la heparina se ancla en la membrana del celular en el punto de proteínas del plasma espermático (BSP), esto provoca que se dé el intercambio de calcio, bicarbonato e hidronios. Los intercambios producen que el ATP pase a ADP, así como una elevación en el pH y calcio intracelular; el ciclasa adenilato soluble es estimulado por la elevación de calcio y el bicarbonato intracelular, como resultado la AMP ciclasa activa la proteína quinasa A (PKA), provocando la síntesis de las proteínas tirosinas quinasa y la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa, lo cual seguidamente permite la capacitación del acrosoma [38].

Asimismo, existen otros factores capacitantes empleados en medios específicos durante la fertilización *in vitro*; tal es el caso de los glicosaminoglicanos entre los cuales, además de encontrarse la anteriormente mencionada heparina, se encuentra el ácido hialurónico y el condroitin sulfato. De igual forma los aceptores de colesterol como la albúmina y algunas lipoproteínas, los cuales están implicados en la reestructuración de la membrana plasmática, dando mayor fluidez y permeabilidad a la misma [43].

Las catecolaminas son hormonas necesarias para alcanzar la reacción acrosomal; además, hiperactiva los espermatozoides, logrando que estos alcancen

una motilidad óptima en sistemas *in vitro* [44]. Del mismo modo, existen enzimas que al igual que las catecolaminas promueven una hiperactivación del espermatozoide tal como la enzima beta-amilasa y beta-glucuronidasa estero sulfatasa [43]. También, se ha investigado la regulación de la proteína quinasa y consecuentemente la función del AMP cíclico como reguladores de la capacitación espermática [7].

### Técnicas capacitación para la migración

Las técnicas empleadas para la capacitación espermática se basan en el movimiento del espermatozoide desde el semen hasta el medio de cultivo. Entre las más utilizadas están la técnica del lavado, el "Swim up" y los gradientes de densidad [45, 46].

Técnica del lavado: es la técnica más sencilla y consiste en eliminar el plasma seminal junto con factores decapacitantes, mediante un lavado simple de la muestra. Para ello, se adiciona a la muestra un medio de cultivo, se centrifuga por 5-10 minutos, se retira el sobrenadante y se suspende la célula seminal. Se puede realizar un segundo lavado (de 3-5 minutos) si la técnica se empleará por sí sola, o un solo lavado si se usa como un paso adicional dentro de otro procedimiento [46].

Técnica del "Swim-up": bajo esta técnica, el semen líquido pasa por un lavado, luego se decanta el sobrenadante, se suspende el botón celular, se le añade un medio de cultivo y se incuba por cierto período de tiempo (alrededor de 60 minutos). Una vez finalizado ese tiempo, se recupera la parte superior, donde se encontrarán los espermatozoides capacitados y viables [46].

Técnica de gradientes de densidad: esta técnica realiza una separación de rastros de células no espermáticas y detritos presentes mediante dos gradientes de diferentes densidades [46]. Es un método fácil de estandarizar y brinda resultados más acertados que los del método "Swim up". El método de gradientes de densidad utiliza el principio de centrifugación permitiendo separar el esperma en sus componentes de acuerdo a la densidad de los mismos. Este método de capacitación espermática utiliza medios tales como BWW, Earle, HAMF10 y HTF, entre otros [47].

Existen diferentes métodos para llevar a cabo la capacitación espermática por medio de gradientes

de densidad, entre ellos se encuentran: Percoll, Puresperm, Isolate, Suprasperm [47, 48]. En cuanto a Percoll, este es uno de los medios más estudiados que permite realizar un gradiente de densidad compuesto por partículas de sílice coloidal recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), esta cobertura evita cualquier tipo de posible toxicidad en materiales biológicos. El tamaño de partícula del medio Percoll se considera heterogéneo, por lo que el gradiente de densidad y la sedimentación de la muestra a procesar ocurre a un ritmo adecuado y su baja osmolaridad contrarresta interferencias ambientales. Su uso ideal en bovinos se da en valores de pH de 5,5 a 10 [49].

La capacitación espermática es un proceso complejo de conseguir en condiciones *in vitro*. Para lograr que este proceso se lleve a cabo de manera exitosa en laboratorio se debe hacer uso de un medio químicamente simple, el cual disponga de un suministro relativamente limitado de electrolitos y energía con metabolitos como la glucosa, piruvato y lactato, los cuales colaboran a una alta disponibilidad de ATP, necesaria para la motilidad y otros procesos [29]. Además, estos medios suelen tener una cierta cantidad de serumalbúmina, cuya función es la de ser aceptor de colesterol [50].

La utilización de  $\text{HCO}_3$  en los medios de incubación y para alcanzar la capacitación espermática han hecho que el  $\text{HCO}_3$  hoy sea de uso prácticamente universal [50]. Específicamente en la capacitación espermática se ha demostrado que el  $\text{HCO}_3$  presente en el líquido seminal de los cerdos desempeña un papel de activación espermática, mejorando la motilidad de los espermatozoides como resultado de una mayor síntesis de cAMP [51, 52].

El hecho de que el  $\text{HCO}_3$  promueva una mayor síntesis de cAMP es un hecho importante dado a que esta cumple con diferentes funciones en el proceso de capacitación espermática. La cAMP y su rol dentro del proceso de capacitación espermática se debe a la variedad de enfoques en cuanto a ganancia y pérdida de función del espermatozoide [53].

### Reacción acrosomal y su relación con la viabilidad espermática

Posterior a los procesos de capacitación espermática, donde se seleccionan los

espermatozoides más aptos para una fertilización exitosa, los espermatozoides deben de pasar por un proceso llamado reacción acrosomal, dentro de una ventana de tiempo ideal para lograr la fecundación [54, 55].

Para determinar la reacción acrosomal ante los métodos de capacitación espermática se utilizan técnicas tales como: microscopía de contraste diferencial, tinciones y microscopía de campo claro; lectinas unidas a fluorescencia y anticuerpos monoclonales [56].

Dentro de la caracterización acrosomal se puede clasificar a los espermatozoides como esperma vivo con acrosoma intacto, esperma muerto con acrosoma intacto, esperma vivo con acrosoma reaccionado y esperma muerto con acrosoma reaccionado [57]. La fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para realizar esta clasificación, en donde los espermatozoides que carecen de reacción acrosomal son los que poseen mayor fluorescencia visible, los espermatozoides con menos de de reacción en la sección acrosomal pueden considerarse como reaccionados [58]. Estructuralmente, la sección acrosomal del espermatozoide está compuesta por proteínas, las cuales han sido utilizadas como biomarcadores, tales como las Tyrosino-Fosforiladas SPACA 1 y las IZUMO 1.

## Conclusiones

La inseminación *in vitro* en la producción animal es una herramienta que acelera la reproducción de ganado élite, en el caso de los bovinos esta práctica se encuentra en crecimiento, con una promisoriedad normalidad en la producción, no obstante, se requiere de un mayor estudio para ampliar el acceso de los países a la elaboración y compra de medios para maduración de los embriones.

## Bibliografía

- [1] G. Bó, R. Mapletoft, "Evaluation and classification of bovine embryos", *Animal Reproduction*, vol. 10, pp. 344-348, 2013.
- [2] A.D. Ealy, L.K. Wooldridge, S.R. McCoski, "Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle", *Journal of Animal Science*, vol. 97, no. 6, pp. 2555-2568, 2019. <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>.

- [3] P.J. Hansen, "Realizing the promise of IVF in cattle-an overview", *Theriogenology*, vol. 65, pp. 119-125, 2006.
- [4] F. Gallegos, A. Mancheno, L. Mena, A. Murillo, "Producción de embriones bovinos *in vitro*: estado del arte", ESPOCH Congresses: *The Ecuadorian Journal of STEAM*, vol. 2 no. 1, epoch-v2i2, 2022.
- [5] S. Demyda-Peyrás, "Análisis citogenético y celular de la maduración ovocitaria, la capacitación espermática y el desarrollo embrionario temprano en el proceso de la fecundación *in vitro* de *Bos taurus*", Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Argentina, 2013. Disponible en: <https://helvia.uco.es/handle/10396/10056>.
- [6] N. Huerta-Retamal, P. Sáez. Espinosa, L. Roles-Gómez, M. Avilés, A. Romero, J. Aizpurua, M.J. Gómez-Torres, "Human sperm chaperone HSPA2 distribution during *in vitro* capacitation", *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 143, 103246, 2021.
- [7] C.B. Graf, C. Ritagliati, C. Stival, G.M. Luque, I. Gentile, M.G. Buffone, D. Krapf, "Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation", *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 518, 1100992, 2020.
- [8] V.A.P. Alfradique, R.I.T.P. Batista, J.M.G. Souza-Fabjan, L.R. Côrtes, G.M. Bragança, C.V. de Souza, L.C. da Costa, F.Z. Brandão, "Supplementation of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone in the co-culture médium of bovine oviductal epithelial cells and ovine spermatozoa reduce the sperm kinematics and capacitation", *Reproductive Biology*, vol. 18, pp. 368-379, 2018.
- [9] A. Mishra, A. Dhali, A., I.J. Reddy, D. K. Dey, D. Pal, R. Bhatta, "*In vitro* production of desired sex ovine embryos modulating polarity of oocytes for sex-specific sperm binding during fertilization", *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, pp.1-14, 2022.
- [10] F. Treulen, L. Aguila, M.E. Arias, I. Jofré, R. Felmer, "Effect of MnTBAP on *in vitro* capacitation of frozen-thawed stallion sperm", *Animal Reproduction Science*, vol. 221, 106570, 2020.
- [11] M.R. Félix, R. M Turner, T. Dobbie, K. Hinrichs, "Successful *in vitro* fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation", *Biology of Reproduction*, pp. 1-14 Doi.org/10.1093/biolre/ioc172, 2022.
- [12] C.E. Osycka-Salut, E. Martínez-León, M.G. Gervasi, L. Castellano, C. Davio, N. Chiarante, A.M. Franchi, M.L. Ribeiro, E.S. Díaz, S. Perez-Martinez, "Fibronectin induces capacitation-associated events through the endocannabinoid system in bull sperm", *Theriogenology*, vol. 153, pp. 91-101, 2020.
- [13] N. Iqbal, A.G. Hunter, "Comparison of bovine sperm capacitation systems for ability of sperm to penetrate zona-free hamster oocytes and ovine oocytes matured *in vitro*" *Journal of Dairy Science*, vol. 78, pp. 77-83, 1995.
- [14] Y. Chen, K. Wang, D. Zhang, Z. Zhao, J. Huang, L. Zhou, M. Feng, J. Shi, H. Wei, L. Li, Z. Wu, S. Zhang, "GPx6 is involved in the *in vitro* induced capacitation and acrosome reaction in porcine sperm", *Theriogenology*, vol. 156, pp. 107-115, 2020.
- [15] E. Breininger, P.D. Cetica, M.T. Beconi, "Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm", *Theriogenology*, vol. 74, pp. 1035-1049, 2010.
- [16] L. Kushner-Dávalos, "La fertilización *in vitro*: beneficios, riesgos y futuro", *Revista Científica Ciencia Médica*, vol. 13, no. 2, pp. 77-80, 2010.
- [17] M. García-Herreros, C.L.V. Leal, "Sperm volumetric dynamics *in vitro* capacitation process in bovine spermatozoa", *Animal*, vol. 9, no. 6, pp. 1016-1024, 2015.
- [18] P.C. Rodríguez, M.M. Satorre, M.T. Beconi, "Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, vol. 131, pp. 135-142, 2012.
- [19] J. Crespo, E. Guamán, "Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de El Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion", Tegucigalpa, Zamorano, 2015. En: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4574/1/CPA-2015-027.pdf>.
- [20] E. Espinoza Velásquez, "Biotecnologías embrionarias aplicadas a la reproducción en la hembra", *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, vol. 2, pp. 144-163, 2017.
- [21] S. Akagi, K. Matsukawa, A. Onishi, "Nuclear transfer technology in cattle, sheep, and swine", *Transgenic Animal Technology*, vol. 1, pp. 387-398, 2014, DOI: 10.1016/b978-0-12-410490-7.00015-3.
- [22] Y. Martínez, "Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación *in vitro*", Universidad de Oviedo, Oviedo, España, 2013. En: <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>
- [23] J. Hincapié, "La fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos: una biotecnología reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético", s.f. En: <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>
- [24] S. Valckx, J. Leroy, "The effect of maternal metabolic health and diet on the follicular fluid composition and potential consequences for oocyte and embryo quality", *Handbook of Fertility*, vol. 1, pp. 35-44, 2015. Doi: 10.1016/b978-0-12-800872-0.00004-4.
- [25] R. Romar, "Efecto de las células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro*

- en la especie porcina”, Universidad de Murcia ed.1, España, 2008. En: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/10854/RomarAndres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [26] P. Santa Cruz, W. Huanca, R. Condori, A. Ampuero, “Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos”, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 25, no. 4, pp. 487-493, 2014.
- [27] A. González, “Papel del factor de crecimiento epidérmico durante la maduración *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes”, 2013. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5636/erg09de13.pdf?sequence=9&isAllowed=y>.
- [28] I. Moragues, “Optimización de las condiciones de cultivo durante el desarrollo embrionario *in vitro* en técnicas de reproducción asistida”, Universidad de Alicante, 2014, file:///C:/Users/M/Downloads/tesis\_maria\_isabel\_moragues\_espinosa\_de\_los\_montes.pdf
- [29] T. Zhang, Y. Zheng, R. Han, T. Kuang, C. Min, H. Wang, D Che, “Effects of pyruvate on early embryonic development and zygotic genome activation in pigs”, *Theriogenology*, vol. 189, pp. 77-85, 2022.
- [30] R. Salgado, O. Vergara, L. Ramírez, “Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados *in vitro*”, *Revista MVZ Córdoba*, vol.15, no. 1, pp. 1954-1960, 2010.
- [31] N. Mucci, J.F. Aller, G.G. Kaiser, F. Hozbor, , R.H. Alberio, “Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero”, *Archivos de Medicina Veterinaria*, vol. 38, no. 2, pp. 97-104, 2006.
- [32] M. Urbina, “Optimización de la eficiencia de la fecundación *in vitro*”, *Fertilidad y Reproducción Asistida*, vol. 1, pp. 66-73, 2008.
- [33] B. Bavister, T. Rose-Hellekant, T. Pinyopummintr, “Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media”, *Theriogenology*, vol. 37, no. 1, pp. 127-146, 1992.
- [34] B. Marquant-Leguienne, P. Humblot, “Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine”, *Theriogenology*, vol. 49, no. 1, pp. 3-11, 1998.
- [35] W. Boone, S. Shapiro, “Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory”, *Theriogenology*, vol. 33, no. 1, pp. 23-50, 1990.
- [36] L. Edwards, D. Williams, D. Gardner, “Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH”, *Human Reproduction*, vol. 13, no. 12, pp. 3441-3448, 1998.
- [37] N. Vásquez, Torres. V, B.A, Rojano, “Efecto del ácido ascórbico durante maduración *in vitro* de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario”, *Información Tecnológica*, vol. 25, no. 2, pp. 141-150, 2014.
- [38] J.J. Parrish, “Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin”, *Theriogenology*, vol. 81, pp. 67-73, 2014.
- [39] C.A. Hernández-Nieto, L.E. Soto-Cossío, D, Basurto-Díaz, “Eclósión asistida para mejorar la implantación del embrión. Revisión de la bibliografía”, *Ginecología y Obstetricia de México*, vol. 83 no. 4, pp. 232-239, 2015.
- [40] N. Madrid, M. Oter, S. Pérez, A. Gutiérrez, J. de la Fuente, “Efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la fertilización *in vitro* con semen descongelado de toros de la raza Rubia Gallega”, Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA., 2001. En: [http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2001/comunicaciones/2001\\_Rep\\_25.pdf](http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2001/comunicaciones/2001_Rep_25.pdf)
- [41] J.F. Cox , P. Fernández, F. Saravia, M. Briones, A. Santa María, “Efecto de la heparina en la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides caprinos”, *Archivos de Medicina Veterinaria*, vol. 29, no. 2, pp. 261-267, 1997.
- [42] V.L. Maciel Jr, M.C. Caldas-Bussiere, V. Silveira, R.S. Reis, A.F.L. Rios, C.S. P. de Carvalho, “L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during *in vitro* capacitation”, *Theriogenology*, vol. 119, pp. 1-9, 2019.
- [43] V. Auquilla, “Evaluación de las técnicas swim-up y gradientes de densidades para la capacitación espermática en la clínica BioGEPA”, Universidad de Cuenca. 2011. En: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2439/1/tq1079.pdf>.
- [44] E. Martínez, “Fecundación *in vitro* en los animales de granja”, ed.1, Universidad de Murcia, Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico, Murcia, España, 1989.
- [45] C. Sánchez, K.J. Mar, M. Castilla, I. Marcos, A. Martín, A. Galán, “Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida”, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, España, 2009. En: [https://www.researchgate.net/publication/281448798\\_Tecnicas\\_para\\_la\\_preparacion\\_de\\_semen\\_en\\_reproduccion\\_asistida](https://www.researchgate.net/publication/281448798_Tecnicas_para_la_preparacion_de_semen_en_reproduccion_asistida).
- [46] E. Cervantes-Ibarra, L. A. Durán-Monterrosas, E. Carballo-Mondragón, A. Kably-Ambe, “Capacitación espermática: una herramienta para las técnicas de reproducción asistida”, *Acta Médica Grupo Ángeles*, vol. 17, pp. 34-41, 2019.
- [47] J. Salazar, “Introducción a las técnicas de capacitación espermática: un proceso *in vitro*”, Costa Rica, 2019. En: <http://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2019/05/Art%C3%ADculo-2-Introduccion-a-las-Tecnicas-de-Capacitacion-Espermatoca-final.pdf>.
- [48] J.D.L. Simões, C.M. Mendes, T.R.D.S. Hamilton, M.E.O.D. Assumpção, “Bovine sperm used to IVF submitted to Percoll gradient induces progress

- capacitation by intracellular zinc signaling”, *Animal Reproduction Science*, vol. 220, 1063360, 2020.
- [49] A.G. Mena Changoluisa, “Evaluación de dos tratamientos, solución gradiente Percoll (45 - 90%) y otra solución con la adición de bicarbonato de sodio en vacas primer parto”, Tesis Médico Veterinario, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador, 2014.
- [50] M. Gracia, P. Visconti, “Chang’s meaning of capacitation: a molecular perspective”, *Molecular Reproduction and Development*, vol. 83, no. 10, pp. 860-874, 2016.
- [51] N. Okamura, Y. Sugita, “Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma”, *Journal of Biological Chemistry*, 1983.
- [52] N. Okamura, Y. Tajima, A. Soejima, H. Masuda, “Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase”, *Journal of Biological Chemistry*, 1985.
- [53] P. Visconti, D. Krapf, J. de la Vega-Beltrán, J. Acevedo, A. Darszon, “Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation”, *Asian Journal of Andrology*, vol. 13, no. 3, pp. 395-405, 2011.
- [54] Z. Reckova, M. Machatkova, L. Machal, M. Jeseta, “Relationship between acrosome integrity changes and *in vitro* fertilising ability of bovine spermatozoa”, *Veterinarni Medicina*, vol. 60, no. 9, pp. 469-475, 2015.
- [55] T. Dahan, H. Breitbart, “Involvement of metabolic pathway in the sperm spontaneous acrosome reaction”, *Theriogenology*, vol. 192, pp. 38-44, 2022.
- [56] J.C. Gardón, C. Matás, J. Gadea, “Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica”, *Anales de Veterinaria de Murcia* vol.17, no.1, pp.19-26, 2001.
- [57] M. Samardzija, M. Karadjole, I. Getz, Z. Makek, M. Cergolj, T. Dobranic, “Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*”, 2006. In: <<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-4-58>>
- [58] J. Jankovičová, M. Simon, J. Antalíková, L. Horovská, “Acrosomal and viability status of bovine spermatozoa evaluated by two staining methods”, *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 56, no. 1, pp. 133-138, 2008.
- [59] H. Harayama, K. Minami, K. Kishida, T. Noda, “Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa”, *Reproductive Medicine and Biology*, vol. 16, pp. 89-98, 2017.

De acuerdo con la norma IEEE, este documento debe citarse:

P. Aragonés-Vargas, I. Bermúdez-Fernández, I. Ortiz-Cardenas, J. Sánchez-Alpízar, M. Madrigal-Valverde, “Aspectos relacionados con la fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos, una revisión bibliográfica”, *Revista AgrolInnovación en el Trópico Húmedo*, vol. 3 no. 1, pp. 52-61, 2022. DOI: 10.18860/rath.v3i1.6507