

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**ESTADO FUNCIONAL DE LA MEMBRANA
PLASMÁTICA Y SOBREVIVENCIA DEL
ESPERMATOZOIDE CAPRINO INCUBADO EN MEDIO TBM.**

TESIS QUE PRESENTA:

VIRIDIANA CAMACHO PONCE

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESORES:

Dr. Marcos Cajero Juárez

Dra. Alejandra Soberano Martínez

Morelia, Michoacán, Julio 2016.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
1. Morfología del espermatozoide.....	2
2. Capacitación espermática.....	5
2.1 Factores de la capacitación espermática.....	7
2.1.1. Activación.....	7
2.1.2. Capacitación espermática.....	7
2.1.2.1. Membrana plasmática.....	8
2.1.3. Hiperactivación y motilidad espermática.....	10
2.1.4. Reacción acrosomal.....	11
3. Capacitación <i>in vitro</i>.....	12
4. Papel de los componentes de los medios: regulación iónica durante la capacitación.....	16
A. Albumina.....	16
B. Calcio.....	16
C. Bicarbonato.....	17

D. Heparina.....	17
E. Glucosa.....	17
5. JUSTIFICACIÓN.....	18
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
7. HIPÓTESIS.....	19
8. OBJETIVO GENERAL.....	19
8.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
V. RESULTADOS.....	25
VI. DISCUSIÓN.....	30
VII. CONCLUSIONES.....	33
VII. LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Intervalos de Capacitación *in vitro* en varias especies.....5

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar de espermatozoides Capacitados, No Capacitados y Reaccionados incubados en TALP y TBM.....25

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar de espermatozoides Capacitados, No Capacitados y Reaccionados a las 3, 6, 20 y 24 horas.....26

Cuadro 4. Promedio y desviación estándar de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados incubados en TALP y TBM a las 3, 6, 20 y 24 horas.....27

Cuadro 5. Promedio de Movilidad *Masal*.....28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del espermatozoide.....	3
Figura 2. Reacción acrosomal.....	11
Figura 3. Espermatozoide de Caprino Teñido con CTC.....	29

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el estado funcional de la membrana plasmática y sobrevivencia del espermatozoide caprino incubado en medio TBM. Se colectaron 7 eyaculados de semen de caprino de la raza Saanen, mediante vagina artificial; obteniendo de 0.5-1.0 ml de semen por colecta. Una vez que se obtuvo el eyaculado se practicaron dos lavados para retirar el plasma seminal, utilizando la solución mDM (Modified Dulbecco's Medium); los lavados consistieron en centrifugar la muestra a 1300 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y reemplazado con igual volumen de mDM incubándose en un ángulo de 45° durante 45 minutos a 37° C en una atmósfera de 5% CO₂ (Técnica Swim up). Transcurrido este tiempo se tomaron 500 µL del sobrenadante y se diluyeron en 1.5 ml de medio mDM más heparina (100µg/ml) y se incubó durante 15 minutos a 37° C. Posteriormente se tomaron 10 µL de esta muestra y se diluyeron en 10 ml de agua para realizar el conteo espermático y obtener la cantidad de espermatozoides a depositar en tubos eppendorf con los medios TBM y TALP, respectivamente. Para observar el estado funcional de la membrana plasmática, se tomó una alícuota del semen incubado en TBM y TALP y se realizó la tinción con clortetraciclina (CTC) a las 0, 3, 6, 20 y 24 hrs después de iniciado el proceso; se contaron un mínimo de 60 células espermáticas por frotis de CTC. Según el patrón de tinción CTC fluorescente los espermatozoides se clasificaron en: no capacitados, capacitados y reaccionados. El promedio \pm DS con TALP para espermatozoides capacitados fue de 47.7 ± 20.4 , no capacitados 32.9 ± 26.4 y reaccionados 19.2 ± 20.5 ; con TBM para capacitados fue de 48.8 ± 23.4 , no capacitados 29.4 ± 29.2 y reaccionados 21.7 ± 22.4 . No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos medios. Por lo tanto se puede utilizar el medio TBM para la capacitación de espermatozoides caprinos ya que se obtienen buenos resultados al igual que con el medio TALP. **Palabras clave: semen, caprinos, capacitación espermática, TBM, TALP.**

SUMMARY

In this study was determined the functional state of the plasma membrane and survival of sperm goat incubated in medium TBM. Were collected 7 ejaculates of semen goats Saanen, by artificial vagina; obtaining 0.5-1.0 ml of semen collection. Once the ejaculate was obtained two washes were performed to remove seminal plasma, using the solution mDM (Modified Dulbecco's Medium); washes consisted of centrifuging the sample at 1300 rpm for 4 minutes at room temperature, the supernatant was removed and replenished with equal volume of mDM incubated in a 45 ° angle for 45 minutes at 37 ° C in an atmosphere of 5 % CO₂ (Tecnic Swim up). After this time they were taken 500 µL of the supernatant and diluted into 1.5 ml of mDM more heparin (100ug/ml) and was incubated for 15 minutes at 37 ° C. subsequently taken 10µl from this sample and diluted in 10 ml of water for sperm count and sperm count obtain the amount deposited in tubes eppendorf with means TALP and TBM, respectively. To observe the functional state of the plasma membrane, an aliquot of semen incubated in media TALP and TBM was taken and chlortetracycline staining (CTC) was performed at 0, 3, 6, 20 and 24 hrs after the process started. A minimum of 60 sperm cells per smear of CTC were counted. According to the staining pattern CTC fluorescente the sperm count were classified in uncapacitated, capacitated and reacted. The average \pm S.D. with TALP for capacitated sperm was 47.7 ± 20.4 , uncapacitated 32.9 ± 26.4 and reacted 19.2 ± 20.5 ; with TBM for capacitated was 48.8 ± 23.4 , uncapacitated 29.4 ± 29.2 and reacted 21.7 ± 22.4 . No significant differences ($p < 0.05$) between the two media were found. Therefore it can be used the middle TBM for training goat sperm as good results as with the average TALP.

Key words: semen, goats, sperm capacitation, TBM, TALP.

I. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de mamíferos son incapaces de fertilizar a los ovocitos inmediatamente después de la eyaculación, por lo que, están obligados a someterse al proceso de capacitación para adquirir la capacidad fecundante. La capacitación espermática conlleva una cascada de reacciones bioquímicas que provocan una desestabilización y reorganización de los lípidos, colesterol y proteínas (Rodríguez, 2007), que terminará con la exocitosis del acrosoma cuando el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida (ZP) (Flesch y Gadella, 2000).

La capacitación permite al espermatozoide unirse a la zona pelúcida, para que esta induzca la reacción acrosomal (RA) y así fertilizar al ovocito. El proceso de capacitación *in vivo* sucede en el aparato genital de la hembra; *in vitro* necesita de medios definidos (Cormier and Bailey, 2003).

Coy *et al.* (2002), observaron que el medio de fertilización *in vitro* (FIV) TBM (Tris buffered medium) en porcinos induce la reacción acrosomal del espermatozoide de manera prematura comparado con el medio TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate), por lo que, disminuye la motilidad del espermatozoide y por consecuencia hay una menor fertilidad.

Varios métodos han sido aplicados para medir los cambios que ocurren en la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de FIV. El método más comúnmente utilizado es la tinción de clortetraciclina (CTC). Este antibiótico fluorescente se une a la membrana plasmática asociando cationes, especialmente el Ca^{2+} lo cual exhibe la fluorescencia sobre los segmentos de la membrana donde estos cationes se acumulan. La tinción con CTC ha demostrado interactuar con espermatozoides de mamíferos de diferentes especies, que presentan diferentes

patrones fluorescentes sobre la cabeza de espermatozoides los cuales se cree que reflejan las diferentes etapas del proceso de capacitación (Fraser *et al*, 1995).

Hasta el momento, no se han encontrado reportes que evalúen el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide caprino incubado en el medio de fertilización TBM.

II. ANTECEDENTES

1. Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides (gametos masculinos) son células haploides, altamente especializadas, cuya función principal es transportar en forma segura el genoma masculino hacia el sitio donde se lleva a cabo la fertilización de los ovocitos (gametos femeninos) y garantizar la deposición del material genético en su citoplasma. Para realizar exitosamente estas funciones los espermatozoides tienen características morfológicas muy especiales que las distinguen de cualquier otra célula del organismo (Severiano, 2007).

Las dos estructuras principales del espermatozoide son, la cabeza y la cola (flagelo), que se encuentran unidos por la pieza conectora o cuello. La cabeza contiene el núcleo, dentro del cual se encuentra la cromatina en forma altamente condensada, un citoesqueleto y cantidades pequeñas de citoplasma. En su parte anterior está cubierto por el acrosoma, el cual es una vesícula membranosa que contiene diferentes enzimas hidrolíticas. La cola del espermatozoide está dividida sucesivamente en tres regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza final (Fig. 1). La estructura interna de la cola contiene diferentes elementos que le confieren la capacidad de movimiento, tales como el axonema, las fibras densas externas y mitocondrias. Tanto la cabeza como la cola contienen cantidades muy pequeñas de citoplasma y, como sucede en cualquier otra célula del organismo, todo

el espermatozoide está rodeado por una membrana plasmática (Severiano, 2007). La cabeza del espermatozoide, la pieza media y la cola están divididas por la parte posterior por el anillo y estructuras del anillo anular, respectivamente. Estas estructuras tienen la función de actuar como una barrera de unión para el intercambio de lípidos entre la pieza media y la cabeza o la cola (Fig. 1) (Gadella *et al*, 2008).

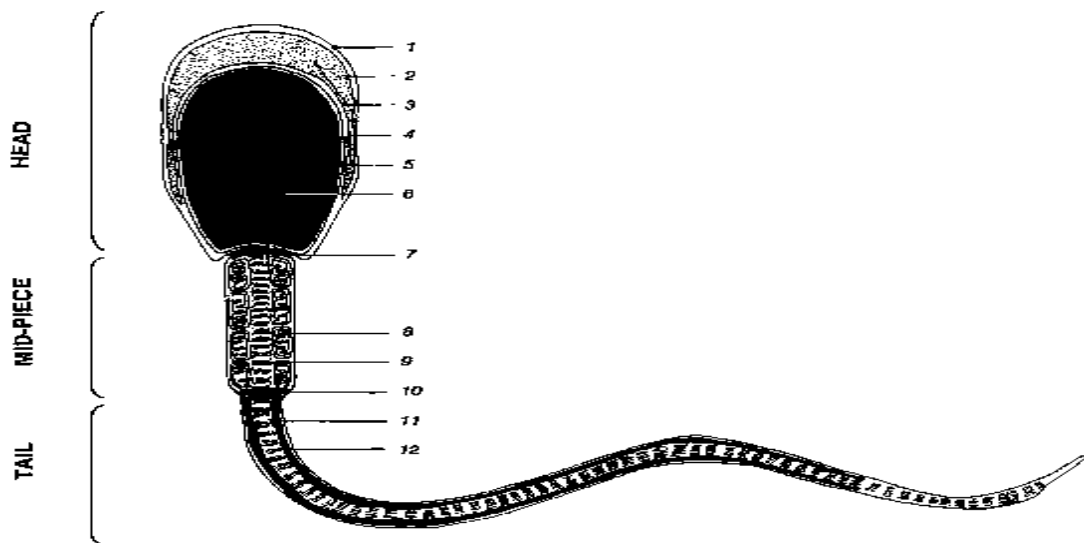


Figura 1. Morfología del espermatozoide. 1, membrana plasmática; 2, membrana acrosómica externa; 3, matriz de la enzima acrosomal; 4, membrana acrosómica interna; 5, envoltura nuclear; 6, núcleo; 7, cuello y anillo posterior; 8, mitocondria; 9, parte proximal del flagelo; 10, anillo anular; 11, vaina fibrosa; 12, axonema + fibras densas externas (Modificado de Gadella *et al*, 2008).

La producción de espermatozoides se da mediante la espermatogénesis, proceso biológico de división y maduración de las células germinales, el cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos. Este proceso implica la proliferación celular seguido de repetidas divisiones mitóticas, recombinación genética y la división meiótica para producir las espermátidas haploides seguida de una diferenciación de las espermátidas en espermatozoides. El proceso continúa con la maduración de los

espermatozoides que son transportados a través del epidídimo (Severiano, 2007, Vadnais *et al.*, 2007).

En la etapa de diferenciación también denominado espermiogénesis, en donde las espermatídes se convierten en espermatozoides. Se reconocen cuatro fases características: fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración.

Fase de Golgi. En esta fase el aparato de Golgi se acerca a núcleo, desprendiendo vesículas que se le sobreponen y se unen convirtiéndose en la vesícula acrosomal. Los centriolos situados en forma de T, cercanos al aparato de Golgi, migran hacia la base del núcleo. El centriolo distal más tarde dará origen al axonema, conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos.

Fase de capuchón. Aquí la vesícula acrosomal se aplana formando una capucha sobre el núcleo. Hay inactividad transcripcional por parte del núcleo, lo cual hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales.

Fase acrosomal. La espermatíde gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza localizándose por debajo de la unión núcleo axonema. Las mitocondrias se agrupan alrededor del axonema formando así la pieza media. Es en esta fase donde el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.

Fase de maduración. En esta fase se observan las características definitivas de los espermatozoides: la forma de la cabeza propia de cada especie, cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma y su cola, compuesta por las piezas media, principal y terminal (Fig. 1). El proceso de maduración termina con la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero.

2. Capacitación espermática

Cuando los espermatozoides de mamíferos son eyaculados son incapaces de fertilizar a los ovocitos inmediatamente después de la eyaculación, por lo que, *in vivo* se activan y adquieren potencial fertilizante en el tracto genital de la hembra; están obligados a someterse al proceso de capacitación antes de obtener la capacidad fecundante. La capacitación espermática conlleva una cascada de reacciones bioquímicas que provocan una desestabilización y reorganización de los lípidos, colesterol y proteínas (Rodríguez, 2007), que terminará con la exocitosis del acrosoma cuando el espermatozoide entre en contacto con la zona pelúcida (ZP) (Flesch y Gadella, 2000; Boerke *et al*, 2008).

En mamíferos varía el tiempo requerido para que se de la capacitación de semen recién eyaculado (Cuadro 1); así como el lugar en el cual se da no es el mismo debido a que la deposición de semen es diferente en cada especie; en bovinos, ovinos y caprinos se deposita en el segmento craneal de la vagina (Rodríguez, 2007); mientras que en cerdos se deposita en el útero pero la capacitación se da en el segmento anterior del istmo (Yanagimachi, 1994).

Cuadro 1. Intervalos de Capacitación *in vitro* en varia especies (Vadnais *et al*, 2007).

TIEMPO REQUERIDO PARA LA CAPACITACION	ESPECIES
1- 2 HORAS	Murino, gato, carnero.
2-4 HORAS	Toro, hámster, rata.
5-6 HORAS	Conejo, cerdo, caballo.
6-7 HORAS	Humano

In vivo la capacitación ocurre en el istmo del oviducto después de que el espermatozoide entra en contacto con las células epiteliales (Vadnais *et al.*, 2007), debido a que el fluido oviductual es rico en albúminas y lipoproteínas de alta densidad (HDL), capaces de retirar el colesterol de la membrana plasmática del esperma (Olivera *et al.*, 2006; Companyó *et al.*, 2007). Mientras que, *in vitro* es necesaria la exposición del semen fresco (Sostaric *et al.*, 2005) o criopreservado en medios adecuados suplementados con agentes capacitantes específicos (Salgado *et al.*, 2005).

Durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos son liberados en el aparato genital de la hembra. El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo durante su paso por el epidídimo, pero no es hasta la eyaculación que el espermatozoide tiene movimiento, este proceso recibe el nombre de *activación del esperma*. El movimiento consiste en un bateo simétrico de la cola, haciendo que el espermatozoide se desplace progresivamente, pasando rápidamente a través del cuello y el útero de la hembra; transcurridos 10 minutos los espermatozoides se localizan en la unión útero-tubal. De aquí los espermatozoides pasan al istmo, el cual está formado por cilios luminales epiteliales y plegamientos de la mucosa que forman criptas, en donde los espermatozoides son retenidos y pierden factores descapacitantes como mucopolisacáridos y proteínas, comenzando el proceso conocido como *capacitación*; que es la habilidad que adquiere el espermatozoide para hiperactivarse y lograr la reacción acrosomal. Una vez que los espermatozoides logran liberarse de las criptas del istmo pasan al ámpula, donde al encontrar el oocito ocurre el reconocimiento de los gametos y la adherencia para que el espermatozoide empiece a atravesar la ZP y se fusionen las dos membranas mecanismo que conduce a la formación del cigoto (Olivera *et al.*, 2006).

Los mecanismos moleculares de la capacitación no están completamente aclarados, muchos estudios han demostrado la participación de numerosas modificaciones estructurales y bioquímicas en los espermatozoides, como cambios en la composición de la membrana y la fluidez, aumento del calcio intracelular, alcalinización citoplasmática, la activación de los canales iónicos y la generación de especies reactivas de oxígeno (Cormier and Bailey, 2003).

2.1. Factores de la capacitación espermática

2.1.1. Activación

La activación se desencadena por señales extracelulares como cambios en el medio iónico, interacción con ligandos específicos (progesterona y el esteroide sulfatado SAAF), que a su vez activan ciclasas y que conlleva a un aumento transitorio de GMPc (Guanosín monofosfato cíclico), AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y activación de la GCm (guanil ciclasa transmembranal). Se abren los canales de K⁺ (ión potasio) dependientes de GMPc, provocando la salida de K⁺ y una hiperpolarización de la membrana espermática dependiente de AMPc, se activa el intercambiador de voltaje dependiente Na⁺/H⁺ (Olivera *et al*, 2006).

El espermatozoide es activado y una vez capturado por las microvellosidades del istmo del oviducto se capacita (Olivera *et al*, 2006).

2.1.2. Capacitación

Los espermatozoides de los mamíferos sufren cambios estructurales y bioquímicos debido a la interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor de la hembra, necesarios para poder fertilizar al óvulo. Este proceso es

conocido como *capacitación espermática* (CE) (Hernández *et al*, 2005; Rodríguez *et al*, 2008).

Durante la CE hay un aumento en la permeabilidad y decremento en la relación colesterol: fosfolípidos en la membrana; ingreso de Ca^{++} , Na/K y de HCO_3^- , generación de oxígeno reactivo y fosforilación de la proteína tirosina (Breitbart y Spungin, 1997; Olivera *et al*, 2006; Rodríguez *et al*, 2008).

La pérdida de colesterol favorece la translocación de algunas proteínas a la zona ecuatorial, necesarias para que el espermatozoide pueda adherirse al oocito. La salida de colesterol durante la capacitación induce la activación de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y de los canales de HCO_3^- (Olivera *et al*, 2006). La salida de colesterol de la membrana plasmática permite que esta posea un incremento en la fluidez permitiendo el paso de sustancias entre el medio extracelular e intracelular (Visconti y Kopf, 2002).

Es sabido que el fluido oviductal *in vivo* sirve como un aceptor del colesterol debido a que es rico en albúminas y lipoproteínas de alta densidad (HDL), capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide (Visconti y Kopf, 2002; Olivera *et al*, 2006).

2.1.2.1. Membrana plasmática

Los cambios en la composición de los lípidos y la distribución dentro de la membrana plasmática son los primeros eventos durante la CE (Cross, 2004). Durante mucho tiempo se postuló que los lípidos de la membrana plasmática sólo tenían una función pasiva, limitándose a la estructura de la misma. En los últimos años, un nuevo modelo de membrana sugiere la presencia de estructuras con funciones específicas, ricas en glicoesfingolípidos, colesterol y proteínas. Estas estructuras, denominadas microdominios de membrana (raft = balsa) (MD) han sido

descritas en diversos modelos celulares conformando “parches” dentro de la bicapa lipídica. La asociación glicoesfingolípidos-colesterol está involucrada en vías de señalización y transporte específicas. Así es que a través de estos MD anclados en la membrana, se produce la transducción de señales (TdS) hacia el interior de la célula promoviendo el incremento de segundos mensajeros y en consecuencia la activación de respuesta celular. Al igual que en otros modelos celulares, el gameto masculino posee un mecanismo especial de TdS que se desencadena a partir de estos MD para una función específica; la CE (Boarelli *et al*, 2007).

Durante la CE se produce una reestructuración de componentes de la membrana íntimamente relacionada con la función espermática, específicamente en estructuras definidas en otros tipos celulares y denominadas microdominios de membrana. Los componentes principales involucrados son el colesterol y los esfingolípidos (GM1), que a su vez están asociados a proteínas específicas constituyendo una unidad (Boarelli *et al*, 2007).

Los espermatozoides cuando abandonan el testículo, lo hacen morfológicamente completos, pero no funcionalmente. La funcionalidad total se adquiere en el tránsito por el epidídimo (maduración epididimaria) y por el aparato reproductor femenino o su equivalente *in vitro* (capacitación espermática *in vitro*). Durante la capacitación los espermatozoides experimentan una pérdida de colesterol de la membrana probablemente desde un microdominio de membrana (MD), que asociada al ingreso de bicarbonato de sodio desde el medio (aparato reproductor femenino o su equivalente *in vitro*) generan la activación de un mecanismo original de TdS. Esta vía conduce a fosforilación de residuos de tirosina (p-Y) en proteínas específicas ricas en este aminoácido. Este evento es un marcador molecular de capacitación. Esta activación celular permitirá la fertilización cuando se encuentren ambos gametos en el aparato reproductor femenino (Boarelli *et al*, 2007; Vadnais *et al*, 2007).

2.1.3. Hiperactivación y motilidad espermática

La hiperactivación son los cambios en la motilidad del espermatozoide una vez que se realiza la capacitación. Esta hiperactividad en la motilidad permite al espermatozoide llegar al ovocito y ayuda en la unión entre espermatozoide y óvulo (Ho y Suarez, 2001; Hernández *et al*, 2005) y puede ser crítico para obtener éxito en la fecundación, debido a que aumenta la capacidad del espermatozoide para poder desprenderse de la pared del oviducto, permitiendo que se mueva en la luz del laberinto del oviducto, penetre las sustancias mucosas y finalmente la ZP del ovocito (Ho y Suarez, 2001).

La señal de transducción que regula la hiperactivación no está completamente descrita (Ho y Suarez, 2001) pero se sabe que el bicarbonato entra a la célula por la vía de co-transportador $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ y se une a una adenilciclase (ACs). La unión ACs se activa y produce AMPc que a su vez activa la proteína quinasa A (PKA) que fosforila residuos de serina y treonina de ciertas proteínas. En un medio libre de Ca^{2+} el efecto del bicarbonato puede ser revertido por el agotamiento de la activación de bicarbonato (activación transitoria de la PKA). El bicarbonato de las células responde a las necesidades de albumina y Ca^{2+} para remover el colesterol de la superficie. Se activa la PKA y como resultado de esta activación hay una fosforilación de proteínas. La AKAP-3 (proteína cinasa de anclaje) es una proteína que participa en la señalización de la PKA a través de la vía de la activación de la tirosina quinasa que causa la fosforilación de la proteína tirosina de la cola del espermatozoide. La fosforilación de las proteínas de la cola se cree es necesaria para la obtención de la motilidad y la hiperactivación del espermatozoide (Boerke, 2008). El Ca^{2+} es un elemento crítico en la vía de señalización para convertir la flexión simétrica en flexión asimétrica, característico de la hiperactivación (Ho y Suarez, 2001).

2.1.4. Reacción acrosomal

La capacitación de los espermatozoides es necesaria y obligatoria para que se pueda dar lugar a la reacción acrosomal (RA). La cual consiste en una serie de eventos que involucra la exocitosis de enzimas (Hernández *et al*, 2005).

La RA ocurre de forma espontánea, ya sea *in vivo* o *in vitro* y es de especial interés debido a que es la preparación final del espermatozoide antes de poder penetrar la zona pelúcida (Hernández *et al*, 2005). La unión del espermatozoide a la ZP lo estimula para someterse a la RA, lo que da como resultado la liberación del contenido acrosomal y la exposición de una nueva membrana de dominios esenciales para la fertilización (Fig 2) (Brener *et al*, 2003).

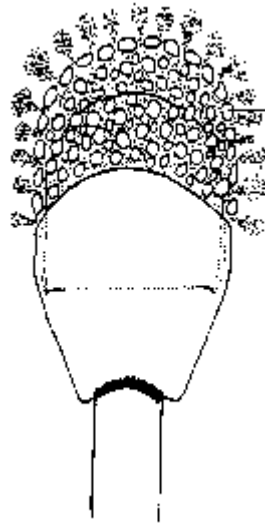


Figura 2. Reacción acrosomal. Vesículas mixtas formadas durante la RA a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa (Modificado de Gadella *et al*, 2008).

La RA se acompaña de una elevación en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, seguido de una elevación del pH. La RA puede ser inducida *in vitro* por el ionóforo A23187 con cambio de Ca^{2+} por 2H^{+} . Se ha identificado en la cabeza de un espermatozoide bovino un receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), además de una tirosina quinasa involucrados en la RA (Breitbart y Spungin, 1997).

Durante la RA se elevan los niveles intracelulares de AMPc, activando la enzima adenil ciclasa y los inhibidores de AMPc dependientes de proteína quinasa (PKA), se ha detectado que gracias al AMPc se abre un canal de calcio. También se ha demostrado que la PKC (proteína quinasa) está implicada en la RA. La PKC tiene dos posibles funciones en la RA; una de ellas es activar el canal de calcio de la membrana plasmática, generando un aumento esencial de Ca^{2+} intracelular; su otra función es la de activar la fosfolipasa A_2 (PLA_2), esta estimulación genera ácido araquidónico que es metabolizado para las prostaglandinas (PG) y los leucotrienos por las enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasa (LOX) respectivamente (Breitbart y Spungin, 1997).

3. Capacitación *in vitro*

El sitio fisiológico de la capacitación *in vivo* es el oviducto o el útero, dependiendo de la especie (Visconti y Kopf, 1998), sin embargo el espermatozoide maduro puede ser capacitado *in vitro*, esto resulta ser de gran importancia debido a la relevancia que tiene para la FIV, ya que esta depende de una adecuada capacitación del espermatozoide. A través de los años se han desarrollado diferentes técnicas de CE *in vitro*, en las cuales se busca limpiar el semen del plasma seminal y recuperar los espermatozoides con mayor capacidad de fecundación (Hernández *et al*, 2005).

La capacitación puede realizarse *in vitro* si se proporciona al espermatozoide un medio químicamente definido y adaptado de acuerdo a la especie (Yanagimachi, 1994), puede ocurrir durante su incubación a una temperatura fisiológica en presencia de bicarbonato, calcio, albumina y fuentes de energía (glucosa, piruvato, lactato) en una solución balanceada manteniéndose un pH alcalino (Vadnais *et al*, 2007). El espermatozoide puede experimentar espontáneamente la capacitación *in vitro* en un medio químicamente definido, lo cual sugiere que estos procesos en parte pueden ser modulados intrínsecamente por los espermatozoides (Visconti y Kopf, 1998). No todos los espermatozoides pueden capacitarse al mismo tiempo ya que algunos pueden hacerlo más rápido que otros aun estando en las mismas condiciones (Yanagimachi, 1994).

La CE puede ser imitada en la FIV, al incubar los espermatozoides se busca que los medios asemejen la composición iónica y nutricional del fluido del oviducto (Visconti y Kopf, 1998; Boerke *et al*, 2008); estos medios contienen sustratos energéticos como el piruvato, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), una fuente de proteína que normalmente se utiliza es la albumina sérica, NaHCO_3 y Ca^{2+} ; la acción de estos componentes para promover la capacitación a nivel molecular aún no está bien comprendido (Visconti y Kopf, 1998). El semen diluido es lavado a través de un gradiente de densidad discontinuo para la eliminación casi total de los componentes del plasma seminal (factores de descapacitación); el medio de capacitación contiene altas concentraciones de bicarbonato comparado con las concentraciones de bicarbonato en el eyaculado. Para la correcta zona de unión y zona de inducción de reacción acrosomal se requieren iones extra de Ca^{2+} ; los medios de FIV contienen ácidos grasos libres que tienen extractos de albúmina específicos libres de esteroides de la superficie capacitante del espermatozoide (Boerke *et al*, 2008).

El medio en el que la FIV se lleva a cabo es muy diferente del líquido del oviducto, y no hay un solo medio que sea comúnmente utilizado por los investigadores para reproducir las condiciones de fertilización. Por lo que la disponibilidad de calcio en el medio y su absorción posterior por el óvulo o espermatozoide pueden tener efectos potenciales sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} . En los primeros estudios en cerdos se identificó que la concentración de Ca^{2+} en el medio de fertilización es un factor clave (Coy *et al*, 2002). Así mismo también se han identificado sustancias que inducen la RA *in vitro*, como el Ionóforo de calcio en semen fresco y descongelado de ovinos; el fluido sintético de oviducto en semen descongelado; la heparina en semen fresco de ovino y la progesterona en bovinos, cerdos, equinos y humanos (Hernández *et al*, 2005).

En caprinos se han realizado pocos estudios para comparar los medios para la CE y la fertilización de ovocitos; los resultados obtenidos no han sido determinantes, debido a la utilización de diferentes compuestos y protocolos. En cabras adultas, se ha reportado que el uso de mDM (Modified Dulbecco's Medium), tanto para capacitación espermática y fertilización de ovocitos proporciona mejores resultados de penetración que el medio TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate); esto puede ser debido a las condiciones de capacitación espermática, al utilizar heparina y cafeína con el medio rDM o solo heparina con otros medios (Izquierdo *et al*, 1998).

Los medios empleados para la FIV deben favorecer la motilidad y CE, la unión de los gametos y el inicio del desarrollo embrionario. En las cabras, los medios empleados para la CE y la fertilización son el medio TALP y el TCM-199. En cabras se ha reportado una alta fertilización y tasas de división utilizando el medio mDM y TALP para la CE y la fecundación de ovocitos (Izquierdo *et al*, 1998).

Se han desarrollado métodos para la capacitación de espermatozoides de cerdo frescos y congelados en el medio TBM que dio lugar a la exitosa penetración

de ovocitos de hámster por espermatozoides de cerdo. Abeydeera y Day (1996) examinaron la penetración de ovocitos de cerdo con zona intacta por los espermatozoides congelados-descongelados en el medio de fertilización TBM. Y obtuvieron buenos resultados, resaltando la importancia del bicarbonato debido a los efectos que este tiene sobre los espermatozoides.

Coy *et al*, (2002), observaron en un estudio realizado en porcinos que el medio TBM de FIV, induce la RA de manera prematura comparado con el medio TALP por lo que disminuye la motilidad del espermatozoide y por consecuencia hay una menor fertilidad. Así mismo el nacimiento de los lechones después de la FIV se ha conseguido en varias ocasiones, principalmente a través de la utilización de los medios de FIV: TCM-199, TALP y TBM.

Varios métodos han sido aplicados para medir los cambios en la membrana que ocurren durante el proceso de FIV. El método más comúnmente utilizado es la tinción de CTC. Este antibiótico fluorescente se une a la membrana asociando cationes, especialmente Ca^{2+} lo cual exhibe la fluorescencia sobre los segmentos de la membrana donde estos cationes se acumulan. La tinción CTC ha demostrado interactuar con espermatozoides de mamíferos de diferentes especies, que presentan diferentes patrones fluorescentes sobre la cabeza de espermatozoides los cuales se cree que reflejan las diferentes etapas del proceso de capacitación (Fraser *et al*, 1995).

La evaluación de la proporción de espermatozoides capacitados evaluados por medio de la CTC es un método que se ha utilizado con éxito en numerosas especies incluyendo el ratón, hombre y el carnero, ha sido validado para la evaluación de capacitación espermática en semen fresco y congelado-descongelado del jabalí (Marchal, 2002) y en semen de cerdo doméstico almacenado a 16°C (Conejo-Nava *et al.*, 2003).

4. Papel de los componentes de los medios: regulación iónica durante la capacitación

A. Albúmina sérica. La albumina sérica, por lo general de BSA, se cree que tiene la función durante la capacitación *in vitro* de remover el colesterol de la membrana plasmática, lo que explica los cambios en la fluidez de la membrana (Visconti y Kopf, 1998).

B. Calcio. El papel del calcio en la iniciación o regulación de la capacitación es controversial, algunos autores han descrito que durante la capacitación las concentraciones de Ca^{2+} aumentan, mientras que otros han reportado que no cambian. El Ca^{2+} tiene acción a nivel de enzimas involucradas en la transducción de señales del espermatozoide (Visconti y Kopf, 1998).

En el proceso de capacitación el calcio juega un papel importante en la activación de sAC (adenilato ciclasa), AMPc y PKA y en la hiperpolarización de la membrana. Después de dos horas de incubación en el desarrollo de la capacitación en el espermatozoide humano la concentración intracelular de calcio incrementa de 70 a 250 nM; se ha demostrado que en bovinos y porcinos la concentración intracelular de calcio también aumenta. Cuando el espermatozoide no se encuentra capacitado su pH intracelular es ácido, por lo cual no permite la entrada de calcio y previene la capacitación y la reacción acrosomal; durante la capacitación el pH intracelular se vuelve alcalino (Vadnais *et al*, 2007).

C. Bicarbonato. Se ha identificado *in vitro* al bicarbonato (HCO_3^-) como una molécula clave en la capacitación, que desencadena el trastorno de los lípidos en concentraciones registradas *in vivo*. El HCO_3^- en conjunto con el calcio actúa a través de una proteína dependiente de AMPc por la vía de señalización de fosforilación (proteína p32 y proteína tirosina quinasa TK-32) que inicia la desestabilización de la membrana plasmática (Tienthai *et al*, 2004). El bicarbonato activa el sAC para producir un incremento en la concentración de AMPc, en este

paso estimula a la PKA para fosforilar sustratos proteicos desconocidos y permitir la fosforilación de la proteína tirosina (Vadnais *et al*, 2007).

Fisiológicamente las concentraciones de HCO₃⁻ son bajas en el epidídimo y altas en el plasma seminal y en el oviducto (Visconti y Kopf, 1998; Vadnais *et al*, 2007); los cambios en las concentraciones en el aparato reproductor masculino y femenino juegan un papel importante en la supresión de la capacitación en el epidídimo y en la promoción de este proceso *in vivo* en el tracto reproductor femenino (Visconti y Kopf, 1998).

D. Heparina. En estudios sobre capacitación de semen bovino se ha observado que *in vitro* se puede lograr en medios que contienen heparina, en donde el agente capacitante es una heparina como glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos promueven la capacitación al remover las proteínas del plasma seminal que absorbe la membrana plasmática de los espermatozoides y que se considera una función para inhibir la capacitación. La heparina aumenta la síntesis de AMPc, eleva el pH y regula los cambios asociados a la capacitación en la fosforilación de la proteína tirosina (Visconti y Kopf, 1998).

E. Glucosa. En semen de bovino la glucosa inducida por la heparina inhibe *in vitro* la capacitación por un mecanismo que involucra efectos en el metabolismo del AMPc y la reducción del pH (Visconti y Kopf, 1998).

5. JUSTIFICACIÓN

La especie bovina y la porcina, son las más estudiadas en el terreno de la fisiología reproductiva y biología del espermatozoide, estimulando su selección y desarrollo. Por contra, especies como la caprina, han sido relegadas hasta los años 80 debido a su carácter marginal, no existiendo demasiados estudios sobre el comportamiento espermático en esta especie.

Los planes de mejora de una especie se apoyan en distintas técnicas de reproducción con el fin de aumentar las producciones individuales, entre las que se encuentran la Inseminación Artificial (IA), FIV y Transferencia de embriones (TE) principalmente. Los parámetros espermáticos tales como la concentración, movilidad y morfología no son los únicos que se deben tomar en cuenta al realizar estas técnicas. La capacidad fertilizadora conlleva otra serie de características, como es el estado de capacitación (lo cual implica, a su vez, la capacidad del espermatozoide para sufrir la reacción acrosomal), y todo ello con el fin último de conseguir unos óptimos resultados de fertilización. Debido a la gran dificultad que presenta el estudio de la capacitación espermática de manera fisiológica en el tracto reproductor de la hembra, es decir "*in vivo*", se ha conseguido inducir este proceso en el laboratorio mediante técnicas, medios de cultivo y condiciones ambientales determinadas, en lo que se denomina capacitación "*in vitro*". Las técnicas englobadas bajo el término "*in vitro*" no sólo sirven de vehículo a la observación de la biología de la capacitación, sino que además, son utilizadas en reproducción asistida.

Sin embargo, el conocimiento sobre el macho cabrío se ha limitado casi exclusivamente al estudio de diluyentes de refrigeración y congelación para su aplicación en programas IA. Por lo que resulta de gran importancia conservar a los espermatozoides viables para la utilización de FIV.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El medio de FIV comúnmente usado en caprinos es el medio TALP, sin embargo, debido a las experiencias obtenidas de bajo porcentaje de división embrionaria en el laboratorio de Biotecnología Animal del Centro Multidisciplinario en Biotecnología se buscó usar de manera alternativa el medio TBM con el que se han obtenido resultados aceptables.

7. HIPÓTESIS

La utilización del medio TBM es óptimo para la capacitación espermática *in vitro* en la especie caprina.

8. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide caprino incubado en medio TBM.

9. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el porcentaje de espermatozoides caprinos capacitados, no capacitados y reaccionados, incubado en un medio de FIV.
- Evaluar el porcentaje de motilidad *masal* en espermatozoides caprinos incubados en un medio de FIV.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología animal del Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología (CMEB) y en el Sector de Ovinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en el Km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Macho y hembras caprinos, eyaculado, espermatozoides.

4.2 MATERIAL QUÍMICO

Todos los reactivos son de la marca SIGMA

4.3 PREPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Se utilizó semen de un caprino de la raza Saanen de aproximadamente dos años de edad. La recolección se realizó cada 8 días, utilizando la técnica de vagina artificial; se obtuvieron un total de 7 eyaculados. El semen se evaluó en cuanto a sus características macro y microscópicas, posteriormente se diluyó en medio mDM (Modified Dulbecco's Medium) NaCl 112mM, KCl 4.02mM, CaCl₂·2H₂O 2.25mM, MgCl₂·6H₂O 0.22mM, NaH₂PO₄·H₂O 0.83mM, NaHCO₃ 37mM, glucosa 13.90mM, piruvato sódico 1.56mM, BSA al 6% y antibióticos en proporción 1:4 v/v (semen:mDM; respectivamente). Una vez que se obtuvo el eyaculado se practicaron

dos lavados, los cuales consistieron en centrifugar la muestra a 1300 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente, como medio de lavado se utilizó el mDM. El líquido sobrenadante se eliminó y fue reemplazado con igual volumen del medio y se dejó en incubación en un ángulo de 45° durante 45 minutos a 37° C en una atmósfera de 5% CO₂ (Técnica Swim up).

Una vez transcurrido el período de tiempo se tomaron 500µL del sobrenadante que fueron diluidos en 1.5ml medio mDM más heparina (100µg/ml); la muestra se incubó durante 15 minutos bajo las mismas condiciones. Una vez transcurridos estos 15 minutos se diluyeron 10µL de esta solución en 10ml de H₂O para realizar el conteo de espermatozoides en el hematocitometro y obtener la concentración espermática.

En cuatro tubos eppendorf se colocaron 300 µl de TBM y TALP respectivamente y en ellos se depositaron 1.5×10^5 espermatozoides. En otros cuatro tubos eppendorf se colocaron 500 µl de TBM y TALP respectivamente, se depositaron 2.5×10^5 espermatozoides; a los tubos se les hizo un agujero para permitir el paso de CO₂. Posteriormente estas muestras se llevaron a la incubadora a 37°C.

4.4 EVALUACION DE LA MOTILIDAD MASAL

La movilidad *masal* se determinó mediante evaluación visual, se observó en semen fresco y lavado (Técnica Swim up); a los 45 minutos después de haberse incubado en MDM, a los 60 minutos de ser incubado en MDM + Heparina; posteriormente se tomó una alícuota de la solución de esperma incubado en TBM y TALP respectivamente a las 3, 6, 20 y 24 horas. La movilidad masal se determinó colocando una gota de semen en un portaobjetos atemperado a 37 °C y luego se observó al microscopio con aumento de 10x y 40 x.

La motilidad se estimó por el vigor del movimiento de las ondas, utilizando una escala subjetiva del cero al cinco, donde el valor más bajo 0= sin movimiento; 1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión; 2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento; 3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad; 4= movimiento progresivo, rápido; 5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente (Catena y Cabodevila,1999).

4.5 EFECTO DEL MEDIO DE FIV SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

Se utilizaron dos medios de FIV:

Medio 1 (MED1): TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate) NaCl 114mM, KCl 3.20mM, CaCl₂·2H₂O 2.0mM, MgCl₂·6H₂O 0.25mM, NaH₂PO₄ 0.20mM, NaHCO₃ 25mM, Glucosa 5mM, Piruvato Sódico 0.20mM, Lactato de Sodio 10mM, BSA 3g/L e Hipotaurina 1µg/ml. Medio 2 (MED2): TBM (Tris buffered medium), conteniendo NaCl 113mM, KCl 3mM, glucosa 11mM, piruvato sódico 4.99mM, Tris 20mM, CaCl₂·2H₂O 7.4mM, BSA al 0.03%. Ambos medios incluyeron gentamicina.

Para la evolución del estado de capacitación del espermatozoide, se tomó una alícuota de la suspensión del espermatozoide a las 0, 3, 6, 20 y 24 horas para la tinción de CTC y evaluación de la movilidad masal (MM). Un mínimo de 60 espermatozoides fueron contados cada vez y en cada réplica.

4.6 TINCIÓN CLORTETRACICLINA FLUORESCENTE (CTC)

La CTC se preparara a una concentración de 750 μ M, en un amortiguador Tris 20mM, NaCl 130mM, L-cisteína 5mM a un pH final de 7.8 (Conejo *et al*, 2003). La solución se prepara en fresco y se mantiene en oscuridad. Se pesaron 0.0030gr de CTC en total oscuridad, posteriormente se disolvieron en 3ml del buffer.

De los tubos que contenían los medios TBM y TALP se tomó una muestra de semen que fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 100 μ L de glutaraldehído al 0.2% en Tris 0.5M y pH 7.4; en un portaobjetos limpio se tomaron 5 μ L de la suspensión espermática se mezclaron con 5 μ L de la tinción CTC y se depositó una gota en el centro dejándose por 20 segundos, finalmente se añadió una gota de 1.4-Diazabicyclo (2.2.2) octano (DABCO) 0.22M en glicerol al 90% para conservar la fluorescencia, se homogeniza suavemente y se coloca un cubreobjetos.

Para su lectura se utilizó un microscopio de fluorescencia (Optiphot-2, Nikon, Japón), la CTC se observó utilizando una longitud de onda de 495 nm, y se determinó el estado funcional de los espermatozoides de acuerdo con los siguientes patrones de tinción: a) espermatozoides no capacitados (NOCAP), con fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto; b) espermatozoides capacitados (CAP), con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y presencia de acrosoma intacto; c) espermatozoides con reacción acrosomal (REAC), sin fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda en la región ecuatorial (Guerín *et al*, 1999).

4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un experimento factorial con un diseño completamente al azar; donde el factor A fue dos medios a_1 =TALP, a_2 = TBM; y el factor B fueron los tiempos b_1 = 3, b_2 =6, b_3 =20 y b_4 =24.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables dependientes a evaluar fueron movilidad masal (MM) y estado acrosomal de la membrana plasmática: espermatozoides no capacitados (NOCAP), espermatozoides capacitados y espermatozoides reaccionados (REAC); las variables consideradas como independientes serán el tiempo de cultivo (0, 3, 6, 20 y 24). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los valores de capacitado, no capacitados y reaccionados son valores porcentuales, los cuales fueron transformados a arco-seno y posteriormente a raíz cuadrada, para ser sometidos al análisis de varianza con el software SAS.

V. RESULTADOS

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar de espermatozoides Capacitados, No Capacitados y Reaccionados incubados en TALP y TBM.

	CAPACITADOS	NO CAPACITADOS	REACCIONADOS
TRATAMIENTO	PROMEDIO± DS	PROMEDIO± DS	PROMEDIO± DS
TALP	47.79 ± 20.45 a	32.91 ± 26.48 a	19.28 ± 20.54 a
TBM	48.8 ± 23.4 a	29.41 ± 29.24 a	21.77 ± 22.48 a

(a) Literales iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$)

El cuadro 2 muestra la comparación entre los medios de cultivo TALP y TBM donde no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados en relación al medio de fertilización utilizado.

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar de espermatozoides Capacitados, No Capacitados y Reaccionados a las 3, 6, 20 y 24 horas incubados en TALP y TBM.

	CAPACITADOS	NO CAPACITADOS	REACCIONADOS
HORA	PROMEDIO ± DS	PROMEDIO ± DS	PROMEDIO ± DS
3	38.21 ± 19.47 a	57.25 ± 20.73 a	4.51 ± 4.91 a
6	42.95 ± 22.23 a	43.45 ± 21.25 a	13.55 ± 13.53 a b
20	58.80 ± 21.37 a	13.45 ± 20.64 b	27.73 ± 21.28 c b
24	53.21 ± 19.79 a	10.49 ± 15.64 b	36.30 ± 24.89 c

(a) (b) (c) Literales iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

(a) (b) (c) Literales diferentes indican que hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

En el cuadro 3 se muestran los promedios y la DS de los diferentes tiempos de cultivo para ambos medios. Se encontró que con respecto a los tiempos de cultivo no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) para espermatozoides capacitados en TALP y TBM; si existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre 3, 6 y 20, 24 horas para espermatozoides no capacitados tanto en el medio TALP como en el TBM. En los reaccionados la diferencia significativa ($p > 0.05$) se encontró entre las 3 y 24 horas para los dos medios; esta diferencia es lógica debido a que cuanto mayor sea el tiempo de incubación se espera que sea más la cantidad de spz reaccionados.

Cuadro 4. Promedio y desviación estándar de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados incubados en TALP y TBM a las 3, 6, 20 y 24 horas.

OBSERVACIÓN	HORA	TALP	TBM
CAPACITADOS		Promedio ± DS	Promedio ± DS
	3	37.61 ± 20.66a	38.81 ± 19.84 ^a
	6	40.70 ± 18.07a	45.21 ± 27.06 ^a
	20	60 ± 19.07a	57.61 ± 24.94 ^a
	24	52.85 ± 19.54a	53.57 ± 21.60 ^a
NO CAPACITADOS	3	57.60 ± 22.19a	56.91 ± 20.94 ^a
	6	46.41 ± 15.05a	40.50 ± 27.04 ^a
	20	12.62 ± 17.67a	14.27 ± 24.68 ^a
	24	15.01 ± 18.65a	5.97 ± 11.58 ^a
REACCIONADOS	3	4.75 ± 6.12a	4.27 ± 3.82 ^a
	6	12.82 ± 14.29a	14.28 ± 13.83 ^a
	20	27.40 ± 22.56a	28.07 ± 21.73 ^a
	24	32.14 ± 24.15a	40.47 ± 26.82 ^a

(a) Literales iguales indican que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$)

En el cuadro 4 se comparan los promedios y DS de capacitados, no capacitados y reaccionados a diferentes tiempos entre los dos medios de cultivo, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos.

Cuadro 5. Promedio de Movilidad *Masa*

TIPO DE MUESTRA	PROMEDIO
M.M. Fresco	5
M.M. Swim up	4.33
M.M. MDM 45´	4
M.M. MDM+Hep 60´	3
M.M. TALP 3 hrs.	2
M.M. TBM 3 hrs.	2
M.M. TALP 6 hrs.	1.16
M.M. TBM 6 hrs.	1
M.M. TALP 20hrs.	0
M.M. TBM 20 hrs.	0
M.M. TALP 24 hrs.	0
M.M. TBM 24 hrs.	0

En semen fresco la movilidad que se observó fue muy buena, se observaron ondas oscuras muy marcadas en rápido movimiento; después del *Swim up* y de 45´ de incubación en MDM la movilidad fue descendiendo manteniéndose en promedio en el rango de 4 con ondas menos oscuras que el anterior, marcadas pero con movimiento moderado; a los 60´ de incubación en MDM + heparina el promedio fue de 3 y al observarse a las 3 horas posteriores a su incubación en ambos medios se observaron ondas claras con movimiento muy ligero y a las 6 horas apenas se observó ligera ondulación, ya la mayoría de los espermatozoides se mostraron inmóviles. A las 20 y 24 horas los espermatozoides se encontraron muertos, por lo cual no se observaron movimientos.

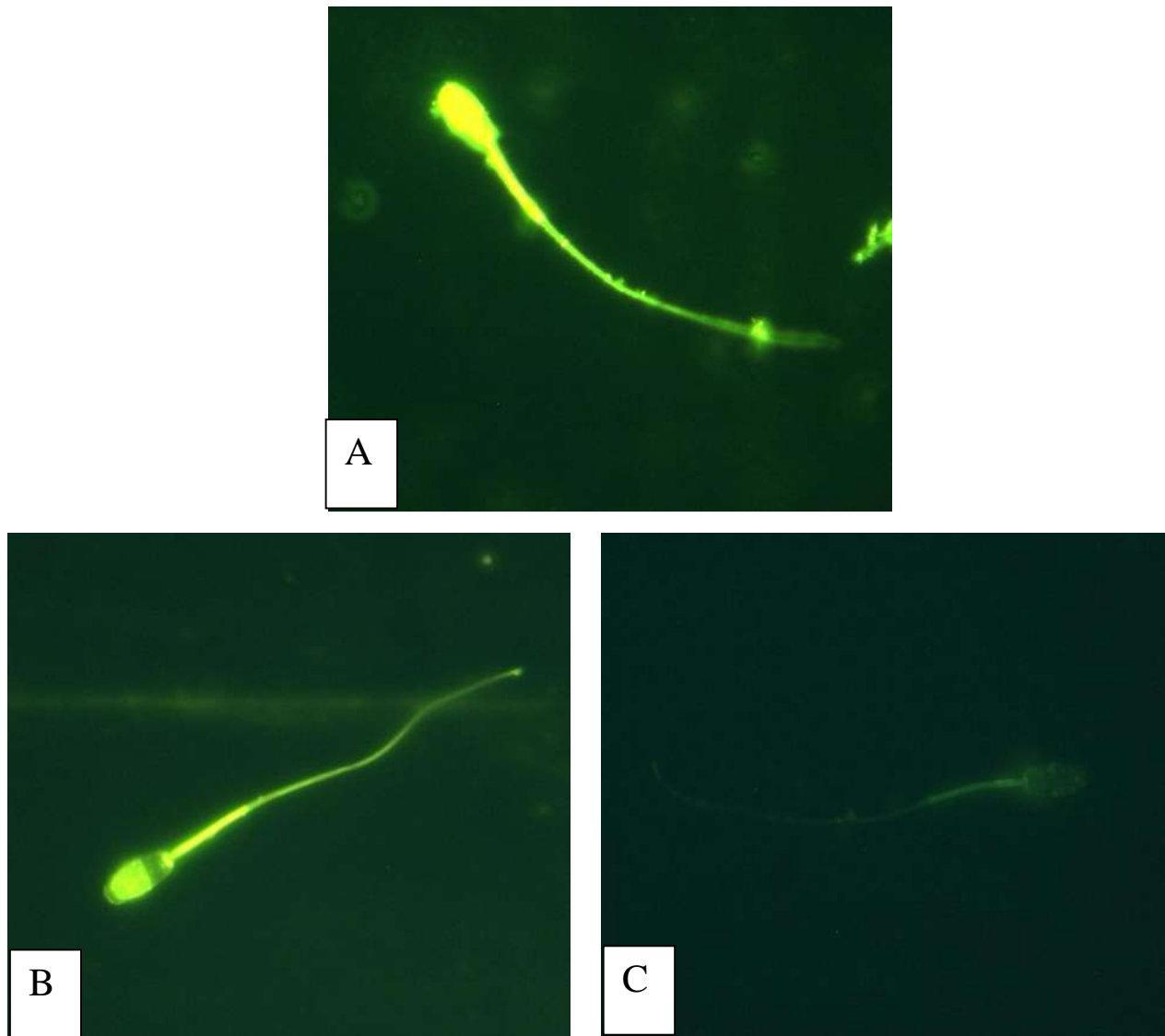


Figura 3. Espermatozoide de Caprino Teñido con CTC. A) No capacitado; B) Capacitado; C) Reacción acrosomal. Observaciones al 100 X.

Los espermatozoides se clasificaron de acuerdo al patrón de fluorescencia que presentaron en: a) no capacitados con fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto; b) espermatozoides capacitados, con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y presencia de acrosoma intacto; c) espermatozoides con reacción acrosomal, sin fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda en la región ecuatorial.

VI. DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue probar el efecto del medio TBM, un medio químicamente semi-definido para la FIV de oocitos de cerdo (Abeydeera y Day, 1997 b), sobre el estado funcional de la membrana plasmática y la sobrevivencia del espermatozoide caprino. El fluido que se utiliza en la FIV es diferente del fluido oviductual y no hay un medio que sea comúnmente utilizado por investigadores para reproducir las condiciones de fertilización (Coy *et al*, 2002). El desarrollo de sistemas de cultivo para la fertilización y la capacitación *in vitro* ha permitido investigar sobre los requerimientos específicos para la adquisición de la función espermática (Abeydeera and Day, 1997 b). La información sobre la producción de embriones de cabra a partir de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* es limitada. Experimentos recientes en IVM, IVF y IVC de ovocitos de cabra ha dado lugar a notables mejoras en la producción *in vitro* de embriones y al nacimiento de cabritos (Izquierdo *et al*, 1998). El medio empleado para la FIV debe ser capaz de proporcionar motilidad espermática y capacitación, la unión de dos gametos y el desarrollo del embrión. En las cabras los medios empleados para la capacitación espermática y la fertilización son el medio TALP, modified Defined Medium y el TCM-199 (Izquierdo *et al*, 1998). En caprinos se han realizado pocos estudios para comparar varios medios para la capacitación espermática y fertilización de ovocitos, los resultados no han sido decisivos debido a la utilización de diferentes componentes y protocolos (Izquierdo *et al*, 1998).

En las condiciones del estudio el uso de TBM (48.8 ± 23.4) mostró un comportamiento similar al TALP (47.79 ± 20.45) obteniéndose buenos resultados en ambos medios para espermatozoides capacitados. En su estudio Coy *et al* (2002) observaron en un estudio realizado en porcinos que en el medio TBM la reacción acrosomal se produjo mucho más rápido en comparación con el medio TCM-199 o medio TALP; el TBM induce la reacción acrosomal de manera prematura comparado con el medio TALP, por lo que, disminuye la motilidad del espermatozoide y por

consecuencia hay una menor fertilidad; en los resultados de su estudio observaron que la proporción de espermatozoides con reacción acrosomal incremento constantemente durante su cultivo en los tres medios de FIV utilizados (TCM-199, TALP y TBM) pero fue más alto con TBM. El medio TBM en comparación con el TALP contenía altas concentraciones de CaCl_2 y no de ion bicarbonato, componente universal presente en algunos medios de FIV; el TBM fue suplementado con Tris el cual es un buffer sintético, con el cual se ha observado que en cerdos ocurre la penetración espermática en un medio libre de bicarbonato suplementado con buffers sintéticos como el Hepes, Tris o Mops (Abeydeera y Day, 1997 b). En ovocitos de ratón el bicarbonato es esencial y en su ausencia la RA puede no ocurrir (Abeydeera y Day, 1997 b). En los resultados del estudio en ambos medios se dio la RA, no se encontraron diferencias significativas. Con el uso de la citometría de flujo se ha demostrado que el bicarbonato estimula tempranamente la entrada de calcio en espermatozoides de cerdo. Además se ha determinado mediante el análisis de CTC que la variación en las concentraciones de bicarbonato estimula significativamente la capacitación y/o reacción acrosomal espontánea de espermatozoides de cerdo incubados en un medio que contiene un nivel constante de iones de calcio (4.7 mM). Es posible que en ausencia de bicarbonato una mayor concentración de calcio en el medio TBM pueda regular el estado funcional de los espermatozoides (Abeydeera y Day, 1997 a).

La movilidad masal fue disminuyendo progresivamente conforme pasaron las horas, la manipulación del semen lavado se ve afectado en su motilidad; sin embargo el uso de la técnica del *Swim up* ayuda a elevar o mantener la movilidad entre el 90-95%; a las 3 horas aún se observó movilidad pero el porcentaje de espermatozoides capacitados era bajo, siendo a las 20 y 24 horas cuando se obtuvo un mayor número de espermatozoides capacitados pero con nula movilidad; por lo cual resulta de interés evaluar si estos espermatozoides pueden ser capaces de fecundar al oocito.

Se ha observado que las tasas de supervivencia de los espermatozoides no son diferentes al utilizar tres medios diferentes, TBM, TALP y M199 después de un período de 6 horas de incubación. Después de 3 horas de incubación en estos medios los porcentajes de espermatozoides capacitados en TBM y M199 no son diferentes, siendo solo un poco menor en TALP, después de 6 horas el porcentaje de capacitados es diferente en los medios (Marchal, 2002).

VII. CONCLUSIONES

- No existe diferencia significativa para espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados en relación al medio de fertilización utilizado. Por lo anterior, el medio TBM se puede usar de manera alternativa para la capacitación espermática con el que se han obtenido buenos resultados.
- Entre las 20 y 24 horas se observó el mayor número de espermatozoides capacitados en ambos medios.
- La movilidad disminuyó conforme pasaron las horas de incubación, pero al utilizar la técnica de *Swim up* la movilidad se puede mantener entre un 90-95%.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Abeydeera, R.L. and Day B.N. (a) 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a Modified Tris-Buffered Medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction* **57**:729-734.
2. Abeydeera, L.R. and Day B.N. (b) 1997. In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered médium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*. **48**:537-544.
3. Boarelli, P.V.; Cattaneo, C.B.; Monclus, M.A. and Fornés, M. 2007. Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana. *Revista Médica Universitaria*. **3** (2):30-41.
4. Boerke, A.; Tsai, P.S.; Garcia, N.G.; Brewis, I.A. and Gadella, B.M. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationships with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*. **70**(8):1188-1196.
5. Breitbart, H. y Spungin, B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction*. **3**(3):195–202.
6. Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. and Breitbart, H. 2003. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*. **68**:837–845.

7. Catena, M. y Cabodevila, J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado Memorias: Simposio Internacional de Reproducción Bovina. Agosto de 1999. pp. 18-31.
8. Companyó M., Iborra A., Villaverde J., Martínez P., Morros A. 2007. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1768**(9):2246-2255.
9. Conejo-Nava, J., Fierro, R., Gutiérrez, C., Betancourt, M. 2003. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16° C. *Archives of Andrology* **49**:287-295.
10. Cormier N. and Bailey, L.J. 2003. A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa. *Biology of reproduction*. **69**:177–185.
11. Coy P., Gadea J., Romar R., Matás and Garcia E. 2002. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*. **124**: 279-288.
12. Cross, N.L. 2004. Reorganization of Lipid Rafts During Capacitation of Human Sperm. *Biology of Reproduction*. **71**:1367-1373.
13. Flesch, 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.

14. Flesch, F.M.; Wijnand, E.; Van de Lest, C.H.A.; Colenbrander, B.; Van Golde, L.M.G. and Gadella, B.M. 2001. Capacitation Dependent Activation of Tyrosine Phosphorylation Generates Two Sperm Head Plasma Membrane Proteins With High Primary Binding Affinity for the Zona Pellucida. *Molecular Reproduction and Development*. **60**:107:115.
15. Fraser, L.R.; Abeydeera, L.R. and Niwa K. 1995. Ca (2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod.Dev.* **40**(2):233-241.
16. Gadella, B.M.; Tsai, P.; Boerke, A. and Brewis, I. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 473-480.
17. Hernández, P.J.E.; Fernández, R.F. y Torres, H.J.G. 2005 Capacitación y reacción acrosomal *in vitro* de espermatozoides post-descongelados de ovino. *Rev. Salud animal.* **27**(1):41-47.
18. Ho, H.-C. y Suarez, S.S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction.* **122**:519-526.
19. Izquierdo, D.; Villamediana, P.; Palomo, M.J.; Mogas, T. and Paramio, M.T. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology.* **49**:1501-1513.
20. Marchal R., Peláez J., Terqui M. and Mermillod P. 2002. Effect of sperm survival CTC staining pattern on in vitro fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology.* **57**:1917-1927.

21. Olivera, M.; Ruíz, T.; Tarazona, A. y Giraldo, C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Co. Cienc. Pec.* **19**:426-436.
22. Rodríguez, M.H. 2007. Role of the oviduct in the sperm capacitation. *Theriogenology.* **68**:138-146.
23. Rodríguez, A.F.A.; Ávila, C.A.C.O.; Anchondo, G.A.; Sánchez, R.B. y Jiménez, C.J.A. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia.* **42**(4):399-406.
24. Salgado, R.D.; Rugeles, C.C. and Álvarez J. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. *Rev. Co. Cienc. Pec.* **18**:122-126.
25. Severiano, J.E. 2007. Fundamentos del sexado de espermatozoides en bovinos. Memorias: Biotecnologías Reproductivas en Bovinos. México, D.F. Noviembre de 2007. pp. 238-239.
26. Sostaric, E.; Van de Lest, C.H.; Colenbrander, B. and Gadella, B.M. 2005. Dynamics of carbohydrate affinities at the cell surface of capacitating bovine sperm cells. *Biology of Reproduction.* **72**(2):346-357.
27. Tienthai, P.; Johannisson, A. and Rodriguez, H.M. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science.* **80**:131-146.
28. Vadnais, L.M.; Galantino-Homer, L.H. and Althouse, C.G. 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Andrology: Journal of Reproductive Systems.* **53**:109-123.

29. Visconti, P.E. and Kopf, G.S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. **59**:1-6.
30. Yangimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Ed. Raven Press. pp.189-317.