

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 8 3 9 8 5 7 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**EFFECTO DE LA CONSERVACIÓN SOBRE LA  
FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO**

Memoria presentada por la licenciada Dña. Susana Cortés Gallego  
para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.



ARCHIVO

Vº Bº

Dra. Isabel Vázquez González

Dra. Rocio Núñez Calonge

Dña. Susana Cortés Gallego

**A MIS PADRES**

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento por la inestimable ayuda aportada a lo largo de este trabajo:

A Isabel Vázquez González y Rocío Núñez Calonge, por todos los conocimientos que me han transmitido y especialmente por saber sacar de mi el máximo rendimiento con su amistad, comprensión y apoyo.

A Antonio López Sebastián, Coordinador del Área de Reproducción Animal donde ha sido desarrollado este trabajo.

A M<sup>a</sup> Luisa Vinader Marquina, por su ayuda en la parte experimental de este trabajo y sin la cual habría sido demasiado tedioso y aburrido.

A Concepción Díaz Yubero y Purificación Martín Sanz, por su ayuda y paciencia demostrada conmigo en la realización de todos los diluyentes y reactivos químicos necesarios en este trabajo.

A M<sup>a</sup> Carmen Garcia Yanes por su ayuda a la hora de resolver los problemas de tipo administrativo.

A Gustavo Barja de Quiroga por haber aceptado la tutoria de esta Tesis.

A Blanca de la Fuente, por su inestimable ayuda en el análisis de los resultados.

A Pedro Lorenzo por su colaboración en el desarrollo de la fecundación "in vitro".

A Pedro Caballero y su equipo por su apoyo y amistad, y en especial a Federico Parra por ayudarme con infinita paciencia a resolver la multitud de interrogantes informáticos.

A Concepción Borque Ibarra, Raúl Sanchez, Pedro G<sup>a</sup> Casado, Amelia Gómez Brunet, M<sup>a</sup> Jesus Cocero y Blanca Cabellos por el constante interés demostrado en estos

años, y especialmente a Ana del Campo, Marta G<sup>a</sup> López, Rosana Picazo, Antonio González-Bulnes y Julián Santiago por su apoyo incondicional así como por su ayuda en todo lo referente a la salud y bienestar de los machos cabríos utilizados.

A Juan Carlos Gonzalez, Alfredo Manjón, Alejandro Checa y Claudio Benito, no solo por su ayuda y firme colaboración en todo lo referente al mantenimiento y entrenamiento de los animales sino por su humor y amistad.

A todos mis amigos por su inestimable ayuda y apoyo constante durante estos años.

A mis abuelos, tíos, primos, y familia Moya, por su eterno cariño y preocupación demostrada durante el desarrollo de esta Tesis.

A Antonio Ferruelo por soportar mis nervios y mal humor en la recta final de este trabajo, y sobre todo por las horas que no le he dedicado.

A mis padres y hermana, por su estímulo y apoyo, sin los que me hubiese resultado difícil finalizar esta memoria, así como por su paciencia, cariño y amor que siempre me han dado.

A mis “chivos”, sin los cuales indudablemente no hubiese sido posible realizar este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el M.A.P.A. (R-18819) sin cuya aportación no hubiese sido posible la finalización de esta Tesis.



## INDICE

<b>1.- <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.- <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	5
<b>2.1. RECOGIDA Y CONTRASTACIÓN SEMINAL</b> .....	6
<b>2.1.1. <u>Recogida de semen</u></b> .....	6
2.1.1.1. Vagina artificial .....	7
<b>2.1.2. <u>Contrastación seminal</u></b> .....	11
2.1.2.1. Análisis macroscópico .....	12
2.1.2.1.1. Volumen .....	12
2.1.2.1.2. Aspecto físico .....	12
2.1.2.2. Análisis microscópico .....	13
2.1.2.2.1. Movilidad masal .....	13
2.1.2.2.2. Movilidad individual .....	13
2.1.2.2.3. Concentración espermática .....	14
2.1.2.2.4. Formas anormales .....	15
2.1.2.2.5. Complejo acrosómico .....	16
2.1.2.2.6. Test de permeabilidad de membrana .....	18
2.1.2.2.7. Tinciones vitales .....	19
2.1.2.3. Análisis bioquímico .....	20
<b>2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EYACULADO DEL MACHO CABRÍO</b> .....	21
<b>2.3. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO</b> .....	25
<b>2.3.1. <u>Dilución</u></b> .....	26
<b>2.3.2. <u>Diluyentes</u></b> .....	27
<b>2.3.3. <u>Diluyentes de refrigeración</u></b> .....	29

2.3.3.1. Leche de vaca .....	30
2.3.3.2. Yema de huevo .....	31
2.3.3.3. Agua de coco .....	32
<b>2.3.4. <u>Diluyentes de congelación</u> .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.5. <u>Refrigeración de semen caprino</u> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.6. <u>Congelación de semen caprino</u> .....</b>	<b>35</b>
2.3.6.1. Descongelación de dosis .....	38
<b>2.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4.1. <u>Membrana plasmática</u> .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.2. <u>Regulación iónica durante la capacitación</u> .....</b>	<b>44</b>
2.4.2.1. Iones Calcio .....	44
2.4.2.2. Iones Sódio y Potasio .....	46
<b>2.4.3. <u>Factores de decapitación</u> .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.4. <u>Hiperactivación</u> .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.5. <u>Reacción acrosómica</u> .....</b>	<b>49</b>
2.4.5.1. Inductores de la reacción acrosómica .....	53
2.4.5.1.1. Ionóforos .....	53
2.4.5.1.2. Zona pelúcida .....	55
2.4.5.1.3. Líquido folicular, oviductal y células del cúmulo .....	56
2.4.5.1.4. Progesterona .....	56
2.4.5.1.5. Moduladores metabólicas .....	57
2.4.5.1.6. Efecto de la disminución térmica .....	57
2.4.5.1.7. Otros factores .....	58
2.4.5.2. Técnicas de detección de la RA .....	59
<b>2.4.6. <u>Capacitación “in vitro”</u> .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5. FECUNDACIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>2.5.1. <u>Fecundación “in vitro”</u> .....</b>	<b>65</b>

2.5.2.1. Test de Hamster .....	68
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>72</b>
<b>3.1. MATERIAL .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1.1. <u>Material biológico</u> .....</b>	<b>73</b>
3.1.1.1. Machos reproductores .....	73
3.1.1.2. Huevos de gallina .....	73
3.1.1.3. Ovocitos de hamster .....	74
<b>3.1.2. <u>Material empleado en la recogida del semen</u> .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1.3. <u>Material empleado en la conservación del semen</u> .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.4. <u>Material de laboratorio</u> .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.5. <u>Material químico</u> .....</b>	<b>77</b>
3.1.5.1. Reactivos utilizados en la conservación del semen (refrigeración y congelación) .....	77
3.1.5.2. Reactivos utilizados en la triple tinción .....	77
3.1.5.3. Reactivos utilizados en la inducción de la reacción acrosómica .....	78
3.1.5.4. Reactivos utilizados en la tinción vital .....	78
3.1.5.5. Reactivos utilizados en el sistema FIV .....	78
3.1.5.6. Otros reactivos .....	79
<b>3.2. MÉTODO .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.1. <u>Obtención y contrastación seminal</u> .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.2. <u>Capacitación de semen fresco</u> .....</b>	<b>82</b>
3.2.2.1. Medio de lavado. PBS-Dm .....	82
3.2.2.2. Medio de cultivo. BWW .....	83
3.2.2.3. Capacitación de semen fresco .....	84
<b>3.2.3. <u>Capacitación de semen refrigerado</u> .....</b>	<b>86</b>
3.2.3.1. Diluyentes de refrigeración .....	86
3.2.3.2. Refrigeración de semen caprino .....	88

3.2.3.3. Capacitación de semen refrigerado .....	90
<b>3.2.4. <u>Capacitación de semen congelado</u></b> .....	92
3.2.4.1. Diluyentes de congelación .....	92
3.2.4.2. Congelación de semen caprino .....	92
3.2.4.3. Descongelación de dosis seminales .....	94
3.2.4.4. Capacitación de semen congelado .....	94
<b>3.2.5. <u>Contrastación del semen capacitado</u></b> .....	96
3.2.5.1. Movilidad individual .....	96
3.2.5.1.1. Solución acuosa de citrato sódico isoosmótico.....	96
3.2.5.1.2. Protocolo.....	96
3.2.5.2. Índice de vitalidad .....	97
3.2.5.2.1. Solución de trabajo de naranja de acridina.....	97
3.2.5.2.1. Protocolo.....	98
3.2.5.3. Estatus acrosomal .....	99
3.2.5.3.1. Glutaraldehido al 2% en BL-1.....	99
3.2.5.3.2. Protocolo.....	99
3.2.5.4. Test de permeabilidad de membrana .....	101
3.2.5.4.1. Solución hiposmótica.....	101
3.2.5.4.2. Protocolo.....	101
3.2.5.5. Triple tinción .....	103
3.2.5.5.1. Colorantes empleados en la triple tinción.....	103
3.2.5.5.2. Protocolo.....	103
<b>3.2.6. <u>Inducción de la reacción acrosómica</u></b> .....	106
3.2.6.1. Ca <sup>2+</sup> ionóforo. Solución de trabajo.....	106
3.2.6.2. Protocolo.....	106
<b>3.2.7. <u>Test de hamster (T.H.)</u></b> .....	109
3.2.7.1. Descongelación de ovocitos.....	109
3.2.7.2. Protocolo.....	110

<b>3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	115
<b>3.3.1. <u>Experiencia 1: Efecto de los procesos de conservación del semen caprino sobre su perfil de capacitación y viabilidad espermática “in vitro”</u></b> .....	115
<b>3.3.2. <u>Experiencia 2: Efecto inductor del Ca<sup>2+</sup> ionóforo sobre la reacción acrosómica en semen caprino heterospérmico puro, refrigerado y congelado (Test ARIC)</u></b> .....	115
<b>3.3.3. <u>Experiencia 3: Fecundación “in vitro” en semen caprino capacitado. Correlación con otras técnicas laboratoriales</u></b> .....	116
<b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	116
<b>4. RESULTADOS</b> .....	118
<b>4.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE SU PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA “IN VITRO”</b> .....	119
<b>4.1.1. <u>Capacitación de semen caprino fresco</u></b> .....	119
4.1.1.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles y vivos .....	121
4.1.1.2. Evolución de la calidad de movimiento .....	122
4.1.1.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica y endósmosis positiva .....	123
4.1.1.4. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal .....	124
<b>4.1.2. <u>Capacitación de semen caprino refrigerado</u></b> .....	127
4.1.2.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles.....	127

4.1.2.2. Evolución de la calidad de movimiento .....	129
4.1.2.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos .....	130
4.1.2.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica .....	132
4.1.2.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva .....	133
4.1.2.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal .....	135
4.1.2.7. Influencia de la refrigeración sobre el perfil de capacitación del semen caprino .....	141
<b>4.1.3. Capacitación de semen caprino descongelado</b> .....	143
4.1.3.1. Evolución del porcentaje de espermatozoides móviles.....	144
4.1.3.2. Evolución de la calidad de movimiento .....	145
4.1.3.3. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos .....	147
4.1.3.4. Evolución del porcentaje de espermatozoides con normalidad acrosómica .....	148
4.1.3.5. Evolución del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva .....	150
4.1.3.6. Evolución de la vitalidad espermática y estatus acrosomal .....	151
4.1.3.7. Influencia de la congelación sobre el perfil de capacitación del semen caprino .....	157
<b>4.1.4. Influencia de los procesos de conservación espermática sobre la capacitación del semen caprino</b> .....	159

**4.2. EFECTO INDUCTOR DEL CA 2+ IONÓFORO SOBRE  
LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO**

<b>HETEROSPÉRMICO PURO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC) .....</b>	<b>166</b>
<b>4.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS .....</b>	<b>173</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>177</b>
<b>5.1. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO SOBRE SU PERFIL DE CAPACITACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA “IN VITRO” .....</b>	<b>178</b>
<b>5.2. EFECTO INDUCTOR DEL CA 2+ IONÓFORO SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN SEMEN CAPRINO HETEROSPÉRMICO PURO, REFRIGERADO Y CONGELADO (TEST ARIC) .....</b>	<b>184</b>
<b>5.3. FECUNDACIÓN “IN VITRO” CON SEMEN CAPRINO CAPACITADO. CORRELACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS .....</b>	<b>188</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>191</b>
<b>7. RESUMEN .....</b>	<b>193</b>
<b>7.1. SUMMARY .....</b>	<b>196</b>
<b>8. ABREVIATURAS .....</b>	<b>198</b>

**9. BIBLIOGRAFÍA..... 202**



## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Las implicaciones económicas derivadas de la producción de ciertas especies ganaderas han hecho que aquellas de mayor rendimiento, sobre todo la bovina y la porcina, sean 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.

No obstante, los excedentes generados de carne y leche, no sólo en España sino también en la Unión Europea en los 90, han obligado a los ganaderos a un cambio de mentalidad, incorporando nuevas tecnologías para aumentar las productividades individuales. Esta nueva adaptación del sector implica la utilización de programas de selección genética e incorporación de técnicas de Reproducción Asistida, principalmente de la Inseminación Artificial (I.A.) debido a su bajo coste y buenos resultados. La inseminación se realizará con células espermáticas conservadas durante unas cuantas horas (semen refrigerado) o durante tiempos más prolongados que implican la utilización de sustancias criogénicas con el fin de mantener la viabilidad celular durante largos periodos de tiempo (semen congelado).

Sin embargo, uno de los problemas esenciales que se nos plantean a la hora de planificar un programa de IA es la elección de los animales reproductores, los cuales no sólo han de presentar un buen estado fisiológico y morfológico de acuerdo con la raza, sino que nos es preciso conocer e identificar todos los procesos implicados en el sistema reproductor con el fin de eliminar los animales infértiles o subfértiles.

Los espermatozoides obtenidos inmediatamente tras la eyaculación no poseen las condiciones necesarias para poder penetrar las cubiertas del ovocito e iniciar los procesos de fusión gamética. El proceso que lo habilita para la fertilización del gameto

femenino, y que se conoce bajo el término de "capacitación", se realiza en el tracto genital de la hembra durante el tiempo que los espermatozoides atraviesan la vagina, cervix, cuernos uterinos y oviductos. Este proceso aún no está bien definido ni estudiado, sobre todo en el caso del ganado caprino, siendo su conocimiento determinante para conseguir unos buenos resultados de fertilidad desde el punto de vista de producción animal.

El proceso de elaboración de las dosis seminales es de vital importancia para que, cuando se realice la inseminación de las mismas en el tracto de la hembra, se logren unas tasas altas de fecundación. Hasta ahora, parámetros espermáticos tales como la concentración, movilidad y morfología eran los únicos que se tenían en cuenta a la hora de evaluar un eyaculado. No obstante, 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 acrosómica), y todo ello con el fin último de conseguir unos óptimos resultados de fertilización. 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 de inseminación artificial, no encontrando apenas bibliografía del efecto que ejercen dichos medios sobre la fisiología espermática.

Debido al papel decisivo que juega la capacitación espermática en los procesos de fertilización "in vivo" y al escaso conocimiento que sobre dichos procesos fisiológicos que se tiene en el ganado caprino, se planteó el estudio del efecto ejercido por los diluyentes utilizados en la refrigeración y congelación de semen caprino de manera rutinaria, así como la metodología empleada para dicho fin sobre la viabilidad y capacidad fecundante del espermatozoide de macho cabrío.

## **1.1. OBJETIVOS**

Bajo esta hipótesis de trabajo se definieron los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar el perfil de capacitación y reacción acrosómica en semen caprino en dosis heterospérmicas.
  
- 2.- Determinar la influencia de los procesos de refrigeración y congelación de dosis seminales sobre dicho perfil.
  
- 3.- Determinar el efecto inductor del calcio ionóforo sobre la fisiología espermática caprina y su posible utilización como método de diagnosis de la influencia de los procesos de conservación espermática sobre la capacidad fertilizante de un eyaculado.
  
- 4.- Establecer la relación existente entre todos los parámetros estudiados anteriormente “in vitro” y el test de hamster.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1. RECOGIDA Y CONTRASTACIÓN SEMINAL**

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), Fecundación "in vitro" (FIV) y Transferencia de embriones (TE) principalmente. Sin embargo, el método más rápido de mejora genética dentro de una explotación es la utilización de la IA a partir de sementales portadores de los caracteres deseados, siendo aproximadamente su influencia de un 30-40% sobre la producción individual de las hijas.

La fase inicial de un programa de inseminación artificial es la selección de los reproductores en base a su valor individual (características morfológicas y fisiológicas, edad, ...), estado sanitario, aptitud dentro de la explotación (lechera o cárnica) y datos de producción de sus descendientes (Cuenca Sánchez, 1982; Quittet, 1986). La observación del comportamiento sexual del macho cabrío, libido y fertilidad, es otro factor determinante en la elección de los sementales, ya que un macho con buena fertilidad pero baja actividad sexual presentará problemas tanto en el número de hembras cubiertas por monta natural o dirigida como en la recogida de semen con vagina artificial (Maxwell y Evans, 1990).

### **2.1.1. RECOGIDA DE SEMEN**

La recogida del semen se puede realizar empleando diversas metodologías, siendo las más empleadas en pequeños rumiantes: post-coital, electroeyaculación y vagina artificial (Graham et al., 1978 a; Pérez y Pérez, 1986; Maxwell y Evans, 1990). La utilización de uno u otro método está en función de las características del macho reproductor, utilizando el post-coito y la electroeyaculación en individuos con problemas físicos que imposibilitan la monta, así como en animales jóvenes y en machos

mal entrenados que se niegan a saltar en presencia del personal técnico.

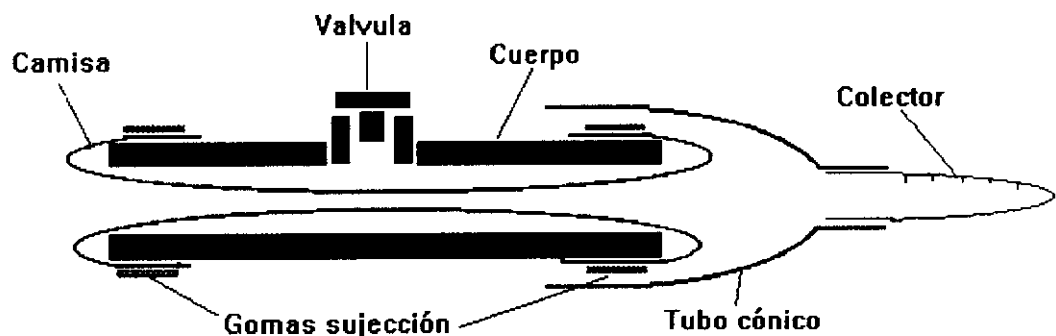
La obtención de semen post-mortem es un método utilizado en animales que mueren en pleno rendimiento funcional y en especies salvajes o asilvestradas abatidas en cacerías (ciervo, gamo, muflón, ...), obteniendo un número limitado de dosis (**Garde et al., 1996; Vinader et al., 1996 b**). La existencia de animales salvajes en cautiverio permite obtener dosis seminales mediante electroeyaculación o vagina artificial, si bien, debido al riesgo de aplicación de la electroeyaculación, se tiende a la utilización de la vagina artificial en especies cinegéticas, siendo un requisito imprescindible la domesticación de los sementales (**Krzywinski y Jaczewski, 1978; Cortés et al., 1996**).

#### **2.1.1.1. VAGINA ARTIFICIAL**

La recogida de semen mediante vagina artificial es el método más usado en ganado ovino y caprino debido a su rapidez y limpieza, permitiendo la obtención de varios eyaculados consecutivos (**Abraham y Agranz, 1987; Maxwell y Evans, 1990; Herrera et al., 1994**). Sin embargo, su empleo requiere el entrenamiento de los sementales, existiendo machos que se habitúan sin dificultad a la vagina artificial, mientras que otros no son capaces de vencer la inhibición de la conducta sexual provocada por la presencia del hombre (**Maxwell y Evans, 1990**). En nuestra experiencia personal, el porcentaje de machos que no logran ser entrenados es inferior al 5%.

La vagina artificial, diseñada originalmente por Spallanzani para perro, ha sufrido diversas modificaciones en cuanto a su longitud y diámetro en función de las características anatómicas y fisiológicas de cada especie. La vagina artificial utilizada para pequeños rumiantes (**Fig. 1**) (**Maxwell y Evans, 1990**) consta de:

- 1) *Cuerpo rígido* (de metal o caucho), que incluye una válvula de doble espita a través de la cuál se añade agua y aire;
- 2) *Camisa interna*, de pared delgada que forma una cámara al doblarse hacia el exterior;
- 3) *Tubo cónico* o intermediario, que sirve de unión entre el cuerpo rígido y el tubo colector;
- 4) *Tubo colector*, situado al final del tubo cónico y generalmente de 10 ml de capacidad, graduado en 0,1 ml;
- 4) *Manta*, encargada de mantener la temperatura y proteger el semen frente a la luz .



**Fig.1.-** Sección esquemática de la vagina artificial diseñada para ovino y caprino



La vagina artificial se carga con agua caliente a 50°C y se insufla aire a través de su doble válvula con el objetivo de imitar las condiciones fisiológicas de temperatura y presión de la vagina de la hembra. La temperatura en el momento de la recogida debe estar entre 40 y 45°C. La presión más aceptada por los sementales se logra insertando el dedo índice de la mano dentro de la cavidad de la vagina artificial, debiéndose sentir una pequeña presión (Maxwell y Evans, 1990). Tras su montaje, la vagina artificial permanecerá en una estufa de 37°C hasta el momento de su utilización. En programas de selección es imprescindible asignar una vagina artificial a cada macho con el fin de no mezclar eyaculados.

Para condicionar el reflejo eyaculatorio del macho cabrío se utiliza una cabra ovariectomizada e inmovilizada mediante un potro de sujeción. El operario, situado en el lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco, sujetándola con la mano derecha de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho y abajo, con una inclinación aproximada de 45°. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo, evitando el contacto con el animal. En el momento del salto, se dirige con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico "golpe de riñón" y eyacula dentro del extremo superior del tubo recolector (Quittet, 1986; Maxwell y Evans, 1990) (Fig. 2).



**Fig. 2.-** Obtención de semen de macho cabrío mediante vagina artificial

El régimen sexual a que se someten los sementales incide sobre la calidad seminal de los eyaculados obtenidos (Okere et al., 1986; Thwaites, 1995), siendo la frecuencia de recogida de semen establecida en dos veces por semana en los animales más jóvenes, mientras que en individuos adultos puede aumentarse a tres obtenciones, recogándose en cualquier caso dos eyaculados consecutivos (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Herrera et al., 1994).

El ritmo de recogida más frecuentemente empleado según la bibliografía es de un eyaculado en una o dos sesiones/semana (Corteel, 1976; Mann, 1981;

**Greyling y Grobbelaar, 1982).** Nuestra experiencia demuestra que los machos con baja frecuencia de recogida producen eyaculados con tendencia a la aglutinación.

### **2.1.2. CONTRASTACIÓN SEMINAL**

El análisis del semen tiene por objeto valorar la calidad de un eyaculado, y la funcionalidad del macho como reproductor. Actualmente, existen múltiples técnicas de laboratorio para la determinación de la calidad seminal, no siendo aconsejable la utilización de un solo análisis para valorar la viabilidad del semen (**Hafez, 1989; Maxwell y Evans, 1990; Boixo, 1994**).

El método definitivo en la valoración de la capacidad fecundante del semen es el nacimiento de un nuevo individuo. Sin embargo, el tiempo y dinero requerido para ello hacen que los ensayos de fertilidad en campo mediante la cubrición de hembras no sean frecuentemente utilizados, tratando de desarrollar métodos alternativos "in vitro" que se correlacionen con la fertilidad.

La necesidad de utilización de diferentes técnicas en la valoración de la calidad de un eyaculado se debe a la falta de existencia de una sola prueba que determine su fecundidad, debido en gran parte, a que el espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por multitud de factores externos "in vitro" (tratamientos seguidos en el laboratorio para su capacitación, conservación, ...) o "in vivo" (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra).

## **2.1.2.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO**

### **2.1.2.1.1. Volumen**

La determinación del volumen se realiza inmediatamente después de su recogida, valorándolo directamente en el tubo colector (graduado en 0,1 ml), evitando el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (Maxwell y Evans, 1990). La determinación precisa del volumen de un eyaculado es imprescindible para determinar el número total de espermatozoides contenido en el mismo.

El volumen medio de un eyaculado en ganado caprino es de 1 ml, existiendo variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Derivaux, 1982; Memon et al., 1986; Pérez, 1992; Cortés et al., 1994b).

### **2.1.2.1.2. Aspecto físico**

El color del semen caprino varía del blanco cremoso al amarillento. Dicha coloración, producida por la presencia de riboflavinas en el plasma seminal (Mendoza et al., 1989), está sujeta a variaciones raciales e individuales. Tonalidades grises y/o pardas, y rosáceas son indicadores de contaminación y/o infección del sistema reproductor; y de la presencia de hematíes en el semen (debido principalmente a lesiones del pene durante la recogida) respectivamente (Abraham, 1987).

La densidad que presenta el semen de pequeños rumiantes es debido a su alta concentración (Maxwell y Evans, 1990).

## **2.1.2.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO**

### **2.1.2.2.1. Movilidad masal**

Esta prueba valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento sólo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (**Carbonero, 1954; Maxwell y Evans, 1990**).

La valoración de la movilidad masal se realiza mediante microscopía óptica a 10x sobre una gota de semen puro colocada sobre un portaobjetos atemperado a +37°C. La clasificación varía en función de la escala utilizada: de 0 a 5 (**Maxwell y Evans, 1990**); 0 a ++ (**Pérez y Pérez, 1986**).

### **2.1.2.2.2. Movilidad individual**

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide (**Maxwell y Evans, 1990; Pomerol y Arrondo, 1994**).

La movilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10x ó 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (**Maxwell y Evans, 1990**). La utilización de métodos fotográficos y sistemas computerizados han relegado a un segundo plano la valoración subjetiva por parte de los técnicos (**O'Connor et al., 1981; Hunter, 1982; Burkman, 1995**). Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por

ordenador ó sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angularidad (O'Connor et al., 1981; Jasko et al., 1988; Tuli et al., 1992; Theau-Clement et al., 1996), que colaboran en el establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Ginsburg et al., 1988; Burkman, 1995; Nuñez et al., 1996).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de especie y del estado fisiológico en que se encuentre. (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación, ...) (Ginsburg et al., 1988; Pérez et al., 1994; Burkman, 1995; Vinader et al., 1996 a), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Maxwell y Evans, 1990).

Existen variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de macho cabrío, estando relacionadas con la fertilidad (Maxwell y Evans, 1990; Pérez, 1992).

#### **2.1.2.2.3. Concentración espermática**

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) de eyaculado. Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y seguridad.

La determinación de la concentración espermática mediante hematímetros y cámaras cuentaglobulos se realiza tras una dilución 1/200 en una solución acuosa de Eosina básica. Si bien esta técnica es muy segura, el tiempo requerido para cada

contaje hace que dicha técnica sólo se aplique cuando el número de muestras a evaluar no sea muy grande (Sorensen, 1982; Abraham, 1987).

Otro método de recuento directo es la utilización de contadores de partículas (Vázquez et al, 1984 b; Maxwell y Evans, 1990), de gran precisión y seguridad; sin embargo, el alto costo de estos sistemas han impedido su amplia difusión.

La técnica más empleada en la valoración de la concentración espermática es la espectrofotometría. La concentración seminal es obtenida mediante una tabla de conversión, asignando a cada valor de transmitancia un valor de concentración previamente calculado mediante recuento directo ó contador de partículas (Sorensen, 1982; Boixo, 1994). Las diferentes tonalidades de color presentes en los eyaculados caprinos no interfieren en el resultado obtenido mediante esta técnica debido al título de la dilución empleada (Campos et al., 1994).

La concentración media estimada en el ganado caprino es de 2.500 a 3.000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990), siendo susceptibles a variaciones estacionales, raciales e individuales (Memon et al., 1986; Corteel, 1981 ;Pérez, 1992; Cortés et al., 1994b). Las diferencias entre eyaculados son menores cuando los machos están sometidos a un ritmo periódico de recogidas.

#### **2.1.2.2.4. Formas anormales**

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal con el objetivo de eliminar aquellos individuos no aptos para la reproducción. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar

asociada con una inmadurez sexual, a procesos degenerativos y patológicos (Smith y Sherman, 1994) e incluso con un excesivo ritmo de recogida.

El porcentaje de las morfoanomalías encontradas en el semen parece ser un buen indicador de las lesiones o fisiopatologías del aparato reproductor masculino (Smith y Sherman, 1994; Pomerol y Arrondo, 1994).

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que destacamos la Eosina-nigrosina (Colas, 1980; Maswell y Evans, 1990; Smith y Sherman, 1994), cristal violeta (Carbonero, 1954; Derivaux, 1982; Abraham, 1987) y nitratos de plata (Chinoy et al., 1992). La introducción de los sistemas C.A.S.A. ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Sancho et al., 1994; Gravance et al., 1995; Ball y Mohammed, 1995; Casey et al., 1997). Sin embargo, la fijación en suero salino formolado o en glutaraldehído al 2% en BL-1 (sin tinción previa) y posterior observación en microscopio de contraste de fases, es el método más extendido para la detección rutinaria de formas anormales en animales domésticos (Memon y Ott, 1981; Volglmayr et al., 1983; Smith y Sherman, 1994).

Un eyaculado de macho cabrío se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15% (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990). Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés, factor individual, temperatura, estación del año, ... (Smith y Sherman, 1994).

#### **2.1.2.2.5. Complejo acrosómico**

El acrosoma es una estructura membranosa localizada en la parte anterior de



la cabeza, recubriendo la parte superior del núcleo (Fawcett, 1975; Curry y Watson, 1995). Dicha vesícula, procedente del aparato de Golgi, es considerado como un lisosoma especializado rico en carbohidratos, hidrolasas ácidas y tripsin-proteasas (Fawcett, 1975; Carbonero y Vázquez, 1984; Brucker y Lipford, 1995).

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas del acrosoma parecen asociarse con una baja capacidad fecundante del esperma, ya que en condiciones fisiológicas sólo los espermatozoides capaces de experimentar la reacción acrosómica en las proximidades del ovocito serán capaces de atravesar la zona pelúcida y penetra el gameto femenino (Pomerol y Arrondo, 1994; Curry y Watson, 1995).

La valoración del estado acrosomal se puede realizar mediante microscopía óptica de campo claro en muestras previamente teñidas con Giemsa (Watson, 1975; Derivaux, 1982; Way et al., 1995); microscopía de contraste de fases por inclusión de las muestras en una solución de glutaraldehído al 2% en BL-1 (Vázquez, 1980b; Carbonero y Vázquez, 1984) y microscopía electrónica (Tasseron et al., 1977; Liu y Gordon, 1994). Otras técnicas aprovechan la afinidad de ciertas lectinas (Way et al., 1995; Liu y Gordon, 1996) o anticuerpos (Fénichel et al., 1989; Cortés et al., 1994 a; Moutaffian y Parinaud, 1995) para fijarse al acrosoma y determinar su estado.

La triple tinción, descrita originalmente para semen humano (Talbot y Chacon, 1981), adaptada a distintas especies animales (Kusunoki, 1984; Vázquez et al., 1991; Garde et al., 1992 a), es ampliamente utilizada por su capacidad de distinguir la reacción acrosómica fisiológica de la degeneración secundaria a la muerte celular, observándose en microscopía óptica de campo claro a 1000x.

#### 2.1.2.2.6. Test de permeabilidad de membrana

La prueba de permeabilidad de membrana (endósmosis ó Hipo-osmotic-swelling test (HOS test)) está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hipoosmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert et al., 1989), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola. Si la membrana se encuentra dañada, o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios.

Cuando los espermatozoides son sometidos a un medio de elevada hipotonocidad y alcanzan su volumen crítico, la membrana plasmática se rompe y el flagelo se endereza bruscamente, pudiendo variar su morfología posteriormente desde recta a ligeramente curvada o totalmente sinuosa (Vázquez, 1980 a; Jeyendran et al., 1984; Gafo, 1992; Cortés et al., 1993).

La observación de las variaciones de volumen en la célula espermática se realiza a través de microscopía de contraste de fases, previa fijación de la muestra. La presión osmótica del medio utilizado y el tiempo requerido son característicos de cada especie (Vázquez, 1980; Jeyendran et al., 1984; Gafo, 1992; Cortés et al., 1993; Donoghue et al., 1996).

El test de permeabilidad de membrana es indicativo de la resistencia de la membrana plasmática, estando correlacionada positivamente con la fertilización de ovocitos "in vitro" en semen fresco (Hauser et al., 1992), test de hámster (Fuse et al., 1991; Garde, 1992 b), unión a anticuerpos GB24 (Cortés et al., 1994) y tinciones vitales (G<sup>a</sup> Artiga et al., 1994). Se observan cambios en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva tras exponer a las células espermáticas a

procesos de refrigeración, congelación, capacitación, ... (Vázquez et al., 1989; Garde, 1992 b; Donoghue et al., 1996; Correa et al., 1996 b).

#### **2.1.2.2.7. Tinciones vitales**

La viabilidad espermática depende de la integridad de la membrana plasmática y de la actividad biosintética del espermatozoide.

Actualmente existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina/nigrosina (Colas, 1980) y Tripán azul (Suttiyotin y Thawaiter, 1991), de tal manera que si el espermatozoide está vivo la membrana celular actúa como barrera impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse.

La introducción de la microscopía de fluorescencia en la determinación del estado vital del espermatozoide ha hecho aumentar la sensibilidad y resolución de las preparaciones destinadas a este fin, como es el caso de la utilización del naranja de acridina (Tejada, 1984; Hoshi et al., 1996) en la identificación del estado del ADN.

También se han utilizado diversas pruebas de valoración del metabolismo espermático, como son la reducción del azul de metileno, demanda de oxígeno ó índice de fructolisis (Cooper et al., 1995). Sin embargo estas mediciones representan la media de la muestra, y no tienen en cuenta las diferencias individuales entre los espermatozoides (Boixo, 1994).

### 2.2.2.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

El plasma seminal es el resultado de secreciones procedentes del testículo, epidídimo y de glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales de Cowper). En los machos ovinos y caprinos las glándulas de mayor tamaño son las vesiculares, localizadas próximas a la unión de los conductos deferentes y la uretra (Maxwell y Evans, 1990).

En el plasma seminal se encuentran componentes específicos de cada glándula, que son utilizados como marcadores bioquímicos de la función glandular (Anderson et al., 1979; Borque et al., 1989; Andolz y Bielsa, 1995; Santiago et al., 1995). Estos marcadores se agrupan según su procedencia en:

- \* Vesiculares: Fructosa y prostaglandinas.
- \* Prostáticos: Ácido cítrico, fosfatasa ácida, zinc y  $\gamma$ -glutamyltransferasa.
- \* Epididimarios: L-carnitina libre y glicerofosfocolina.

La concentración de fructosa y ácido cítrico en plasma seminal están sometidas a variaciones estacionales, raciales e individuales (Chand et al., 1985; Mendoza et al., 1989; Roca et al., 1993), apreciándose diferencias en su contenido según la edad del individuo (Roca et al., 1991). Dichas concentraciones están en relación directa con la actividad de la testosterona, constituyendo por tanto, un indicador de la función endocrina del testículo (Borque et al., 1989). Se han establecido correlaciones entre los valores bajos de fructosa con pequeños niveles de movilidad y volumen (Gonzales y Villena, 1997). El ácido cítrico activa la fosfatasa ácida, manteniendo el equilibrio osmótico junto con el sodio y potasio, favoreciendo la movilidad espermática.

La proteína total presente en plasma seminal es indicador de alteraciones patológicas del aparato reproductor masculino, estando estrechamente relacionadas con la congelabilidad del semen (**Borque et al., 1989**).

La determinación de enzimas espermáticas en el plasma seminal, como la aspartato aminotransferasa (AAT), sirven de indicadores de daño celular por choque frío (**Borque et al., 1996**).

## **2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EYACULADO DE MACHO CABRÍO.**

El semen eyaculado de macho cabrío, al igual que sucede con otros mamíferos, está formado por espermatozoides y plasma seminal, compuesto por secreciones procedentes del testículo, epidídimo, deferentes, vesícula seminal, glándulas bulbouretrales y próstata. Debido a la anatomía propia de cada especie, la contribución de las glándulas accesorias al plasma seminal varía enormemente de unas a otras, encontrando diferencias considerables tanto en el volumen como en su composición (**Mann, 1975; Maxwell y Evans, 1990**).

El plasma seminal vehicula los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación hasta el tracto genital de la hembra. Es un fluido isoosmótico compuesto en un 75% por agua, llevando en disolución fructosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol, fosfolípidos, prostaglandinas, enzimas y proteínas, además de iones inorgánicos como sodio, potasio y cloro, siendo la concentración estos dos últimos iones en el plasma seminal mayor en el macho cabrío que en morueco (**Iritani y Nishikawa, 1964**). Presenta un pH neutro sostenido por un complejo sistema tampón que protege a los espermatozoides de los cambios de pH, que afectan la supervivencia de las células espermáticas (**Abraham, 1987; Maxwell y**

**Evans, 1990).**

El plasma seminal caprino es rico en fosfatasa ácida y alcalina, secretadas por la próstata, y en fosfolipasa A, producida en la glándula bulbouretral o de Cowper (**Roy, 1957**). La fosfolipasa A es la enzima responsable de la coagulación de la yema de huevo, utilizada en los medios de refrigeración y congelación de semen (**Corteel, 1981**), debido su acción sobre las lecitinas de la yema de huevo, escindiendo dicha molécula en lisolecitinas y ac. grasos libres. Los productos resultantes de su actuación producen además un efecto “espermicida”, dando lugar a la inmovilización y muerte de los espermatozoides (**Corteel, 1992; Pellicer, 1996**). La fosfolipasa A se activa en presencia de iones calcio, disminuyendo su acción cuando en el medio aparecen citratos u oxalatos (**Roy, 1957**).

La concentración de fosfolipasa A varía individualmente entre los diferentes machos cabríos, siendo más alta cuando el semen es obtenido mediante electroeyaculación (**Maxwell y Evans, 1990**). Es suficiente la presencia de un 2,5 % (v/v) de plasma seminal de macho cabrío en un medio con yema de huevo para producir su coagulación (**Salamon y Ritar, 1982**).

El efecto tóxico de la fosfolipasa A se ve reducido al eliminar el plasma seminal ó al utilizar semen procedente de machos cabríos cowperectomizados (**Iritani y Nishikawa, 1962**). El lavado mediante centrifugación del semen con el objetivo de eliminar el plasma seminal permite reducir la concentración de fosfolipasa, reduciendo el efecto tóxico sobre los espermatozoides (**Corteel, 1980; Ritar y Salomon, 1982; Nunes et al., 1982; Corteel, 1992; Pellicer, 1996**). Sin embargo, la eliminación del plasma seminal implica el descenso de los niveles de fructosa, ác. cítrico y zinc (estabilizadores del metabolismo espermático) así como de los factores de decapitación, y por tanto induce una capacitación prematura. La utilización de concentraciones de yema de huevo menores al 2 % no producen el fenómeno de

coagulación (Maxwell y Evans, 1990).

**Chauhan y Anand (1990)** determinaron la concentración de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina antes y después de la congelación de semen caprino en un diluyente con yema de huevo, no observando su hidrólisis en lisofosfolípidos y ácidos grasos. En base a sus resultados, aconsejan la congelación de dosis seminales en diluyente citrato-glucosa-yema de huevo sin necesidad de eliminar el plasma seminal.

**Tuli y Holtz (1994)** observaron una mayor liberación de la enzima GOT (Glutámico oxalacético transaminasa) y menor movilidad e integridad espermática en semen descongelado con centrifugación previa a su congelación. Resultados similares obtienen **Roca et al. (1994)**, observando una evolución similar en los parámetros seminales (calidad de movimiento, vitalidad y acrosomas normales) utilizando un Tris-yema con un 18% y 2,5% de yema de huevo para semen lavado y sin lavar respectivamente, obteniendo un 76% de fertilidad con semen refrigerado sin lavar en la raza Murciano-Grandina. **Soria (1995)** observó un descenso en la capacidad de supervivencia de los espermatozoides de macho cabrío tras el lavado de la muestra seminal, obteniendo los mejores resultados en un diluyente TesT-Caseína con un 9% de yema de huevo.

La influencia de la raza, edad, temperatura y fotoperíodo sobre la calidad seminal del macho cabrío y por consiguiente sobre la congelabilidad de los eyaculados, han sido estudiados por diversos autores, siendo el fotoperíodo el factor de mayor influencia (**Corteel et al., 1980; Pérez , 1992; Herrera y Tapia, 1995; Pérez y Mateos, 1996**). En zonas templadas situadas en latitudes comprendidas entre 40°-50°, la estación sexual se ve limitada a los meses de otoño-invierno, reflejándose sobre la libido, producción seminal y calidad de los eyaculados (**Corteel, 1981; Roca et al., 1989; Pérez , 1992; Pérez y Mateos, 1996**). En nuestro laboratorio, y según se indica en la **Tabla 1**, hemos encontrado valores diferentes según la raza y estación.

**Tabla 1.-** Características seminales de eyaculados de macho cabrío de diferentes razas según la estación anual. (\*Datos recogidos por el Laboratorio de Criobiología del Área de Reproducción Animal (CIT/INIA, Madrid) durante 1994, 95 y 96).

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<i>Raza Saanen (Ahmad y Noakes, 1996)</i>				
Volumen (ml)	0.87	0.60	0.40	0.42
Concentración (x10 <sup>6</sup> )/ml	4370	4240	5510	5930
Espz. Móviles (%)	79.7	76.3	72.7	65.5
<i>Raza Malagueña *</i>				
Volumen (ml)	0.75	1.21	1.30	0.85
Concentración (x10 <sup>6</sup> )/ml	5543	4618	4699	5447
Espz. Móviles (%)	74.6	78.6	84.2	78
<i>Raza Murciano-Granadina *</i>				
Volumen (ml)	0.60	0.76	0.90	0.70
Concentración (x10 <sup>6</sup> )/ml	4735	3824	3580	5632
Espz. Móviles (%)	73.0	79.9	78.8	63.4
<i>Raza Jamunapari (Sahni y Tiwari, 1992)</i>				
Volumen (ml)	0.84	1.02	0.73	0.72
Concentración (x10 <sup>6</sup> )/ml	2210	1805	1986	3309
Espz. Móviles (%)	-	-	-	-
<i>Raza Verata (Pérez, 1992)</i>				
Volumen (ml)	0.48	1.02	1.01	0.69
Concentración (x10 <sup>6</sup> )/ml	6863	3938	3780	3809
Espz. Móviles (%)	67.0	78.2	76.0	73.8

El fotoperíodo no sólo afecta a la producción seminal, sino que también tiene repercusión sobre la composición del plasma seminal debido a la regulación que ejercen los andrógenos en circulación sobre la actividad de las glándulas sexuales accesorias (Tresguerres, 1989), observándose un efecto menos negativo sobre los espermatozoides en época de reproducción que fuera de ella (Nunes et al., 1982).



Las razas que presentan una marcada estacionalidad sexual poseen una secreción de testosterona condicionada por la estación del año, produciéndose un incremento en la frecuencia de pulsos de LH, lo que provoca un incremento en la secreción de testosterona por el testículo, así como un aumento del tamaño testicular (Lincol., 1988; Tresguerres, 1989). La secreción de testosterona es mayor en la época de fotoperíodo decreciente (verano y otoño) que durante el fotoperíodo creciente (invierno y primavera).

### 2.3. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CAPRINO

La I.A. en ganado caprino es una técnica poco utilizada en nuestro país, limitándose prácticamente su uso a la utilización de semen fresco y refrigerado, y experimentalmente con semen congelado (Herrera et al., 1994). Sin embargo, los logros conseguidos en ganado ovino (Anel, 1994) y los avances conseguidos en el caprino (Amoah y Gelaye, 1997) han animado a los ganaderos, especialmente a los del sector lechero, a ampliar sus perspectivas de futuro, necesitando la utilización de la I.A. como técnica imprescindible para mejorar la producción individual.

Una de las grandes ventajas que presenta la I.A. es la utilización de sementales de gran valor genético para inseminar un número mayor de hembras que las que podrían cubrir por monta natural (Maxwell y Evans, 1990), debido a que tras la dilución del semen se consigue un aumento del volumen del eyaculado, obteniendo un mayor número dosis seminales.

La conservación del semen mediante refrigeración (+15°C ó +5°C) o congelación tiene como objetivo fundamental la prolongación de la viabilidad de los gametos masculinos, durante horas/días o indefinidamente, ya que a temperatura ambiente los espermatozoides degeneran con cierta rapidez debido, principalmente, al agotamiento de

las reservas energéticas.

La selección del semen previa refrigeración o congelación de los mismos, proporciona dosis seminales con calidad inicial suficiente para ser utilizadas independientemente de la estación del año en que hayan sido obtenidas (**Roca et al., 1992; Aguado et al., 1994**). El semen eyaculado debe cumplir una serie de valores mínimos (volumen, concentración y movilidad) que indiquen la conveniencia de aceptarlos para su posterior conservación.

### **2.3.1. DILUCIÓN**

La dilución de los eyaculados tiene como objeto aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número posible de hembras. El título de dilución depende tanto del volumen de inseminación (varía en función del tipo de inseminación: vaginal, cervical, intrauterina) como de la concentración de espermatozoides móviles con la que queremos inseminar, ya que independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles esta correlacionado con la fertilidad (**Maxwell y Evans, 1990; Ritar et al., 1990**).

La dilución aconsejada en semen caprino varía enormemente entre autores. Algunos investigadores obtienen mejores resultados con títulos de dilución 1:10 mejor que 1:1 (**Memon y Ott, 1981; Ritar et al., 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Ritar y Ball, 1993**), existiendo otros trabajos que apuntan a las diluciones superiores a 1:1 como las responsables de un descenso de la fertilidad (**Salamon y Ritar, 1982; Park et al., 1989**). La bibliografía no parece aconsejar diluciones superiores a 1:5 de los eyaculados destinados a la elaboración de dosis seminales incluidas en programas comerciales de I.A..

### **2.3.2. DILUYENTES**

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de macho cabrío. Sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), rentabilizando en cualquier caso el número de dosis obtenidas por eyaculado.

Los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una serie de condiciones (Fiser et al., 1981; Abdelhakeam et al., 1991; Pérez Fuentes et al., 1993; Garde et al., 1995):

1. Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/Kg) en congelación.
2. Poseer un pK próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
3. Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío, clasificadas en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
4. Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
5. Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su composición.

6. Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples inseminaciones.

El *pH* óptimo de los diluyentes empleados en la conservación espermática se mantiene en torno a la neutralidad (**Vázquez et al., 1986; Dunner, 1991**), siendo necesaria la presencia de soluciones tampones para su mantenimiento. Los tampones deben tener un *pK* entre 6 y 8 (preferiblemente 7), máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelantes, ser estables y resistir la degradación enzimática (**Graham, 1978**). Si bien las soluciones tampones más comúnmente empleadas son el citrato, fosfato y bicarbonato sódico, estudios más recientes muestran los compuestos zwitteriónicos ó amido-orgánicos como el BES, TES, TRIS, HEPES, MES y PIPES con mayor capacidad estabilizadora (**Graham, 1978 b; Vázquez et al., 1988; Duner, 1991; Molina et al., 1996**).

Los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido a su aporte energético al espermatozoide (**Maxwell y Evans, 1990**) (son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa ,esta última por vía oxidativa) y a su acción como crioprotectores (**Molina et al., 1990; Dunner, 1990**), contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico.

Otra particularidad de los medios para la conservación espermática es la presencia de crioprotectores. Dichas moléculas, de características bien definidas en cuanto a tamaño y permeabilidad, protegen las estructuras celulares frente a las bajas temperaturas, siendo beneficiosa su adición en refrigeraciones a bajas temperaturas +5°C, y necesaria en la congelación. Los crioprotectores pueden clasificarse atendiendo al grado de actividad de paso sobre la membrana plasmática en:

**Crioprotectores no penetrantes:** Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. En ningún atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad. Destacan por su utilización los azúcares (glucosa, lactosa y fructosa), las proteínas de la leche descremada y yema de huevo (**Corteel, 1981; Maxwell y Evans, 1990; Salamon y Maxwell, 1995**).

**Crioprotectores penetrantes:** Son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior. Destaca por su utilización el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilen-glicol, etilen-glicol, metanol y etanol (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1996 a; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

La adición de antibióticos a los distintos diluyentes es opcional si bien, se recomienda su utilización como forma de control de la población de gérmenes presentes en el eyaculado. Los antibióticos más utilizados son la penicilina G-sódica y el sulfato dihidro-estreptomicina.

### **2.3.3. DILUYENTES DE REFRIGERACIÓN**

Los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía (glucosa, fructosa, ...) y un crioprotector no penetrante,

que es opcional dependiendo de la temperatura y tiempo de refrigeración (leche descremada, yema de huevo, ...). Algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental, observándose un aumento en el porcentaje de fertilización "in vitro" en los diluyentes que incorporan en su composición SOD (superóxido dismutasa) y catalasa (**Hammerstedt, 1993**).

Los diluyentes han de preservar la viabilidad espermática a una temperatura de +15 °C ó +5 °C durante un mínimo de 6 horas. Tiempos mayores de refrigeración implican un beneficio para el inseminador, posibilitando un aumento del área de trabajo y facilitando el manejo en general y facilitando el manejo en general.

#### **2.3.3.1. LECHE DE VACA**

Debido a las características seminales del macho cabrío anteriormente citadas, la utilización de leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado. La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstruir, siendo esta última la más universal. Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche han de ser calentadas hasta una temperatura de +92°/+95 °C durante 8-10 minutos, sin llegar a hervir (tindalización), con el objetivo de anular los factores tóxicos de su fracción proteica (**Maxwell y Evans, 1990**).

El diluyente a base de leche descremada reconstituida más utilizado en la refrigeración de semen caprino es el de **Corteel (1981)**, con buenas propiedades conservantes a una temperatura de +15 °C, aunque se muestra ineficaz a +5°C (**Guérin, 1990**), siendo de complicada elaboración y conservación.

### 2.3.3.2. YEMA DE HUEVO

La otra gran alternativa como crioprotector externo a la leche de vaca la constituye la yema de huevo de gallina. Los huevos han de ser frescos, no transcurriendo más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización (Maxwell y Evans, 1990). En el caso de no disponer de huevos frescos se puede utilizar yema de huevo desecada para la realización de los diluyentes (Montero et al., 1995).

La concentración de yema de huevo utilizada en la conservación de semen caprino es menor que en otras especies (ovino, porcino, ...) debido a las propiedades antes indicadas de la fosfolipasa A, que en presencia de calcio es capaz de hidrolizar las lecitinas de la yema de huevo en lisolecitinas y ác. grasos libres. La cantidad de yema de huevo utilizada varía según los autores (Tabla 2), siendo las concentraciones mayores utilizadas tras la eliminación del plasma seminal .

Tabla 2.- Concentración de yema de huevo utilizada por distintos autores para la refrigeración de semen caprino.

Diluyente	Yema de huevo (%)	Referencia
Tris Glucosa	1.5-12	Ritar y Salamon, 1982
Tris Cítrico Glucosa	1.5-2.2	Ritar et al., 1990
Tris Fructosa	10	Azawi et al., 1993
Tris Cítrico Fructosa	5	Stojanov et al., 1994
Tris	2.5-18	Roca et al., 1994

La incorporación de la yema de huevo se realiza sobre el volumen final del diluyente base, homogeneizándose adecuadamente. Para la eliminación de las partículas groseras se procede a la centrifugación del diluyente a 500 g durante 35 minutos.

### **2.3.3.3. AGUA DE COCO**

La utilización del agua de coco como diluyente se presenta como un método alternativo en la conservación del semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, se ha demostrado que el agua de coco favorece la conservación del semen caprino (Nunes, 1993 a). La movilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino refrigerado a +4°C con agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con leche. La supervivencia espermática, esta alrededor de las 60 horas en agua de coco frente a las 12 horas en un medio de leche (Nunes, 1993 a), observándose un aumento de la fertilidad en las cabras inseminadas con agua de coco frente a las inseminadas con leche así como un mayor número de nacimientos de hembras (Nunes, 1993 a).

La utilización de la leche de coco como diluyente de conservación en semen caprino está menos extendido debido a su mayor contenido en fosfolípidos (Nunes 1993 b), si bien se han encontrado resultados satisfactorios tras su utilización (Balakrishnan y Neelakanta, 1982).

### **2.3.4. DILUYENTES DE CONGELACIÓN**

La posibilidad de almacenar dosis seminales por un período indefinido de tiempo para su posterior utilización, es una de las mayores ventajas que presenta la congelación dentro de los programas de I.A.

Las causas de mayor mortalidad espermática durante la congelación se deben al aumento de la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas y rotura mecánica de elementos estructurales, durante el proceso del cambio de estado. La protección de los



espermatozoides durante el descenso de temperatura durante la congelación se consigue mediante la incorporación de crioprotectores al diluyente base, tan y como se indicó en el apartado de diluyentes (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

El glicerol es el crioprotector penetrante más ampliamente utilizado debido principalmente a su capacidad “tampón” con las sales, minimizando el daño electrolítico y la formación de cristales de hielo (**Deka y Rao, 1985 a; Salamon y Maxwell, 1995**).

La adición del glicerol en función de la concentración espermática muestra los mejores resultados post-descongelación (**Salamon y Ritar, 1982**). Si bien, existen otros crioprotectores utilizados en la congelación espermática como el DMSO o etilen-glicol, es el glicerol el que manifiesta unos resultados post-descongelación superiores resultados (**Deka y Rao, 1985 a; Singh et al., 1996; Singh et al., 1995; Salamon y Maxwell, 1995**).

La concentración de glicerol empleada en la preparación de los diluyentes varía según los autores, manteniéndose entre el 3 y 11% (**Tabla 3**). Dicha variabilidad depende principalmente del diluyente base empleado y su sistema de dilución, así como de la temperatura a la cuál se añade dicho diluyente glicerolado (**Tuli y Holtz, 1994**).

En general, los mejores resultados post-descongelación se obtienen tras la utilización de concentraciones intermedias de glicerol (4 y 6%) (**Deka y Rao, 1986; Sinha et al., 1992; Tuli y Holtz, 1994**). Las concentraciones de glicerol utilizadas en semen ovino también oscilan en este rango, si bien en ovino se puede llegar a anular su adición tras un aumento del porcentaje de la yema de huevo hasta el 30% (**Abdelhakeam et al., 1991; G<sup>a</sup> Artiga et al., 1993**).

**Tabla 3.-** Porcentaje de glicerol utilizado por diversos autores en los diluyentes de congelación de semen caprino.

% Glicerol	Diluyente	Referencia
3-11	Cítrico Glucosa*	Chauhan et al., 1994
4	Tris Glucosa*	Pérez y Mateos , 1994
4	BesKOH*	Duner, 1991
4	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar y Ball, 1993
4	Leche descremada	Sinha et al., 1992
6	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar et al., 1990
6	Tris Cítrico Glucosa*	Ritar y Salamon, 1982
7	Tris Glucosa*	Watson, 1975
8	Tris Cítrico Fructosa*	Berger, 1989
8	Tris Glucosa*	Sing et al., 1995

(\*) Diluyentes con yema de huevo.

La adición del glicerol se puede realizar en una o varias etapas (Corteel, 1975; Deka y Rao, 1985 b; Salamon y Maxwell, 1982; Tuli y Holtz, 1994; Salamon y Maxwell, 1995), y a una temperatura de +37°C, +22°C o +5°C. El efecto tóxico del glicerol es menor si se añade a +5°C, sin embargo, la velocidad de penetración también es menor, por lo que se habrá de aumentar el tiempo de equilibración (Corteel, 1975). La adición del glicerol a temperatura ambiente permite una penetración más rápida del agente, si bien ejerce una acción mas tóxica sobre los espermatozoides al estar mas tiempo en contacto con los mismos (Salamon y Ritar, 1982; Salamon y Maxwell, 1995).

La mayoría de los medios utilizados para la crioconservación espermática son hipertonicos con respecto al plasma seminal (Fiser et al., 1981). El aumento de la P.O. de los medios facilita la salida de agua al medio extracelular con el fin de equilibrar las

concentraciones a ambos lados de la membrana plasmática, produciendo un mayor grado de deshidratación en el espermatozoide y por consiguiente reduciendo la formación de hielo en su interior, obteniendo unos resultados mejores tras la descongelación (Fiser et al., 1981).

Al igual que ya ocurriera en los diluyentes de refrigeración, algunos medios de congelación muestran en su composición antioxidantes como crioprotectores, si bien esta faceta continua en investigación (Stajanov et al., 1994).

### **2.3.5. REFRIGERACIÓN DE SEMEN CAPRINO**

La refrigeración implica un descenso de temperatura del eyaculado desde los +30°C (temperatura de dilución) hasta los +15 °C ó +5 °C (temperaturas de conservación óptimas), siendo la temperatura de refrigeración utilizada inversamente proporcional al tiempo de conservación (Vázquez et al., 1986). El descenso de la temperatura ha de realizarse de forma suave y progresiva.

El período de refrigeración del semen caprino esta en función de la temperatura, método y diluyente empleado, oscilando entre 2 y 126 horas según los diversos autores (Corteel, 1981; Guérin, 1990; Sahni y Tiwari, 1992; Nunes, 1993 a). Sin embargo, el descenso de la viabilidad espermática observada a lo largo del tiempo solo hace posible la inseminación con eyaculados refrigerados durante 6-10 horas.

### **2.3.6. CONGELACIÓN DE SEMEN CAPRINO**

La utilización de dosis seminales congeladas y su posterior aplicación en I.A. es un requisito obligatorio dentro de programas de selección de una raza. La difusión de

material genético mejorante sin límite geográfico (debido a su fácil transporte) ni de tiempo, hacen que esta técnica sea imprescindible.

Los resultados de fertilidad obtenidos con semen congelado son inferiores a los encontrados en semen refrigerado, existiendo grandes variaciones dependiendo de la composición del diluyente, calidad inicial del semen y su tratamiento, lugar de deposición de la dosis, momento de la inseminación, número de inseminaciones, tipo de sincronización, estación del año y raza (Corteel, 1975; Moore et al., 1989; Chauhan y Anand, 1990; Ritar y Ball, 1993; Sinha et al, 1995).

La utilización de dosis descongelación de semen caprino en programas de I.A. viene desarrollándose desde hace muchos años de manera experimental con mayor o menor éxito (Tabla 4), siendo las referencias encontradas de su aplicación industrial escasas fuera de nuestras fronteras y prácticamente nulas en nuestro país.

**Tabla 4.- Fertilidades obtenidas con semen caprino refrigerado y congelado.**

FERTILIDAD (%)	TÉCNICA	REFERENCIA
40.5	Semen Descongelado	Corteel, 1975
55	Semen Descongelado	Singh et al., 1995
56,8	Semen Descongelado	Ritar y Ball, 1993
58,8	Semen Descongelado	Sinha et al, 1995
68	Semen Refrigerado	Nunes, 1993 a
81	Semen Descongelado	Chauhan y Anand, 1990

La congelación de las dosis seminales se puede realizar en vapores de nitrógeno líquido (NL), sobre nieve carbónica o mediante biocongeladores (con rampas de velocidad programadas). Las formas mas utilizadas en la congelación del semen son las

pajuelas de 0,25 ml y 0,50 ml, criotubos de 1,0 ml, píldoras de 0,1 ml y ampollas de cristal de 1,5 ml, existiendo discrepancias entre autores sobre el envase de mayor efectividad (Maxwell et al., 1980; Pontbriand et al., 1989; Ritar et al., 1990; Vázquez et al., 1991; Sahni y Tiwari, 1992).

El descenso de temperatura desde +30°C hasta +5°C ha de realizarse lentamente, ya que la bajada rápida de temperatura o "cold shock" produce daños celulares irreparables debido principalmente, a cambios en la viscosidad de los fluidos, en la solubilidad de los gases, así como metabólicos y químicos (Darin-Bennet y White, 1977; Robertson y Watson, 1986; Robertson et al., 1990). Este período de enfriamiento tiene una duración aproximada de 1 a 2 horas (-0,1°C/min o -0,5°C/min) dependiendo de la técnica que se utilice de congelación (Memon y Ott, 1981). Sin embargo, una bajada demasiado lenta de temperatura prolongaría una alta actividad metabólica, lo que conlleva a una muerte celular prematura.

No se ha establecido de manera uniforme el tiempo óptimo de equilibración, período comprendido desde que se añade el glicerol hasta que el semen es congelado (Graham, 1978), aunque depende en gran medida de la composición del diluyente y técnicas utilizadas (Deka y Rao, 1986; Sahni y Tiwari, 1992; Sinha et al., 1992; Pérez y Mateos, 1994; Salamon y Maswell, 1995).

Cuando las soluciones se enfrían gradualmente por debajo del punto de congelación, se produce un superenfriamiento de la célula y del medio exterior a temperaturas de -5°C (Watson, 1990). Entre -5°C y -15°C se produce el punto crioscópico de fusión, aumentando la concentración de solutos en el medio. El interior de la célula sigue superenfriado debido al bloqueo del crecimiento de los cristales de hielo por la membrana plasmática, produciéndose un desequilibrio osmótico entre los medios intracelular y extracelular (Mazur, 1980), produciéndose un flujo neto de agua hacia el exterior de la célula en respuesta al desequilibrio.

La temperatura crítica de congelación oscila entre los  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ , dado que entre dichas temperaturas se produce la formación de cristales de hielo y el efecto solución (incremento de la concentración de solutos, cambios en el pH, precipitación de solutos, aumento de la deshidratación y descenso del volumen del fluido) (Mazur, 1990; Watson y Duncan, 1988).

#### **2.3.6.1. DESCONGELACIÓN DE DOSIS SEMINALES**

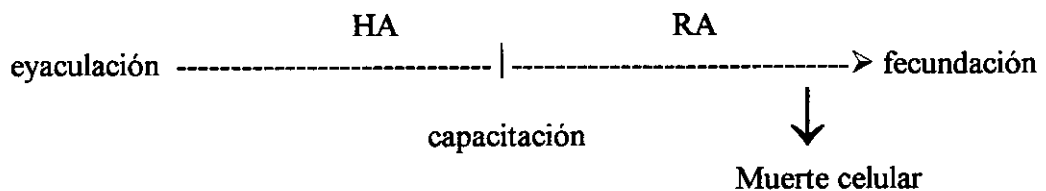
La temperatura y tiempo de descongelación varía dependiendo del tipo de envase elegido (Salamon y Maxwell, 1995), no existiendo uniformidad de criterios entre los diferentes autores para un mismo envase, si bien se ha demostrado que las descongelaciones a altas temperaturas durante escasos segundos muestran mejores resultados (Fiser et al., 1981; Pontbriand et al., 1989; Ritar et al., 1990; Tuli et al., 1991; Salamon y Maxwell, 1995; Correa et al., 1996 b).

La viabilidad de las dosis descongeladas va a ser un sumatorio de los procesos de dilución, refrigeración, glicerolización, congelación y descongelación, cuyo resultado final es una pérdida de movilidad, vitalidad, morfoanomalías, acrosomas, permeabilidad de membrana ..., y por consiguiente de la fertilidad (Deka y Rao, 1985 b; Chauhan et al., 1994, Correa et al., 1996 b).

### **2.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA**

En condiciones fisiológicas los espermatozoides eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre "in vivo" en el tracto genital de la hembra, y se conoce con el nombre de

"capacitación espermática" (Austin, 1952; Chang, 1951). Estas modificaciones habilitan la célula espermática para sufrir la reacción acrosómica (RA) mediante cambios a nivel de membrana que facilitan la penetración de las cubiertas del ovocito. Al iniciarse el proceso de capacitación, el espermatozoide adquiere una hiperkinesis caracterizada por un batido de flagelo más vigoroso y una mayor amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (hiperactivación, HA).



La capacitación se realiza de manera secuencial sobre la población espermática (Mendoza, 1996; Dobrinski et al., 1997). La adquisición del estado "capacitado" es más rápido "in vivo" que "in vitro", posiblemente debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Mortimer, 1995).

El lugar de deposición del semen durante la cubrición, característico de cada especie, condiciona el momento del inicio de la capacitación espermática así como el tiempo requerido para completarla (Tabla 5) (Cummins, 1995). En especies de deposición uterina (porcino y roedores de laboratorio), la capacitación y almacenamiento espermático se produce en el itsmo oviductal (Dobrinski et al., 1997). En especies de deposición vaginal (ovino, caprino, conejo ...) la capacitación comienza durante el contacto de los espermatozoides con el moco cervical. En estos animales, las criptas presentes en el tracto cervical suponen un reservorio de espermatozoides con

capacidad fertilizante (Hunter et al., 1980; Hunter et al., 1982; Mortimer, 1995).

**Tabla 5.-** Tiempo de capacitación "in vivo" e "in vitro" de los espermatozoides recuperados de la región caudal del epidídimo o eyaculados (Cummins, 1995).

Especie	"In vivo"		"In vitro"	
	espz. Epididimo (Horas)	espz. Epididimo (Horas)	espz. Epididimo (Horas)	espz. eyaculado (Horas)
Hombre				2
Ratón		1.5 - 2		
Hámster	4 - 6	3		
Rata		4		
Verraco	1.5 - 3			> 4
Toro	8			> 6
Morueco	2			> 5
Conejo	6 - 8	> 6		6 - 8
Cobaya		10 - 12		

El transporte de espermatozoides desde el lugar de deposición hasta el ovocito se realiza combinando el movimiento activo desarrollado por las propias células espermáticas con movimientos peristálticos del tracto reproductor de la hembra.

#### **2.4.1. MEMBRANA ESPERMÁTICA**

Las membranas biológicas de las células de mamífero están construidas bajo un patrón común, conteniendo en su estructura proteínas, lípidos (principalmente fosfolípidos), colesterol y glúcidos. Constan de una bicapa de fosfolípidos como unidad



estructural básica. El porcentaje y la naturaleza de las proteínas adheridas a esta bicapa depende del tipo de membrana **(Darnell et al., 1988)**. La proporción de fosfolípidos, proteínas y glúcidos presentes en la membrana plasmática de las células espermáticas es característica de cada especie, **(Darnell et al., 1988; Jimenez Cabras, 1995)** y varía dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre **(Curry y Watson, 1995; Lin y Kan, 1996; Kan y Lin, 1996)**.

Todos los espermatozoides de mamífero poseen una membrana plasmática continua dividida en cabeza y cola. La membrana que recubre la porción cefálica se puede considerar a su vez en tres regiones: 1) membrana que recubre la región acrosomal, por donde dará comienzo la vesiculación y fusión durante la reacción acrosómica; 2) zona ecuatorial, lugar donde las membranas acrosomal y plasmática se fusionan durante la reacción acrosómica; y 3) región post-acrosómica. La membrana que protege el flagelo presenta dos dominios: 1) pieza intermedia, y 2) pieza principal **(Curry y Watson, 1995)**. Todas estas regiones de la membrana plasmática se diferencian entre sí por la afinidad selectiva de su unión con lectinas **(Berger, 1990; Jimenez Cabras, 1995)**, reflejando diferencias en la composición de su glucocalix.

La membrana plasmática del espermatozoide está sujeta a cambios en su composición durante su paso por el epidídimo **(Sundhey et al., 1992)**, en el momento de la eyaculación (interacciones específicas con compuestos procedentes de las distintas glándulas accesorias) y en el transcurso de la capacitación **(Curry y Watson, 1995; Nolan y Hammerstedt, 1997)**.

Durante la capacitación, el gameto masculino experimenta numerosas modificaciones bioquímicas debido a múltiples interacciones con diversos componentes presentes en los fluidos del tracto genital de la hembra que deben realizarse hasta alcanzar el complejo cummulus-ovocito. Como respuesta a un sistema de señalización (ya sea procedente del ovocito o de agentes capacitantes) se produce un aumento de la

permeabilidad de la membrana plasmática, en los niveles de calcio intracelular y del intercambio de fosfatidil-inositol, así como un descenso de la actividad ATP-asa, redistribución de proteínas dependientes de calmodulina, y cambios en la composición lipídica de la membrana (**Langlais et al., 1988; Fraser, 1992; Roldan, 1994**). Se produce un incremento de fosfolípidos, debido al descenso en la proporción de colesterol/fosfolípidos dentro de la membrana (**Davis et al., 1980; O'Rand, 1982; Go y Wolf; 1985**), de la cantidad de fosfatidil-colina (**Evans et al., 1980**) y fosforilación proteica.

El proceso de capacitación es reversible durante la hiperactivación, lo cual implica la existencia en el medio donde están vehiculizados los espermatozoides de sustancias decapacitantes, como el colesterol, capaz de modificar la fluidez de la bicapa lipídica. Los agentes presentes capaces de estimular su pérdida se definen como factores capacitantes (**Fayrer-Hosken et al., 1987; Cross, 1996**).

El incremento de la fluidez de la membrana plasmática favorece el movimiento de proteínas y receptores, permitiendo la transducción de señales y la interacción entre los dos gametos (**Roldan, 1994; Fusi et al., 1996; Nolan y Hammerstedt, 1997**). Estas migraciones proteicas permiten la formación de pequeños "parches" precursores de la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Se produce un descenso del peso molecular en algunas proteínas de origen epididimario incorporadas en la membrana plasmática y en proteínas estructurales como consecuencia de la pérdida de residuos glucídicos (**Fournier-Delpech y Thibault, 1993**).

Estudios comparativos realizados en distintas especies muestran la existencia de una relación entre el tiempo de capacitación y el contenido de colesterol/fosfolípidos presente en la membrana del espermatozoide (**Davis et al., 1980**), siendo este proceso dependiente de la concentración de albúmina en el medio.

El descenso de los niveles de colesterol en la membrana espermática está relacionada con la presencia de proteínas captadoras de esteroides en el tracto reproductor de la hembra (Go y Wolf, 1985; Davis et al., 1980). Debido a la menor concentración de colesterol en las células uterinas, los espermatozoides presentes en útero experimentan un gradiente negativo de colesterol hacia el exterior, induciendo la capacitación espermática (Fig. 3).

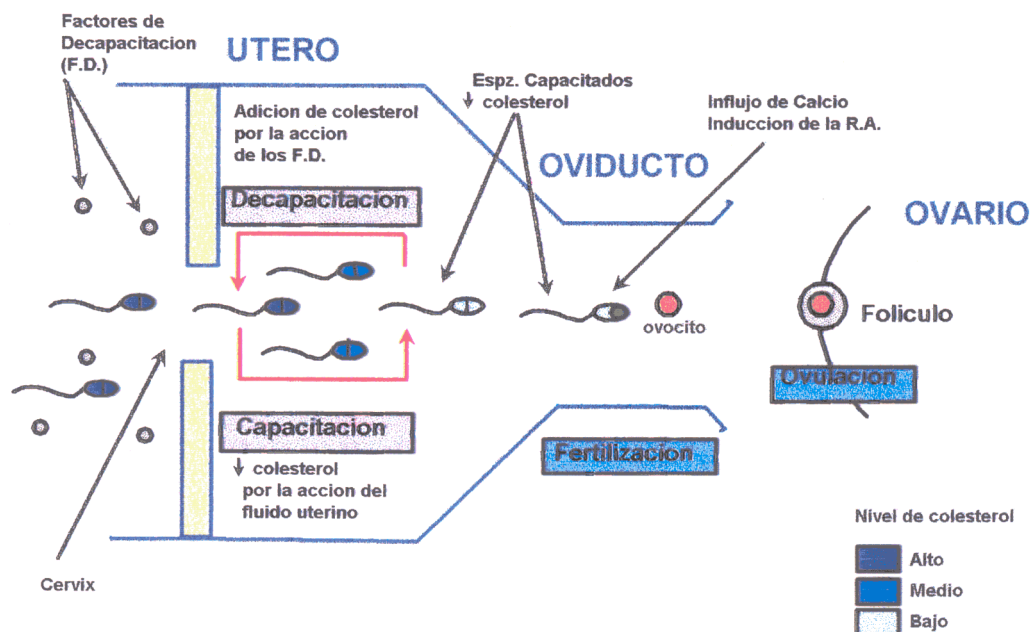


Fig.3.- Cambios en los niveles de colesterol durante la capacitación y fertilización de espermatozoides de mamífero en el tracto reproductor de la hembra.

La alta concentración de colesterol unido a HDL (High Density Lipoprotein) y albúmina, indican cierto grado de especificidad de estos aceptores, siendo la albúmina presente en el líquido folicular capaz de unir de 2 a 3 veces más cantidad de colesterol que la presente en el suero sanguíneo (Langlais et al., 1988). El aumento de la afinidad de la albúmina por el colesterol se acentúa en presencia de bicarbonato (Harrinson et al., 1994); siendo este compuesto (bicarbonato/CO<sub>2</sub>) esencial durante la capacitación (Shi et al., 1995; Harrinson et al., 1994).

La activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> ha sido descrita como uno de los mecanismos implicados en el comienzo de la capacitación espermática y reacción acrosómica, debido a que el producto de su actividad, la lisofosfatidilcolina (LFC), desestabiliza la membrana biológica. Al inicio de la capacitación el contenido de LFC en la membrana es muy bajo, por lo que la estimulación de la fosfolipasa no se produciría durante este periodo, sino momentos después (Fournier-Delpech y Thibault, 1993), en repuesta del mantenimiento del proceso de hipercinesis e iniciarse la reacción acrosómica.

#### **2.4.2. REGULACIÓN IÓNICA DURANTE LA CAPACITACIÓN**

Las modificaciones en la composición y estructura de la membrana plasmática como consecuencia del inicio de la capacitación, inducen cambios en la permeabilidad de iones implicados no solo en dicho proceso, sino también durante la hiperactivación y reacción acrosómica.

La selección de medios de cultivo adecuados para la inducción de la capacitación espermática "in vitro" ha permitido el estudio de los diferentes mecanismos implicados en la adquisición de la capacidad fecundante.

##### **2.4.2.1. IONES CALCIO**

Los trabajos que demuestran la relación existente entre los iones Ca<sup>2+</sup> y la capacitación espermática son muy numerosos. Desde que Loeb en 1915 demostrara la necesidad de Ca<sup>2+</sup> extracelular para aumentar la fertilidad en estrellas de mar, numerosos investigadores han confirmado dicha necesidad también espermatozoides de mamíferos (Iwamatsu y Chang, 1971; Anand et al., 1989). La necesidad de presencia de iones de calcio es menor al inicio de la capacitación que durante la reacción acrosómica (Fraser,

1987; Thomas y Meizel, 1988;). Durante la capacitación se produce un incremento de la movilidad espermática ó "hiperactivación" que precede a las modificaciones en la membrana del espermatozoide (O'Rand, 1982), y requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Yanagimachi, 1970; Robertson y Mortimer, 1988; Anand et al., 1989). En espermatozoides de macho cabrío se ha observado un requerimiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y de AMP-c para que la capacitación y la reacción acrosómica tengan lugar (Anand, 1989).

Actualmente se conocen tres mecanismos diferentes implicados en la regulación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la adquisición de la capacidad fecundante:

- 1.- Una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, responsable del control del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fraser y McDermott, 1992; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996);
- 2.- Un intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , introduciendo iones  $\text{Na}^+$  y expulsando  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{Ca}^{2+}$  dentro y  $\text{Na}^+$  fuera (Bradley y Forrester, 1982);
- 3.- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , capaces de permitir influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fraser y McDermott, 1992).

En espermatozoides de ratón se ha observado la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como consecuencia de la modulación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por los FD, de este modo, si los FD han sido eliminados durante la capacitación, la actividad enzimática disminuye, produciéndose un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fraser, 1992). La utilización de la calmodulina y/o inhibidores de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa aceleran la capacitación en espermatozoides de varios mamíferos, sugiriendo la importancia de esta  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en la regulación de la capacitación (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996).

#### 2.4.2.2. IONES SODIO Y POTASIO

El ion  $\text{Na}^+$  es uno de los iones más abundante no solo en los medios de cultivo "in vitro" sino también en los fluidos del tracto reproductivo. La presencia de iones  $\text{Na}^+$ , durante la capacitación y la reacción acrosómica, es necesaria para que la fertilización tenga lugar (Fraser, 1994). Se requiere una baja concentración de  $\text{Na}^+$  durante la capacitación, sin embargo las necesidades se disparan durante la reacción acrosómica.

Un posible regulador de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  es la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa, una enzima que impulsa iones  $\text{Na}^+$  al exterior y  $\text{K}^+$  hacia el interior de la célula espermática. La actividad de la enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa disminuye durante la capacitación, permitiendo el aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular. La bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa parece estar más relacionada a nivel flagelar que al cefálico, induciendo cambios en el tipo de movimiento de los espermatozoides (García-Soto et al., 1988; Quinn y White 1968). La concentración de iones  $\text{Na}^+$  fluctúa en los fluidos del tracto reproductivo de la hembra en los momentos próximos a la ovulación.

Durante la reacción acrosómica y fusión gamética es necesario el descenso de la concentración de  $\text{K}^+$  (Fraser, 1983). El principal mecanismo implicado en la regulación de la concentración intracelular del  $\text{K}^+$  es la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa, sin embargo el principal estimulador de la capacitación es el incremento en la  $[\text{Na}^+]_i$  y no el descenso de la de la  $[\text{K}^+]_i$ . Así, si bien el  $\text{K}^+$  extracelular no es responsable directo de la capacitación, elevadas concentraciones de  $\text{K}^+$  permiten la capacitación espermática de manera secuencial pero no la fecundación hasta que dicha concentración desciende. Al igual que ocurre con el  $\text{Na}^+$ , la concentración de  $\text{K}^+$  en el fluido oviductal varía dependiendo del momento del ciclo de la hembra, siendo estos niveles bajos en el momento de la ovulación.

### **2.4.3. FACTORES DE DECAPACITACIÓN**

El fenómeno de la capacitación espermática es un proceso reversible, tal como demuestran diversos autores (**Bedford et al., 1962; Chang , 1951**). Dicho proceso se debe a la habilidad de ciertas moléculas de disociarse y reasociarse con la membrana plasmática del espermatozoide. Estas moléculas, conocidas con el nombre de "factores de decapacitación" (FD), están presentes en plasma seminal, actuando como vesículas donadoras de colesterol y por tanto inhibiendo la capacitación (**Davis et al., 1980; Carbonero y Vázquez, 1984**). La mayor parte de los mecanismos de acción de los FD son desconocidos en la actualidad, existiendo evidencias de la modulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en espermatozoides de ratón por dichos factores. La mayoría de los factores de decapacitación se encuentran en el plasma seminal, asociándose a los espermatozoides en el momento de la eyaculación (**Fraser, 1994; Cummins, 1994**), sin embargo, se han encontrado también FD de origen epididimario (**Fraser et al., 1990**). En gatos, los espermatozoides recuperados del epidídimo son capaces de fertilizar ovocitos inmediatamente después de su obtención, mientras que los espermatozoides eyaculados requieren un tiempo aproximado de capacitación "in vitro" de 3 horas.

Durante el paso de los espermatozoides a través del tracto genital de la hembra el plasma seminal se elimina, y con él, las moléculas responsables de la decapacitación espermática. Este proceso se puede realizar "in vitro" mediante la selección previa de los espermatozoides ("swim-up", gradientes de percoll, sephadex, dextrano, ...) e incubación en un medio de cultivo adecuado.

### **2.4.4. HIPERACTIVACIÓN**

La capacitación de los espermatozoides de mamífero implica numerosos cambios

a nivel de la membrana plasmática, metabólicos, iónicos y cinéticos, estableciéndose una situación celular que se conoce con el nombre de hiperactivación espermática (HA). La hipercinesis es un fenómeno reversible. Siempre que hay capacitación se produce una hiperactividad, pero no siempre que hay hipercinesis tiene lugar la capacitación ni la reacción acrosómica.

La HA, detectada en 1970 por **Yanagimachi** en semen humano, es un proceso fisiológico asociado íntimamente con la ovulación y fertilización, siendo necesario la aparición de este tipo de movimiento para que los espermatozoides puedan atravesar la zona pelúcida (**Katz et al., 1989; Núñez et al., 1995; Burkman, 1995**).

La HA no es un evento sincronizado, presentándose subpoblaciones de espermatozoides hiperactivados a lo largo de la capacitación, apreciando su máximo momentos antes de hacerlo la reacción acrosómica (**Robertson et al., 1988; Aitken, 1990; Burkman, 1995**). Esta asincronía puede deberse a la gran variabilidad existente entre distintos eyaculados con respecto al pico de hiperactivación, o a la heterogeneidad en la duración de la misma (**Núñez et al., 1995**).

La utilización de analizadores computerizados de la movilidad espermática (Computer Assisted Sperm Analyzer, C.A.S.A.) ha permitido la valoración de diversos componentes de la movilidad imposibles de determinar "de visu". La utilización de estos equipos permite la obtención de una medida objetiva del movimiento del espermatozoide y de su trayectoria, la cual se ve modificada cuantitativa y cualitativamente a lo largo del proceso de hipercinesis. Mediante estos sistemas se ha caracterizado el movimiento espermático hiperactivado como un movimiento de gran curvatura y amplitud de su flagelo, observándose un aumento de la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y velocidad curvilínea, así como una disminución del porcentaje de linealidad y velocidad lineal (**Burkman, 1995; Gómez et al., 1996**).



La movilidad espermática "in vitro" varía en función del medio donde se encuentren los espermatozoides, siendo muy susceptible a contaminaciones o cambios en las condiciones del medio (Burkman, 1995; Vinader et al., 1997). Concentraciones de  $K^+$  extracelulares muy altas o bajas inducen un descenso en la HA y en la reacción acrosómica (Fraser, 1983). Las fluctuaciones intracelulares de calcio también inciden en la HA de las células espermáticas (Robertson et al., 1988), así niveles altos de calcio estimulan una hipercinésis y niveles bajos inhiben tal característica. La utilización de  $Ca^{2+}$  ionóforo ó dibutilil AMP cíclico aceleran la capacitación y la aparición de la HA (Suarez y Osman, 1989). La coincubación de espermatozoides con líquido folicular hace aumentar la población de células hiperactivadas, si bien esta acción se ve reforzada por la presencia de progesterona en el medio. La suplementación del medio de incubación con pentoxifilina, inhibidor de la fosfodiesterasa, estimula el movimiento espermático (Nuñez et al., 1994 a; Tournaye et al., 1994; Yovich, 1995).

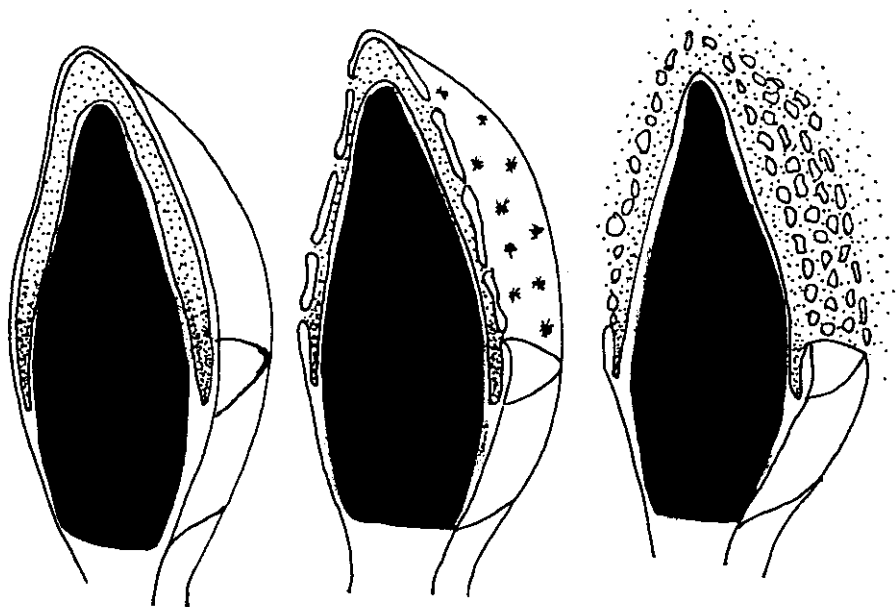
La información aportada por estudios cinéticos en relación a los niveles de espermatozoides hiperactivados existentes en la población, sirve como predicción de la funcionalidad y calidad de la muestra espermática. La HA está correlacionada positivamente con la morfología espermática, la capacidad de unión de los espermatozoides a la zona pelúcida (Kruger et al., 1988), y el test de hámster (Jinno et al., 1987; Burkman, 1995).

#### **2.4.5. REACCIÓN ACROSÓMICA**

La reacción acrosómica (RA) en espermatozoides de mamíferos es un proceso exocítico dependiente de calcio (Robertson y Mortimer, 1988; Anand et al., 1989; Brucker y Lipford, 1995; Fraser et al., 1995). El acrosoma espermático, vesícula secretora procedente del aparato de Golgi, esta formado por una envoltura acrosómica en cuyo interior existen una gran variedad de enzimas hidrolíticas (Olson y Winfrey,

1991; Brucker y Lipford, 1995). Dichas enzimas, desempeñan un papel esencial durante la RA, siendo la liberación inicial de acrosina un estimulador de la RA (Meizel y Lui, 1976) y el responsable de la fijación del espermatozoide al ovocito (Aitken, 1990).

Debido a la posición que ocupa el acrosoma en la cabeza espermática, la membrana acrosómica se dobla, transcurriendo paralela por casi todo el territorio por el que se extiende (Fawcett, 1975). Durante la RA se produce la defenestración entre la membrana plasmática y acrosómica externa en la región apical y en el segmento principal del acrosoma por múltiples fusiones puntuales, debido principalmente a la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Llanos et al., 1982; Watanabe y Masuda, 1989; Brucker y Lipford, 1995), mientras que el segmento ecuatorial permanece intacto durante todo el proceso (Olson y Winfrey, 1991; Fraser, 1994; Mendoza, 1996) (Fig.4).



**Fig.4.-** Esquema del proceso de reacción acrosómica. Generación de múltiples sitios de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa dando lugar a la aparición de múltiples vesículas y vertido del contenido enzimático. El segmento ecuatorial permanece intacto en todo el proceso.

Las enzimas liberadas del acrosoma durante la RA facilitan el paso del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito, cúmulo ooforo y zona pelúcida (Chang, 1984; Fraser, 1994; Cummins, 1995). La sincronía entre ambos eventos es imprescindible para que la fecundación tenga lugar (Tesarik, 1989; Cummins, 1995). Así, una RA prematura implica un descenso de la fertilidad debido a la adhesión de los espermatozoides en la región que rodea las células del cúmulo ooforo. Los espermatozoides que sufren la RA después de atravesar el cúmulo ooforo son capaces de unirse a la membrana pelúcida, dando lugar a la penetración del ovocito (Crozet y Dummont, 1984; Crozet, 1988; Brucker y Lipford, 1995).

En la mayoría de los espermatozoides de mamífero es necesario que se produzca la RA, como consecuencia de la capacitación, para que la fusión con la membrana pelúcida tenga lugar (Crozet y Dummont, 1984; Myles et al., 1987; O'Rand, 1987; Crozet, 1988; Aitken, 1990; Fraser, 1994). Sin embargo, en espermatozoides de ratón se ha comprobado que sólo aquellas células espermáticas con acrosoma intacto pueden unirse a la membrana pelúcida (Florman y Storey, 1982). Algunas células espermáticas pueden sufrir la RA de manera espontánea, existiendo diversas experiencias que muestran la necesidad de moléculas específicas asociadas con el ovocito en la inducción de la RA.

Tras la interacción entre el receptor espermático y el estímulo procedente del ovocito, se dispara la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, donde el influjo de calcio, aumento del pH, receptores de proteína G, y activación de segundos mensajeros junto con la proteína kinasa C y la fosfolipasa, desempeñan un papel principal (Cummins, 1995; Brucker y Lipford, 1995). Como consecuencia de estos eventos se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular, degradación de fosfoinosítoles y formación de diacilglicerol (DAG) que actuaría como mensajero intracelular de la fusión entre la membrana acrosomal externa y la plasmática, produciéndose la pérdida del acrosoma (O'Toole et al., 1996 a).

En la mayoría de las especies, la RA es inducida “in vivo”, en espermatozoides previamente capacitados, por determinadas sustancias presentes en los fluidos próximos al ovocito tales como: líquido folicular, cúmulo ooforo y células de la granulosa (Burcker y Lipford, 1995).

La proporción de espermatozoides susceptibles a esta amplia variedad de ligandos depende de la especie en estudio, del factor individual y de las condiciones del medio de cultivo. La presencia de iones  $K^+$  en el medio es necesaria para que la RA tenga lugar, siendo las concentraciones muy altas o bajas responsables de una mala respuesta acrosómica. Se han encontrado concentraciones de  $K^+$  entre 20 y 30 mM en fluidos procedentes del tracto de la hembra, proponiéndose una posible regulación “in vivo” de la RA en espermatozoides (Fraser, 1983).

La glucosa, utilizada frecuentemente como fuente de energía en los medios de cultivo, puede retardar la aparición de la reacción acrosómica (Rogers y Yanagimachi, 1975), mientras que otros azúcares como la fucosa, lactosa, L-glucosa y galactosa no ejercen esta acción sobre los espermatozoides.

La peroxidación lipídica y los radicales libres reducen la fluidez de la membrana plasmática, inhibiendo los procesos fusogénicos de membrana y por tanto la RA (Ohyashiki et al., 1988).

El desarrollo de las técnicas de fecundación “in vitro” (FIV) pretende analizar la capacidad fertilizante de un eyaculado (Takahashi et al., 1992), siendo la determinación de la RA en espermatozoides y el test de hámster las pruebas más correlacionadas con el FIV, si bien existen detractores de esta la primera técnica como método de predicción de la fertilidad (Vázquez et al., 1993).

### **2.4.5.1. INDUCTORES DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA**

Existen diversos fluidos y moléculas capaces de inducir la reacción acrosómica “in vivo” y/o “in vitro” en espermatozoides de mamífero, requiriendo o no de una capacitación previa, tal es el caso de la progesterona (presente de manera fisiológica en las células del cúmulo y en el fluido folicular) (Emiliozzi et al., 1996), ionóforo A23187 y heparina (Aitken, 1990; Gutierrez et al., 1993; Cummins, 1995; Brucker y Lipford, 1995; Llanos y Anabalón, 1996; Cross, 1996). Los cambios de temperatura así como la congelación también inducen un aumento de la RA (Sánchez et al., 1991 a; Garde, 1992 b; Sánchez et al., 1995). La reacción acrosómica inducida (fisiológica) y no la espontánea tiene función biológica esencial (Tesarik, 1989), de ahí la importancia de conocer la curva de capacitación (Garde, 1992 b; Takahashi et al., 1992) y la distinción entre RA inducida y espontánea (Cummins, 1995).

Los inductores de la RA son utilizados generalmente en programas de fecundación “in vitro” con el fin de aumentar el porcentaje de espermatozoides potencialmente capaces de fecundar un ovocito. Así mismo, dichas sustancias son utilizadas en pruebas diagnósticas de la capacidad fecundante de un eyaculado.

#### **2.4.5.1.1. Ionóforos**

Los ionóforos son moléculas capaces de estimular la RA en espermatozoides capacitados mediante la inducción de un flujo de calcio hacia el interior del espermatozoide (Cummins, 1994; Carrell et al., 1996). Si bien estos inductores son utilizados ampliamente en pruebas laboratoriales, los resultados han de ser correctamente analizados, ya que: 1) son moléculas potencialmente citotóxicas; y 2) ejercen una acción negativa sobre la movilidad y viabilidad espermática.

Existen diversos ionóforos comercializados, siendo el ionóforo A23187 el más utilizado en la inducción de la RA (Aitken et al., 1984; Roldan y Harrison, 1989; Tesarik, 1993; Bielfeld et al., 1994; Carrell et al., 1996). El efecto ejercido por los ionóforos sobre los espermatozoides varía dependiendo de la concentración espermática y del nivel de proteínas presentes en el medio (Roldan y Harrison, 1989; Cummins, 1994). La concentración de ionóforo A23187 y el tiempo de exposición al que se somete a los espermatozoides varía dependiendo de la especie y del medio utilizado, por lo que no existe uniformidad en el método utilizado por los diversos autores (Tabla 5).

**Tabla 5.-** Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo A 23187 y tiempo de exposición para las diferentes especies.

Especie	[ $\text{Ca}^{2+}$ ionóforo]	Tiempo	Referencia
Bovino	10 $\mu\text{M}$	60 min.	Fraser et al., 1995.
	1 $\mu\text{M}$	60 min.	Whitfield et al., 1995.
Equino	5 $\mu\text{M}$	30-60 min.	Valcárcel et al., 1996.
Porcino	2 $\mu\text{M}$	30 min.	Berger et al., 1988.
Hamster	20 $\mu\text{M}$	10 min.	Tateno et al., 1996.
Humano	10 $\mu\text{M}$	30 min.	Bielfeld et al., 1994.
	50-100 $\mu\text{M}$	0.5-3.0 h.	Aitken et al., 1984.
Ovino	10 $\mu\text{M}$	-	Roldan et al., 1989*.
	1 $\mu\text{M}$	-	Roldan et al., 1989**
	5 $\mu\text{M}$	30-60 min.	Pérez et al., 1996
Caprino	10 $\mu\text{M}$	-	Bawa et al., 1993.
	0.5 $\mu\text{M}$	2 min.	Hanada, 1985.

\* Medio con BSA; \*\* Medio sin BSA

El momento de aplicación del calcio ionóforo influye sobre el total de espermatozoides reaccionados, no mostrando diferencias significativas en el valor absoluto de la prueba (Cummins et al., 1991). La incubación durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad del semen puro de morueco, induce no sólo el aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados, sino que también el incremento de la proporción de células espermáticas susceptibles al ionóforo (Pérez et al., 1997).

#### 2.4.5.1.2. Zona Pelúcida

La mayoría de la información de la que se dispone actualmente sobre la inducción de la RA se debe a la utilización de ovocitos de hembra de ratón (Cummins, 1994). Partiendo de estudios realizados en esta especie, se ha llegado a determinar la composición de la membrana pelúcida. Dicha membrana esta compuesta por tres glicoproteínas (en algunas especies 4): ZP1, ZP2 y ZP3. Estas dos últimas, Zp2 y ZP3, son moléculas de aspecto filamentoso unidas por ZP1, más globular, dando lugar a la formación de una red tridimensional. ZP1 y ZP2 son glicoproteínas estructurales, mientras que la glicoproteína ZP3 es la encargada del reconocimiento e inducción de la reacción acrosómica en ratón. El reconocimiento entre ambos gametos parece estar mediado por un carbohidrato de la glicoproteína ZP3, presente en la zona pelúcida del ovocito, y por una enzima galactosil-transferasa localizada en la membrana plasmática del espermatozoide (Burckman y Lipford, 1995).

Debido a la especificidad de la membrana pelúcida, dichas membranas son obtenidas a partir de ovocitos de la misma especie que los espermatozoides estudiados.

#### **2.4.5.1.3. Líquido folicular, oviductal y células del cúmulo**

El fluido folicular ha sido ampliamente utilizado como estímulo de la movilidad espermática e inductor de la RA (Cummins, 1994; Burcker y Lipford, 1995). El estudio de la composición del fluido folicular ha mostrado la presencia de proteasas, inhibidores de proteasas, péptido natriurético auricular (PNA), antitrombina III, además de una amplia variedad de esteroides.

El fluido oviductal desempeña un papel decisivo al final de la capacitación “in vivo”, induciendo la RA. Sin embargo, la dificultad de obtener la suficiente cantidad de éste líquido para el desarrollo de los diversos estudios, hace que este fluido no sea comúnmente utilizado. Existen observaciones que muestran el fluido oviductal es mejor que el folicular para el mantenimiento de la movilidad “in vitro” (Zhu et al., 1994). El cocultivo de los espermatozoides con células procedentes del oviducto presenta unos buenos resultados de capacitación y RA (Gutierrez et al., 1993; Park y Sirard, 1996).

Estudios realizados tanto “in vivo” como “in vitro” muestran la acción del cumulo ooforo como potenciador de la RA, siendo su acción similar a la encontrada en el líquido folicular (Cummins, 1994). Martín-Lunas et al. en 1996 observan que la inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides de macho cabrío es independiente de la calidad de del cúmulos ooforo.

#### **2.4.5.1.4. Progesterona**

La progesterona induce el influjo de calcio hacia el interior del espermatozoide, lo que resulta en un incremento de la RA (Emiliozzi et al., 1996; O’Toole et al., 1996 b). Parece existir un receptor no genómico en la superficie del espermatozoide.



La progesterona estimula la exocitosis en espermatozoides previamente capacitados de manera dosis-dependiente (Llanos y Anabalón, 1996; Emiliozzi et al., 1996), siendo utilizado en casos de infertilidad masculina como potenciador de la capacidad fecundante (Emiliozzi et al., 1996). El flujo de iones Na<sup>+</sup> (O'Toole et al., 1996 b) y la acción de una tripsin-proteasa (Llanos y Anabalón, 1996) parecen estar implicados en el mecanismo de acción de la progesterona.

#### **2.4.5.1.5. Moduladores metabólicos**

Tanto la capacitación, hiperactivación como la reacción acrosómica son procesos dependientes de AMP cíclico (AMP-c) (Anand et al., 1989; Cummins, 1994; Fraser et al., 1995). La utilización de xantina, cafeína, teofilina y pentoxifilina produce un aumento de la concentración de AMP-c debido a la inhibición de la fosfodiesterasa (Cummins, 1994), existiendo una posible acción sobre la fluidez de la membrana espermática mediante su interacción con receptores adenosínicos. La cafeína muestra efectos negativos sobre la viabilidad espermática debido a su acción como inhibidor de los mecanismos de reparación del DNA y a su potencial mutagénico (Fernández et al., 1990). La pentoxifilina incrementa el porcentaje de RA y la movilidad espermática, siendo su uso recomendado en eyaculados de baja movilidad (Nuñez et al., 1994 a).

Los análogos del AMP-c (ej. dibutilil AMP-c) estimulan la actividad de la proteína-Kinasa, incrementando el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

#### **2.4.5.1.6. Efecto de la disminución térmica**

Estudios recientes muestran un aumento del porcentaje de RA, correlacionado positivamente con el FIV (Cummins, 1994) y test de hamster (Sánchez y Schill, 1991

a), como consecuencia del descenso de temperatura. Actualmente no existe una explicación clara de este fenómeno, pero probablemente las bajas temperaturas inactivan la bomba de calcio, encargada de mantener los niveles de calcio intracelular bajos, permitiendo un influjo de calcio e incrementando la RA.

Si bien el objetivo principal de la congelación espermática es el almacenamiento de dosis por un período indefinido de tiempo, se ha observado un aumento de la RA en dosis descongeladas de ovino (Garde et al., 1992 b) y humano (Centola et al., 1990).

#### 2.4.5.1.7. Otros factores

Los glicosaminoglicanos (ej. heparina) forman parte importante de la composición de los fluidos del tracto reproductor de la hembra, tales como en el moco cervical, fluidos folicular y oviductal además de formar parte del gel que soporta el cumulo ooforo (Cummins, 1994). Estos compuestos son utilizados como compuestos inductores de la capacitación espermática, incrementando el porcentaje de células hiperactivadas así como la RA (Ávila Cantariño et al., 1993; Fraser et al., 1995; Cox et al., 1995). La acción de la heparina es contrarrestada por la glucosa, antagonizando su acción sobre la adenilato ciclasa.

Las secreciones de la glándula bulbouretral de macho cabrío añadidas a un medio de leche también son capaces de inducir la RA, mientras que las secreciones procedentes de las vesículas seminales contrarrestan este efecto (Courtens et al., 1984).

Las catecolaminas incrementan la movilidad espermática así como el porcentaje de espermatozoides de hámster reaccionados en presencia de BSA (Cornett y Meizel, 1978).

#### 2.4.5.2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

El análisis de los cambios ocurridos en el espermatozoide durante la reacción acrosómica bajo condiciones “in vivo” o “in vitro”, requiere la utilización de diversos métodos de detección del estado acrosoma (Cummins, 1994). La determinación de este proceso exocitótico es complicado, ya que las características del acrosoma espermático varían en función de la especie en estudio, debiendo de adaptar cada técnica de análisis según la especie. Además, los espermatozoides muertos pueden sufrir cambios degenerativos en su acrosoma similares a los observados durante la reacción acrosómica, de ahí la importancia de determinar la presencia o ausencia del acrosoma en espermatozoides viables y/o no viables (muertos).

La mayoría de los estudios realizados sobre el estado del acrosoma en espermatozoides se basan en la utilización de técnicas de microscopía electrónica y de fluorescencia, determinando la presencia, forma y/o tamaño del acrosoma. La microscopía óptica y de contraste de fases, si bien revelan información útil sobre éste liposoma modificado, se muestran como técnicas poco precisas en un estudio detallado del estatus acrosomal. Sin embargo, la microscopía electrónica y de fluorescencia requiere equipos costosos y un entrenamiento del personal técnico (Cummins, 1994), por lo que su uso generalmente, se restringe a determinados estudios y no como metodología de rutina.

La utilización de la microscopía de fluorescencia suele ir asociada a la utilización de lectinas vegetales (Tesarik et al., 1993; Cummins, 1994) o anticuerpos (Fénichel et al., 1989; Sánchez et al., 1991 b; Cummins, 1994; Moutaffian y Parinaud, 1995), unidos normalmente a marcadores fluorescentes (ej. fluoresceína, isotiocianato fluorescente). Tanto las lectinas como los anticuerpos se pueden dirigir contra el contenido acrosómico o contra la membrana del acrosoma. Las lectinas determinan la presencia y distribución de determinados azúcares en la membrana plasmática y/o en la

membrana acrosomal interna (si se ha producido previamente la RA). Algunas lectinas utilizadas en la detección de los procesos de capacitación, tales como: *Pisum Sativum* (PSA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Maclura pomifera* (MPA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycine max* (SBA) y *Triticum vulgare* (WGA) (Centola et al., 1990; Cummins et al., 1991; Bawa et al., 1992; Tesarik et al., 1993; Cummins, 1994; Jimenez Cabras, 1995; Liu y Gordon, 1995; Valcárcel et al., 1996). En espermatozoides de macho cabrío se ha detectado la presencia de MPA, BSA y WGA en la región cefálica tras la capacitación espermática, existiendo un aumento de los receptores de ConA tras la RA (Bawa et al., 1992). Berger en 1990, propone la utilización de la lectina PSA como método de detección del acrosoma en espermatozoides procedentes de eyaculados de macho cabrío. El uso de lectinas suele ir asociado a test vitales o a test de permeabilidad de membrana con el fin de diferenciar el estado del acrosoma en células viables y no viables (Sánchez et al., 1991 b; Cummins, 1994; Gómez et al., 1996 a; Valcárcel et al., 1996). La técnica de la clorotetraciclina (CTC) y la utilización de BSA unido a quinacrina o fluoresceína, son métodos de fluorescencia alternativos en la detección del acrosoma espermático (Abdel-Halim et al., 1996; Pérez et al. 1996).

La utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales determina la presencia o no del acrosoma mediante la unión de dichos anticuerpos a receptores específicos presentes en la superficie de la membrana (Fénichel et al., 1989; Sanchez et al., 1991 a; Cummins, 1994; Moutaffian y Parinaud, 1995). La mayor ventaja que presenta esta técnica sobre la utilización de lectinas se debe a la posibilidad de identificar el estado del acrosoma en presencia de glicoconjugados y de otro material celular.

Debido a la complejidad de las diversas técnicas anteriormente citadas, y a la imposibilidad de observación del acrosoma mediante contraste de fases en determinadas especies, como es el caso del humano, la evaluación de la presencia o ausencia del acrosoma mediante tinciones para microscopía óptica de campo claro, es actualmente,

una de las técnicas de mayor difusión entre los diversos equipos investigadores. Entre las tinciones más utilizadas es de resaltar la triple tinción, descrita por primera vez por **Talbot y Chacon** en 1981 para semen humano. Esta técnica es capaz de clasificar los espermatozoides en cuatro categorías (vivos con acrosoma intacto; vivos reaccionados; muertos con acrosoma intacto y muertos reaccionados) mediante el empleo de azul Tripán, marrón Bismark y rosa de Bengala. La triple tinción ha sufrido distintas modificaciones en su adaptación a diversas especies: equidos (**Varner et al., 1987**), caprinos (**Kusunoki, 1984; Martín-Lunas et al., 1996**), porcinos (**Vázquez, 1991**), bovidos (**Didion y Graves, 1986**) y ovidos (**Garde et al., 1992 a**). Debido al tiempo que consume esta técnica para su realización, se ha descrito una variante de esta tinción, en la que el azul Tripán ha sido omitido.

#### **2.4.6. CAPACITACIÓN “IN VITRO”**

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 como métodos de potenciación de la capacidad fecundante de un eyaculado (**Maneiro, 1991; Yovich, 1995**).

El desarrollo de técnicas capaces de recuperar los espermatozoides móviles del total de la población, nos permite seleccionar aquellas células espermáticas con mayor movilidad y capacidad fecundante, siendo posteriormente aplicables en programas de inseminación intrauterina (IU) y FIV (**Yovich, 1995**). Dichas técnicas inducen la

capacitación espermática debido a la eliminación del plasma seminal, y por lo tanto de los FD (a la vez que impurezas presentes en el eyaculado), activando los procesos de HA y RA. Entre las técnicas de recuperación de espermatozoides móviles más utilizadas encontramos el “swim-up”, gradientes de percoll, filtración en columnas de Sephadex y el dextrano, existiendo como metodologías simples o combinaciones entre ellas (Alvarez et al., 1993; Seidel et al., 1995; Parrish et al., 1995, Nuñez et al., 1996; Garcia-Lopez et al., 1996; Al-Hasani et al., 1996; Pérez et al., 1996; Anzar y Graham, 1996).

Estudios comparativos entre las distintas metodologías de capacitación “in vitro” muestran la técnica de “swim-up” como el método más sencillo y barato, obteniendo resultados similares, en cuanto al número de espermatozoides móviles y concentración espermática recuperados a los encontrados en gradientes de percoll (Mortimer et al., 1984; Morales et al., 1991; Nuñez et al., 1996). Sin embargo, cuando los eyaculados en condiciones iniciales presentan baja calidad seminal, se observa un incremento en la concentración espermática recuperada y del porcentaje de espermatozoides móviles tras la utilización de gradientes de percoll con respecto a los resultados obtenidos mediante swim-up (Morales et al., 1991; Parrish et al., 1995). La centrifugación requerida en las técnicas de swim-up y percoll induce la formación de radicales libres, cuyo efecto negativo puede ser prevenido por la adición de antioxidantes al medio de lavado (Griveau y Lannou, 1994).

Los medios de incubación utilizados en la inducción de la capacitación “in vitro” poseen una alta fuerza iónica con el objeto de desplazar los FD, y un pH alcalino (pH: 7,8-8), responsable de apartar las proteínas de la superficie de la membrana plasmática, incrementando el flujo de calcio hacia el interior de las células espermáticas y produciendo una activación de las fosfolipasas (Iwamatsu y Chang, 1971).

La incubación de los espermatozoides con el fin de inducir “in vitro” la

capacitación espermática requiere condiciones ambientales definidas de humedad y CO<sub>2</sub> (5%), observándose variaciones en la temperatura (+37°C ó +39°C) y tiempo de incubación (3, 6, ..., 24 horas) según la especie y procedencia de los espermatozoides (Anand et al., 1989). Los procesos de capacitación y RA "in vitro" se presentan más rápidamente cuando las células espermáticas se preincuban a +39°C (Garde, 1992 b), siendo este efecto más evidente cuando los espermatozoides proceden de dosis congeladas (Garde, 1992 b; Park y Sirard, 1996; Pérez et al., 1996).

Actualmente la utilización de inductores de la reacción acrosómica junto con técnicas de capacitación "in vitro" nos permite obtener mayor información acerca de posibles disfunciones de la capacidad fecundante de los espermatozoides. El test ARIC (Acrosomal Reaction Induction Challenger) es utilizado actualmente con éxito como prueba diagnóstica de la capacidad fecundante de un eyaculado en semen humano (Cummins et al., 1991). La estimulación del máximo de reacción acrosómica mediante la utilización de ionóforo A23187 varía en función de la especie, concentración espermática y características del medio utilizado. La diferencia existente entre la muestra inducida con el ionóforo y la control (muestra espermática sometida a un medio con 10% de DMSO), proporciona información acerca del porcentaje de células espermáticas potencialmente fértiles (valor del ARIC) (Cummins et al., 1991). Los resultados obtenidos mediante el test ARIC están correlacionados positivamente en semen humano con la penetración en ovocitos homólogos y heterólogos (ovocitos de hámster). Un incremento inferior al 5% de reacción acrosómica tras la adición del ionóforo esta correlacionado con eyaculados de bajas tasas de fecundación. El test ARIC resulta más económico a la vez que requiere de un tiempo menor para su realización (Cummins, 1995).

La pentoxifilina, inductor de la HA y RA, es utilizada en muestras espermáticas previamente capacitadas como prueba diagnóstica de infertilidad (Cummins, 1994).

## 2.5. FECUNDACIÓN

Los espermatozoides depositados en el tracto reproductor de la hembra tras la eyaculación, son transportados hasta al lugar de encuentro con el ovocito mediante movimientos y contracciones musculares del útero (inducidas por la cópula), a la vez que se ayudan del movimiento activo generado por el flagelo espermático (Lorenzo, 1994). Durante el transporte, se produce la selección de los espermatozoides a su paso por las distintas estructuras del tracto reproductor femenino, iniciándose la capacitación espermática gracias a la eliminación del plasma seminal y a la interacción con los fluidos uterinos y oviductales (Cummins y Yanagimachi, 1982).

Una vez que la capacitación ha tenido lugar, dando paso a la HA y RA, se produce la fusión gamética. Después que el espermatozoide ha sido incorporado al citoplasma ovocitario, desaparece la membrana nuclear del espermatozoide y ocurre la descondensación de la cromatina espermática. La fusión del espermatozoide con el ovocito ocasiona ciertos cambios a nivel de la membrana plasmática ovocitaria, provocando la ruptura de los gránulos corticales, cuyo contenido al contacto con la zona pelúcida provoca la llamada “reacción de zona” (Vigil y Leontic, 1986; Lorenzo, 1994). Estos mecanismos evitan la posibilidad de poliespermia. Existen especies que dependen únicamente de la reacción a nivel de la zona pelúcida para evitar la poliespermia (ej: ovocitos de hamster), por lo que si se denuda su zona pelúcida se puede producir la penetración de varios espermatozoides (Vigil y Leontic, 1986).

Los mecanismos anti-poliéspermia funcionan a dos niveles, en la membrana vitelina del ovocito y en la zona pelúcida, interviniendo activamente las ZP. Algunas enzimas de los gránulos corticales inactivan o enmascaran las funciones de las glicoproteínas ZP2 y ZP3, imposibilitando la fijación de otros espermatozoides a la misma (Wassarman, 1990; Yanagimachi, 1984). La eficacia de estos mecanismos varía entre las distintas especies animales, siendo muy efectivo el bloqueo en la perra, vaca y hamster, mientras que en ratona



y coneja no lo es tanto (Lorenzo, 1994). En salamandras y pájaros, numerosos espermatozoides son capaces de fusionarse con el ovocito dando lugar a la formación de varios pronúcleos (PN) masculinos, sin embargo, sólo uno de ellos es capaz de unirse al pronúcleo femenino, produciéndose la degeneración del resto de los PN.

Tras la fecundación, los componentes celulares del espermatozoide se incorporan al citoplasma del ovocito. La cabeza espermática descondensada y los cromosomas femeninos se rodean de una membrana nuclear, procedente del retículo endoplásmico del ovocito, constituyéndose los PN masculino y femenino. El núcleo femenino, detenido en el momento de la ovulación en el estadio de metafase de la segunda división meiótica, finaliza la segunda de las divisiones meióticas y extruye el segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino, comenzando la descondensación y replicación del ADN como paso previo a la sincariosis y a la primera división de segmentación embrionaria (Vigil y Leontic, 1986; Lorenzo, 1994).

### **2.5.1. FECUNDACIÓN “IN VITRO”**

Los estudios realizados sobre la fecundación “in vitro” (FIV) fueron desarrollados, originalmente, con el objeto de dilucidar los mecanismos y procesos que intervenían en la fecundación (Cummins y Yanagimachi, 1982). Sin embargo, actualmente son aplicados como test de capacidad fecundante de machos, así como a la obtención de embriones a partir de ovarios conseguidos en el matadero, sobre todo en rumiantes y cerdos, dando también soluciones a ciertos tipos de infertilidad.

Las técnicas de fecundación “in vitro” consisten, básicamente, en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal manera que se produzca la fecundación fuera del oviducto materno. Recientemente se ha dado mucha importancia a la microinyección de un espermatozoide en un ovocito debido a la posibilidad de conseguir su fecundación a partir de células espermáticas inmóviles e incluso muertas (Goto et al., 1990;

**Goto et al., 1995; Dell'aquila et al., 1997; Gómez y Pellicer, 1997**), observándose una disminución en el tiempo de formación de los pronúcleos cuando se microinyecta un espermatozoide reaccionado frente a uno con acrosoma intacto (**Ryul et al., 1997**).

Los ovocitos utilizados en las técnicas de FIV pueden ser de la misma especie que los espermatozoides, *FIV homólogos*; o de distinta, *FIV heterólogos*, necesitando en este caso la denudación de la zona pelúcida. Los sistemas FIV homólogos son empleados para la obtención de embriones cuando la fecundación "in vivo" no puede llevarse a término (problemas de infertilidad, ovocitos obtenidos de matadero, ...) así como para el estudio de los mecanismos fisiológicos implicados en la fecundación (**Ball et al., 1983; Nagai et al., 1984; Cox et al., 1995; Martino et al., 1995**). La fecundación heteróloga, en la que se utilizan mayoritariamente ovocitos denudados de hamster dorado, es aplicada principalmente como test de la capacidad fecundante de machos, siendo también utilizados, al igual que el sistema anterior, para el estudio de la fusión gamética (**Kato et al., 1985; Graham y Foote, 1987; Kusunoki et al., 1989; Tateno et al., 1996; Garde, 1992 b; Berger et al., 1994; Seidel et al., 1995; Palomo et al., 1995**). El test de *Fucus* utiliza ovocitos procedentes de algas para la selección de espermatozoides potencialmente fértiles, evidenciando la capacidad fecundante de un eyaculado (**Jimenez Cabras, 1995**).

Los ovocitos empleados para ambos sistemas pueden haber sido madurados "in vivo" (**De Smedt et al., 1992; Crozet et al., 1995**) ó "in vitro" (**Ball et al., 1983; Song e Iritani, 1988; Martino et al., 1995; Cox et al., 1995; Park y Sirard, 1996**), disminuyendo la eficacia de los procesos FIV respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados "in vivo" frente a los madurados "in vitro" (**De Smedt et al., 1992; Lorenzo, 1994; Crozet et al., 1995**). Los ovocitos inmaduros obtenidos a partir de ovarios de cabras son especialmente sensibles a la temperatura (**De Smedt et al., 1992**).

Después de obtener ovocitos maduros y espermatozoides capacitados, deben fijarse las condiciones ambientales a las que se someten los gametos para que la fecundación tenga

lugar. El tiempo y temperatura de cocultivo de ambos gametos así como la concentración espermática utilizada varía en función de la metodología empleada por los distintos autores (**Tabla 6**). El número de espermatozoides utilizados por ovocito es un factor limitante del éxito de la FIV (**Berger, 1989; Foxcroft et al., 1995; Palomo et al., 1995**), ya que si se utiliza una baja concentración puede no producirse la fecundación, mientras que si es demasiado alta se pueden producir fenómenos de poliespermía (**Foxcroft et al., 1995**). La utilización de 100  $\mu\text{g/ml}$  de heparina sobre una concentración espermática final de 5 millones de espermatozoides/ml se muestra como el tratamiento más adecuado para la capacitación de semen caprino debido a su menor índice de poliespermía (**Palomo et al., 1995**).

**Tabla 6.-** Condiciones de cocultivo utilizadas en la realización FIV.

Especie	Coincubación (Horas)	Concent. Espz. (millones/ml)	FIV	Referencia
Porcino	3-5	4	Heteróloga	Berger y Parker., 1989. Nagai et al., 1984.
	28-29	2	Homóloga	
Bovino	6	1-2	Heteróloga	Bousquet et al., 1982. Ball et al., 1983.
	24-48	4	Homóloga	
Humano	3	2	Heteróloga	Renard et al., 1996. Wolf et al., 1983. Wolf et al., 1983.
	3	2.5-20	Heteróloga	
	16	-	Homóloga	
Ovino	4-5	1	Heteróloga	Garde, 1992 b. Crozet et a., 1987.
	16	1	Homóloga	
Caprino	25	400-500	Homóloga	Song et al., 1988*. Berger, 1989. Cox et al., 1995. Martino et al., 1995.
	5	10	Heteróloga	
	18	1	Homóloga	
	17	1	Homóloga	

\* Espermatozoides procedentes del epidídimo.

El mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas durante todo el proceso es determinante para conseguir buenos resultados. El pH del medio de cultivo varía entre 7,4 y 7,8, mientras que la osmolaridad oscila entre 290-300 mOsm/kg (Aitken et al., 1983; Yanagimachi, 1984; Berger y Parker, 1989). La concentración gaseosa es la misma que las utilizadas en los sistemas de maduración "in vitro" 2,5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en el aire. La concentración de albúmina utilizada en los medios de cultivo varía entre 0,3 y 3,5% (Yanagimachi, 1984). La presencia de calcio y metabolitos exógenos como fuente de energía son requeridos en el caso de preincubaciones prolongadas. La adición de metilxantinas incrementa la penetración espermática en ovocitos de bovino madurados "in vitro" (Hamawaki et al., 1995).

Los medios utilizados en FIV son básicamente los mismos que los utilizados en la maduración "in vitro" de los ovocitos o en la preparación y capacitación de los espermatozoides (BWW, M-199, KRB-m, TALP). La utilización de antioxidantes al medio de cultivo no resulta en un aumento del número de ovocitos útiles madurados "in vitro" (Elhassan y Wright, 1995).

#### 2.5.1.1. TEST DE HAMSTER.

En 1976 Yanagimachi y colaboradores descubrieron la capacidad del ovocito de hamster dorado, tras eliminación de su zona pelúcida, de fusionarse con espermatozoides humanos después de ser capacitados "in vitro" y haber sufrido la reacción acrosómica. A partir de este momento, se realizaron numerosos estudios para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides "in vitro" mediante la aplicación del test de hamster en una gran variedad de mamíferos como método alternativo al test de penetración homólogo. Entre estas especies se puede incluir el toro (Bousquet y Brackett, 1982; Graham y Foote, 1987; Kreysing et al., 1995), caballo (Brackett et al., 1982), verraco (Berger y Parker, 1989; Seidel et al., 1995), ciervo (Garde et al., 1994), morueco (Garde, 1992 b;

Choudhry et al., 1995) y macho cabrío (Kato et al., 1985; Kusunoki et al., 1989; Berger, 1989; Berger et al., 1994; Palomo et al., 1995). Los resultados obtenidos mediante la fecundación "in vitro" heteróloga sirven de ayuda en el diagnóstico y selección de los individuos reproductores (Virgil y Leontic, 1986; Graham y Foote, 1987) siempre y cuando se hayan caracterizado previamente las condiciones óptimas de esta técnica para la especie en cuestión (Graham y Foote, 1987; Berger y Parker, 1989), existiendo, sin embargo, variaciones en la metodología entre los distintos autores (Tabla 6).

**Tabla 6.-** Variación de las condiciones de cocultivo heteróloga (test de hamster)

Especie	Preincub (horas)	Cocultivo (horas)	Conc. Espz (millones/ml)	n° ovocitos	Referencia
Porcino	1-5	3-5	4	20	Berger et al., 1989
	1	18	2	30	Seidel et al., 1995
Bovino	1	6	1-2	5-10	Bousquet et al., 1982.
	-	3	6	-	Graham y Foot, 1987.
Humano	3	2	2	20	Sanchez y Schill, 1991.
	3	3	2	40	Renard et al., 1996.
Ovino	6	4-5	10	20	Garde, 1992 b.
	1-3	5	6-9	20	Chandhry et al., 1995.
Caprino	5,5	5	10	50	Kato et al., 1984.
	1	5	10-40	-	Berger et al., 1990.
	-	17	5	15	Palomo et al., 1995.

Se ha demostrado que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de espermatozoides utilizada y el resultado del test de hamster (Martin y Taylor, 1983, Berger, 1989). Los resultados encontrados en el test de hamster tras la

utilización de concentraciones espermáticas de 40 millones de espz/ml en semen caprino, no difieren significativamente de los obtenidos con 10 millones espz/ml (**Berger, 1989**). La concentración óptima establecida por diversos autores oscila entre 1 a 10 millones de espz/ml (**Martin y Taylor, 1983; Vigil y Leontic, 1986; Choudhry et al., 1995**).

Otra gran ventaja que presenta esta técnica es la posibilidad de congelar y almacenar, por un tiempo indefinido de tiempo, los ovocitos obtenidos a partir de hembras de hamster doradas superovuladas, evitando el mantenimiento de una colonia de animales reproductores y de sus instalaciones (**Tobback et al., 1991**). Las tasas de recuperación de ovocitos obtenidos con membrana pelúcida íntegra y citoplasma esférico tras su descongelación se sitúa sobre el 94% (**Tobback et al., 1991**).

Se han realizado múltiples intentos de correlacionar las distintas pruebas de laboratorio con el test de hamster, no encontrándose una relación bien definida entre el resultado del test y parámetros como la movilidad o concentración espermática (**Rogers, 1985**). **Garde en 1992 b** demostró la existencia de una correlación positiva entre el test de hamster, endósmosis y triple tinción en semen capacitado de morueco. Diversas investigaciones realizadas en especies domésticas muestran altas correlaciones entre el test de hamster y la fertilidad "in vivo" en ganado vacuno y porcino (**Graham y Foote, 1987; Berger y Parker, 1989**), existiendo variación en la penetración de ovocitos entre los distintos sementales (**Bousquet y Brackett, 1982; Garde, 1992 b**). **Berger en 1989**, observa una relación positiva pero no significativa entre el TH y la morfometría espermática en semen caprino.

Los resultados positivos obtenidos en el test de hamster indican exclusivamente la capacidad de los espermatozoides en sufrir la capacitación, RA y fusión con la membrana del ovocito, por lo que no necesariamente, estos resultados positivos implican que los espermatozoides en cuestión puedan fecundar "in vivo", ya que la fecundación implica otros muchos factores. Ello hace, que esta prueba no sea tan sensible como la FTV homóloga. Los

muchos factores. Ello hace, que esta prueba no sea tan sensible como la FIV homóloga. Los resultados negativos indican claramente que los espermatozoides son incapaces de realizar alguno o todos de los procesos anteriormente citados, y que además, probablemente sean incapaces de fecundar "in vivo".

### **3. MATERIAL Y METODOS**



## **3.1. MATERIAL**

### **3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **3.1.1.1. MACHOS REPRODUCTORES**

Han sido seleccionados para este estudio 5 machos cabríos, 3 de la raza Malagueña y 2 de raza Murciano-Granadina, de un lote de partida de 10 individuos, todos ellos pertenecientes al Área de Reproducción Animal del CIT/INIA de Madrid. La edad media del rebaño al inicio de la experiencia fue de 11 meses, siendo necesario el entrenamiento previo de los mismos durante 3 meses.

Los machos fueron mantenidos en régimen de semi-estabulación, con alimentación homogénea durante todo el año: pienso concentrado (750 g/animal/día), paja de cereales y heno de alfalfa (750 g/animal/día), bloques de minerales-oligoelementos y agua a libre disposición a lo largo de toda la experiencia.

Los animales fueron desparasitados dos veces al año mediante la aplicación intramuscular de 2 cc de Ivomec. Coincidiendo con el comienzo del invierno se les suministró un complejo vitamínico, 2 cc Vit. A+D.

#### **3.1.1.2. HUEVOS DE GALLINA**

Se utilizó como crioprotector no penetrante yema de huevo de gallina, con no más de 3-4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización, siendo este tiempo variable dependiendo de la estación del año (en época estival se ha de realizar un control más estricto).

La calidad de la yema de huevo varía en función de la raza y de la alimentación de las gallinas.

### **3.1.1.3 OVOCITOS DE HAMSTER**

Se emplearon ovocitos congelados de hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) para la realización de la prueba de penetración espermática, suministrados por el Departamento de Biología Celular y Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona (**Grossmann et al., 1991**). Dichos ovocitos se obtuvieron de hembras hamster superovuladas con PMSG y HCG. Quince horas después de la inyección de HCG fueron sacrificadas por dislocación cervical, extrayendo los oviductos para obtener masas de cúmulo ooforo. Las células del cúmulo fueron dispersadas con hialuronidasa al 0.1%. Los ovocitos fueron congelados libres de células foliculares.

Los ovocitos se presentan en pajuelas termoselladas de 0,25 ml, con un contenido medio de 12-13 ovocitos/pajuela. El almacenamiento de las pajuelas se realiza en tanques criogénicos a una temperatura de -196° C.

### **3.1.2. MATERIAL EMPLEADO EN LA RECOGIDA DEL SEMEN**

- Caja de transporte.
- Colectores de cristal graduados en 0,1 ml (10 ml), I.M.V. Mod. VA 134
- Estufa de incubación( ajustada a + 37° C), SELECTA Mod. 237
- Funda protectora para vagina artificial, I.M.V. Mod. VA 131
- Potro de sujeción de la hembra
- Tubos cónicos intermediarios entre vagina artificial y tubo colector, I.M.V.

Mod.VA 132

- Vagina artificial de ovino-caprino, I.M.V. Mod. VA 130

### **3.1.3. MATERIAL EMPLEADO EN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN**

- Barqueta, I.M.V. Mod. GC 001
- Pajuelas 0,25 ml, I.M.V. Mod. A 201
- Peines de aspiración, I.M.V. Mod. GC 001
- Pinzas con muesca para pajuelas, I.M.V. Mod.F 005
- Rampa horizontal de congelación, I.M.V. Mod. J 005
- Soporte de barqueta, I.M.V. Mod. GC 003
- Soporte de distribución de pajuelas 0,25 ml, I.M.V. Mod.GB 003
- Recipiente criogénico para la congelación de pajuelas, I.M.V. Mod.CD-50
- Recipiente criogénico de almacenamiento de pajuelas, L'AIR LIQUIDE Mod. GT 26
- Termómetro digital, OMEGA Mod. 450ATT
- Visotubos para la distribución de pajuelas, I.M.V. Mod. PA 002
- Vitrina de refrigeración, I.M.V. Mod.G 006

### **3.1.4. MATERIAL DE LABORATORIO**

- Agitador magnético, SCHOTT IBERICA Mod. SBS A-01
- Balanza de precisión, SAUTER Mod. SD 1000T
- Bañomaría, HAAKE Mod. W13
- Cámara de T.V., JAVELIN Mod. J.E. 5520
- Centrífuga, HERAEUS SEPATECH Mod. 2AT
- Cronómetro digital

- Espectrofotómetro, BAUSCH & LOMB Mod. "Spectronic 20"
- Estereomicroscopio, CARL ZEISS Mod. Citoval 2
- Estufa de CO<sub>2</sub>, NAPCO Mod. 6100
- Estufa de 37°C, BINDER Mod. WTB
- Filtros de acetato de celulosa de 2 µm, GELMAN
- Microscopio óptico, LEITZ Mod. Ortholux (conectado a un circuito cerrado de TV.)
- Microscopio óptico y de contraste de fases, CARL ZEISS Mod. Standar
- Microscopio de fluorescencia, NIKON Mod. Optiphot-2
- Agitador, IKA Mod. MS1
- Monitor de T.V., SONY Mod. PVM-122 CE.
- Osmómetro, ADVANCED Mod. 3 MO.
- pHmetro, CRISON Mod. Micro/ph 2001.
- Pipeta automática BIOHIT de 5ml graduable de 50 µl
- Pipeta automática BIOHIT de 1000 µl graduable de 5µl
- Pipeta automática EPENDORF de 1000 µl graduable de 1µl
- Pipeta automática FINNPIPETTE DIGITAL de 200 µl graduable de 1µl
- Placa calefactora, MINITÜB Mod. HT 400
- Placas de 4 pocillos, NUCLON Mod.
- Placas petri de 35x10 mm. de diámetro, INTERMED
- Sistema de purificación de agua, MILLIPORE Mod. Milli RO
- Sistema de ultrapurificación de agua, MILLIPORE Mod. Milli-Q Plus 185
- Material fungible de laboratorio: pipetas pasteur de 145 mm, vasos de precipitado, probetas, matraces aforados, termómetros, portaobjetos con y sin visel, cubreobjetos de 18x18 mm y 24x40 mm, viales, papel de parafilm, ...

### **3.1.5. MATERIAL QUIMICO**

#### **3.1.5.1. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN**

##### **(Refrigeración y Congelación)**

- Acido Cítrico, MERCK 244
- Alcohol de polivinilo, SIGMA P-8136
- BES (Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), SIGMA B-9879
- Fructosa D(+), MERCK 5323
- Glicerol (d 1;26), RHÔNE-POULENC 24387.29
- Hidroxido potásico (KOH), PANREAC 17722
- Penicilina-G sódica, SIGMA P-3032
- Sulfato de dihidroestreptomina, SIGMA S-9137
- TRIS (N-Tris(hidroximetil) aminometano), SIGMA T-1378

#### **3.1.5.2. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TRIPLE TINCIÓN**

- Acido cacodílico, SIGMA C-0250
- Azul Tripán, MERCK 11732
- Etanol 96%, PANREAC 141085
- Glutaraldehido al 25%, SERVA 23114
- Marrón Bismark, SIGMA B-5263
- Rosa Bengala, SIGMA R-3877
- Trizma base, SIGMA T-1503

### **3.1.5.3. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA R.A.**

- Calcio ionóforo A-23187, SIGMA C-7522
- Dimetil Sulfoxido (DMSO), SIGMA D-2650

### **3.1.5.4. REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TINCIÓN VITAL**

- Bromuro de etidio, SIGMA E-8751
- Naranja de acridina, SIGMA A-6014

### **3.1.5.5. REACTIVOS UTILIZADOS EN EL SISTEMA F.I.V.**

- BSA fracción V, SIGMA A-9647
- $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , MERCK 5833
- $\text{ClCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , MERCK 2382
- ClK, MERCK 4936
- $\text{CO}_3\text{HNa}$ , MERCK 6329
- Glucosa anhidra, MERCK 8337
- Hialuronidasa, SIGMA H-3506
- $\text{HPO}_4\text{Na}$ , MERCK 6586
- Lactato Cálcico  $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , MERCK 102102
- Lactato de Sodio, SIGMA L-4263
- NaCl, PANREAC 141659
- Piruvato sódico, MERCK 6619
- $\text{PO}_4\text{KH}_2$ , MERCK 4873
- Rojo fenol, SIGMA P-5530
- $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , MERCK 5886

- Sulfato de dihidroestreptomicina, SIGMA S-9137
- Tripsina, DIFCO 0152-15-9

### **3.1.5.6. OTROS REACTIVOS**

- Ácido clorhídrico, PANREAC 131019
- Agua purificada mediante ósmosis inversa
- Citrato sódico · 2H<sub>2</sub>O, MERCK nº 6448
- Glutaraldehído al 25%, MERCK 4239
- Hidróxido sódico, MERCK 6498
- Parafina, SIGMA 400-5
- Permout, Fisher Scientific, SP15-500

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. OBTENCIÓN Y CONTRASTACIÓN SEMINAL**

Se seleccionaron 5 machos cabríos a partir de un total de 10 animales, transcurrido un periodo de entrenamiento de 3 meses, en base a la libido y características seminales (volumen eyaculado, movilidad masal, movilidad individual, concentración espermática, test de endósmosis positiva, morfoanomalías y normalidad acrosómica).

El semen fue obtenido mediante vagina artificial (**Evans y Maxwell, 1989**) utilizando una hembra ovariectomizada como estímulo sexual. Los animales fueron sometidos a un régimen sexual de dos recogidas semanales, obteniéndose un sólo eyaculado en cada sesión.

Tras la recogida de los diferentes eyaculados, se procedió al traslado de los mismos al laboratorio mediante una caja de transporte, manteniendo el semen en todo momento en condiciones isotermas  $+36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , determinándose de manera rutinaria: volumen eyaculado, movilidad masal, movilidad individual, calidad de movimiento y concentración espermática.

**Volumen y Aspecto físico:** se evaluó visualmente en el mismo tubo colector graduado donde fue recogido, expresándose en ml. Junto a este parámetro se observaron posibles irregularidades en cuanto al color, olor o aspecto que pudiera presentar algún eyaculado, procediéndose a su eliminación.

**Movilidad masal (MM):** se valoró la formación y progresión de ondas producidas por la masa espermática en movimiento en una escala de 0 a 5 (**Maxwell y Evans, 1990**). Las ondas fueron observadas mediante microscopio óptico (10x) conectado a un circuito cerrado de T.V. al colocar una gota de semen fresco sin diluir en un portaobjetos atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$  (**Derivaux, 1982**).

**Movilidad individual (MI):** se estimó el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100) y la calidad del mismo (C.M.) (de 0 a 5) (**Maxwell y Evans, 1990**). Se observó en una muestra de semen diluido en citrato sódico isoosmótico, entre portaobjetos y cubreobjetos previamente atemperados a  $37^{\circ}\text{C}$ , mediante microscopio óptico conectado a un circuito cerrado de T.V. (10x). El valor de la MI se expresa en porcentaje.

**Concentración espermática:** se determinó mediante valoración espectrofotométrica (**Sorensen, 1982**). Se diluyen 0,05 ml de semen en 20 ml de citrato sódico isoosmótico (1/400), midiendo el porcentaje de transmitancia de la dilución del semen frente al citrato sódico a una longitud de onda de 540 nm. La concentración seminal se obtiene a partir de una tabla de conversión, asignando a cada valor de



transmitancia un valor de concentración calculado previamente mediante un contador de partículas "Coulter Counter". La concentración se expresa en miles de millones de espermatozoides por ml de eyaculado.

De manera periódica se realizaron otras mediciones de la calidad seminal de los machos cabríos seleccionados: morfoanomalías espermáticas, test de endósmosis positiva (E+) y normalidad acrosómica (NAR).

La estimación del porcentaje de espermatozoides que presentan algún tipo de **morfoanomalías** se realizó mediante la inclusión de una muestra espermática en glutaraldehído al 2% en BL-1, procediéndose al recuento de 100 espermatozoides mediante microscopio óptico (40x).

Los protocolos del test de permeabilidad de membrana y de normalidad acrosómica serán explicados en los apartados 3.2.5.4. y 3.2.5.3. respectivamente.

Finalizada la contrastación seminal, se procedió a la eliminación de todos aquellos eyaculados que no cumpliesen los siguientes requisitos:

Volumen  $\geq 0,4$  ml

M.M.  $\geq 4$

M.I.  $\geq 75$  % de espz móviles con C.M.  $\geq 4$

Concentración espermática  $\geq 3.000 \times 10^6$  espz/ml

Formas espermáticas normales  $\geq 85$  %

NAR  $\geq \%75$

Con el fin de evitar la acción del factor "estación" y "fotoperíodo" sobre las características seminales del macho cabrío, se procedió a la recogida de datos sobre la

capacitación en semen fresco y refrigerado durante los meses de septiembre a diciembre, alternándose una y otra experiencia. La congelación de las diferentes dosis seminales se realizó también en este mismo período, siendo el estudio del efecto ejercido por los procesos de congelación-descongelación sobre la capacitación espermática realizado durante los meses de febrero a mayo.

### **3.2.2. CAPACITACIÓN DEL SEMEN FRESCO**

#### **3.2.2.1. MEDIO DE LAVADO. PBS-Dm**

El PBS de Dulbecco modificado (PBS-Dm) (Tabla 7) ha sido empleado en el lavado espermático previo a la incubación con BWW, y en la manipulación de los ovocitos tras la descongelación.

**Tabla 7.- Composición química del PBS-Dm.**

NaCl	136,89	mM
KCl	2,68	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,10	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,46	mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,88	mM
Na Piruvato	0,32	mM
Glucosa	5,55	mM
Rojo Fenol	0,01	mM
Penicilina G Sódica	0,06	g/l
Sulfato de dihidroestreptomicina	0,05	g/l
BSA (Fracción V)	3,00	g/l

El PBS-Dm (en adelante PBS) se esterilizó con filtros de membrana, con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , en cámara de flujo laminar. Los envases se almacenaron en una nevera a  $+5^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo inferior a los 45 días. Previo a su utilización los medios se llevaron a  $+37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2.2. MEDIO DE CULTIVO. BWV

Se utilizó el medio de Biggers, Whitten y Whittingham (BWV) suplementado con 0,3 % de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V (**Tabla 8**) en la recuperación de los espermatozoides móviles mediante "swim-up", preincubación espermática y co-cultivo de gametos (**Biggers, Whitten y Whittingham, 1971**).

**Tabla 8.-** Composición química del medio BWV

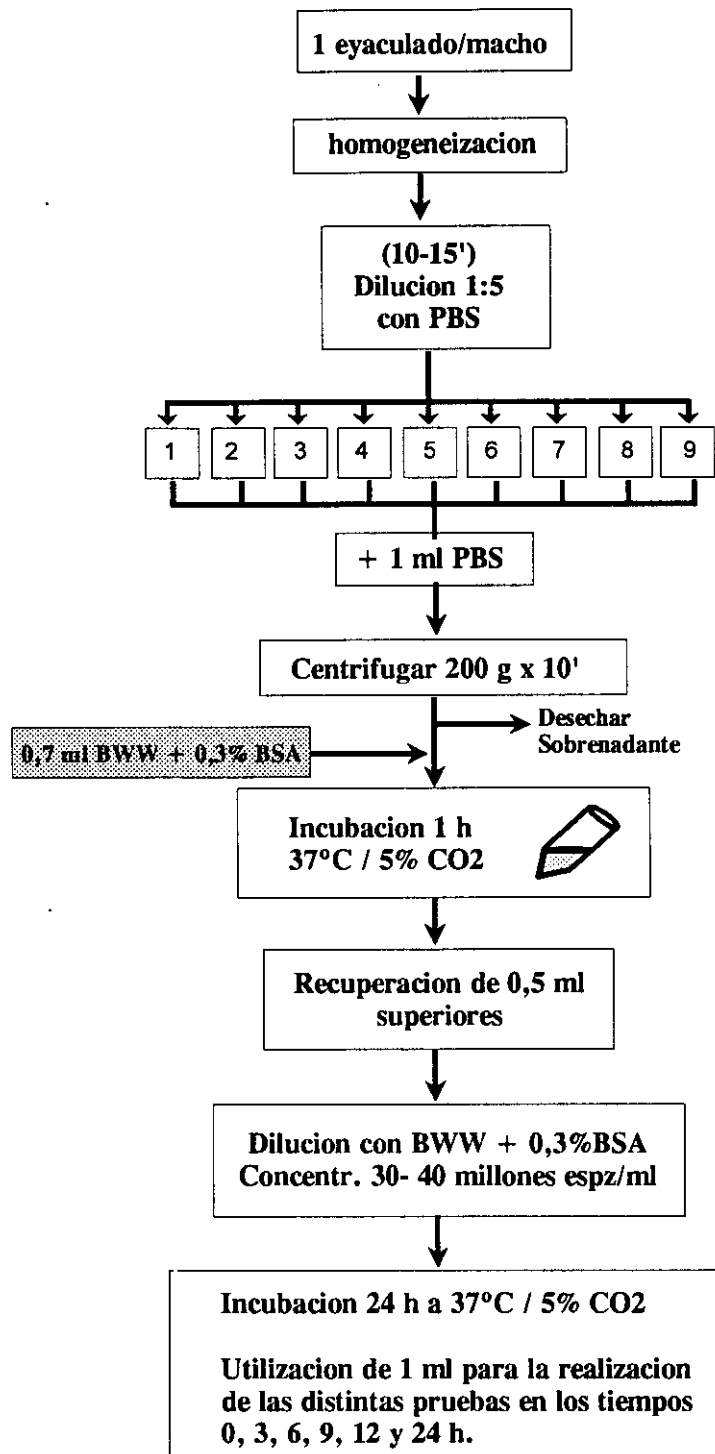
NaCl	94,59	mM
KCl	4,78	mM
Lactato de $\text{Ca}5\text{H}_2\text{O}$	1,71	mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,19	mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,19	mM
$\text{NaHCO}_3$	25,07	mM
Piruvato de Na	0,25	mM
Lactato de Na	21,58	mM
Glucosa	5,56	mM
BSA (Fracción V)	3,00	g/l
Penicilina G Sódica	0,06	g/l
Sulfato de dihidroestreptomina	0,05	g/l

El BWW se esterilizó mediante su paso a través de filtros de membrana, con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , en una cámara de flujo laminar. Los envases se almacenaron en una nevera a  $+5^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo inferior a los 45 días. Previo a su utilización, el BWW pasa a una estufa (5%  $\text{CO}_2$ ) durante 2 horas para que se equilibre, estabilizando la temperatura y pH a 7,4.

### 3.2.2.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN FRESCO

Tras la obtención de 5 eyaculados (1 eyaculado/macho) se procedió a la mezcla y homogeneización de los mismos para eliminar el factor individual, realizándose con el total una dilución 1/5 en PBS a los 10-15 minutos de su recogida. El volumen final fue dividido en 9 replicas, procediéndose a la recuperación de los espermatozoides móviles mediante "swi-up". Se añadió 1 ml de PBS a cada alícuota, centrifugándose a continuación a 200 g durante 10 minutos. Tras la separación del sobrenadante se añadieron 0,7 ml de BWW suplementado con 0,3 % de BSA con cuidado de no remover el sedimento. Se incubó en una estufa a  $+37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora, transcurrida la cuál, se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3 % de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (**Esquema 1**).

Se tomaron como referencia del estado de capacitación el porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas de incubación. Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 42 eyaculados, siendo utilizados por término medio 4-5 eyaculados por experiencia.



Esquema 1.- Tratamiento seguido en la capacitacion del semen fresco.

### 3.2.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

#### 3.2.3.1. DILUYENTES DE REFRIGERACIÓN

Para la determinación del efecto de la refrigeración y congelación sobre la fisiología del espermatozoide caprino fueron utilizados dos diluyentes: a) Tris-Fructosa-Cítrico (TFC) seleccionado a través de la bibliografía por su amplia difusión como medio de conservación de semen en diversas especies, existiendo multitud de variaciones. La composición química del TFC utilizada por nosotros se refleja en la **Tabla 9**; y b) BesKOH, desarrollado en este Área de Reproducción Animal para semen caprino (**Dunner, 1991**) (**Tabla 10**).

**Tabla 9.-** Composición química del TFC .

<u>Diluyente 1.</u>	
Tris	2,00 g
Fructosa	2,50 g
Ácido Cítrico	0,90 g
Penicilina G Sódica	500.000 UI
Sulfato de dihidroestreptomicina	625 mg/l
Agua purificada	100 ml
<u>Diluyente 2.</u>	
Diluyente 1	100 ml
Glicerol	4,00 ml
Yema de Huevo	5,00 ml
pH	7,2
P.O.	320 mOsm/kg

Tabla 10.- Composición química del BesKOH

<b>Bes</b>	340 mM	<b>KOH</b>	350 mM
pH	4,1	pH	13,15
P.O.	320 mOsm/kg	P.O.	686 mOsm/kg
<b>BesKOH</b>			
<u>Diluyente 1.</u>			
Solución Acuosa de Bes (320 mOsm/kg)		72 ml	
Solución Acuosa de KOH (686 mOsm/Kg)		28 ml	
Penicilina G Sódica		500.000 UI	
Sulfato de dihidroestreptomicina		625 mg/l	
<u>Diluyente2.</u>			
Diluyente 1		100,00 ml	
Glicerol		4,00 ml	
Yema de Huevo		5,00 ml	
pH		7,2	
P.O.		340 mOsm/kg	

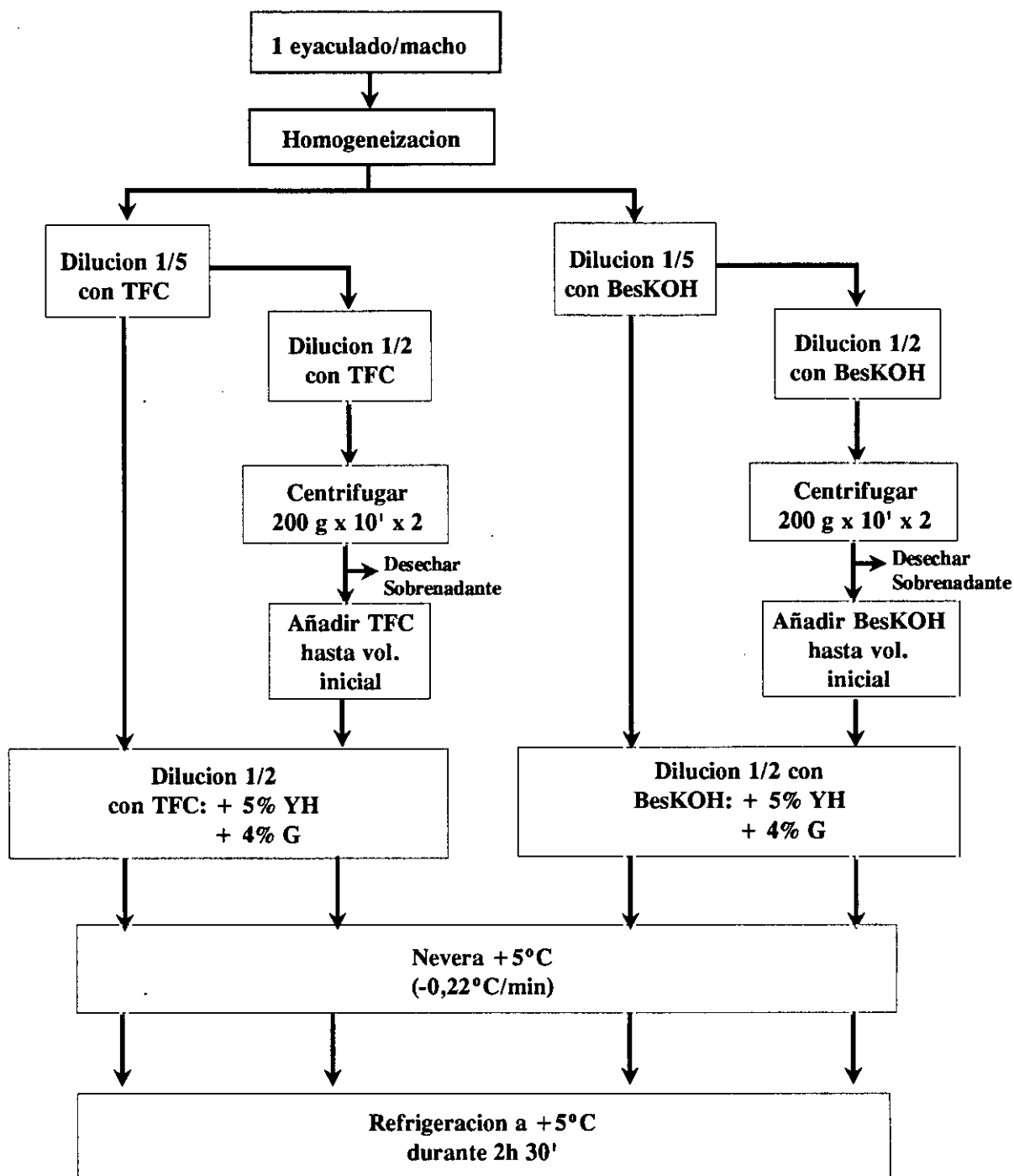
Los diluyentes para la conservación y criopreservación del semen caprino se utilizan de forma seriada: Diluyente 1 (solución acuosa base): empleado para el lavado seminal y primera dilución (a los 10 minutos); y Diluyente 2 (solución acuosa base con crioprotectores): es el diluyente base al cuál se le ha complementado con crioprotectores, 4% de glicerol y 5% de yema de huevo. Previa adición del glicerol, se realiza una centrifugación del diluyente con el 5% de yema de huevo a 500 g durante 30 minutos.

### 3.2.3.2. REFRIGERACIÓN DEL SEMEN CAPRINO

Una vez obtenidos 5 eyaculados (1 Eyaculado/macho) y tras una primera valoración seminal se procedió a la mezcla, homogeneización y posterior separación en dos alícuotas. A los 10-15 minutos, cada muestra fue diluida 1/5: una con TFC y la otra con BesKOH (sin yema de huevo ni glicerol). Se separó la mitad del volumen final de cada una, obteniéndose un total de 4 muestras. Una alícuota de cada medio se rediluyó 1/2 con el mismo suplementado con 5% de yema de huevo y 4% de glicerol, dividiendo a su vez en 5 alícuotas y pasando seguidamente a una nevera de +5°C (B y T). Las dos muestras restantes fueron divididos en 5 muestras, a las que se les añadió 0,5 ml de su respectivo medio sin huevo ni glicerol, procediéndose a una doble centrifugación a 200 g durante 10 minutos. Se rediluyó el sedimento hasta su volumen inicial con el diluyente anteriormente utilizado, y se procedió a una dilución 1/2 con su respectivo medio suplementado con 5% de yema de huevo y 4% glicerol. (BC y TC).

Todas las muestras así obtenidas fueron llevadas a la nevera de +5°C (**Esquema 2**). El período de refrigeración se fijó en 2 horas 30 minutos, estimando el tiempo medio requerido por el inseminador desde su salida del centro hasta el momento de la inseminación en las explotaciones más lejanas.





Esquema 2.- Refrigeración del semen de macho cabrio.

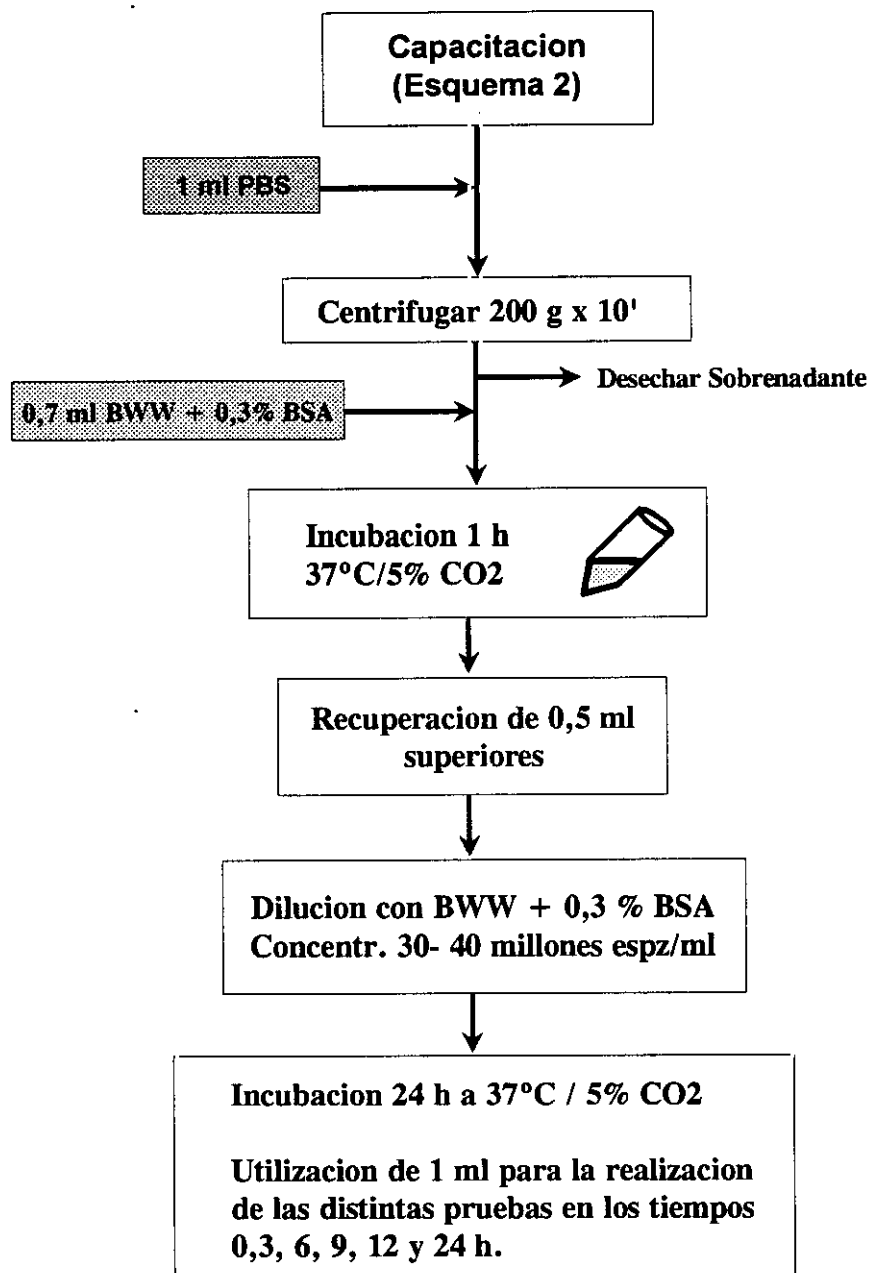
### 3.2.3.3. CAPACITACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

Transcurridas 2 horas y 30 minutos de permanencia en la nevera a +5°C (tiempo medio estimado entre la recogida en un centro de inseminación y su aplicación a un rebaño de hembras) todas las alícuotas son centrifugadas a 200 g durante 10 minutos tras la adición de 1 ml de PBS.

Una vez separado del sobrenadante se añadieron 0,7 ml de BWW + 0,3% de BSA y se incubó durante 1 hora en una estufa 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3% de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (**Esquema 3**).

Como referencia del estado de capacitación se observaron el porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación.

Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 56 eyaculados, siendo empleados por término medio 4-5 eyaculados por día de experiencia.



**Esquema 3.-** Tratamiento seguido para la capacitacion del semen caprino refrigerado durante 2 h. 30' a +5°.

### **3.2.4. CAPACITACIÓN DEL SEMEN CONGELADO**

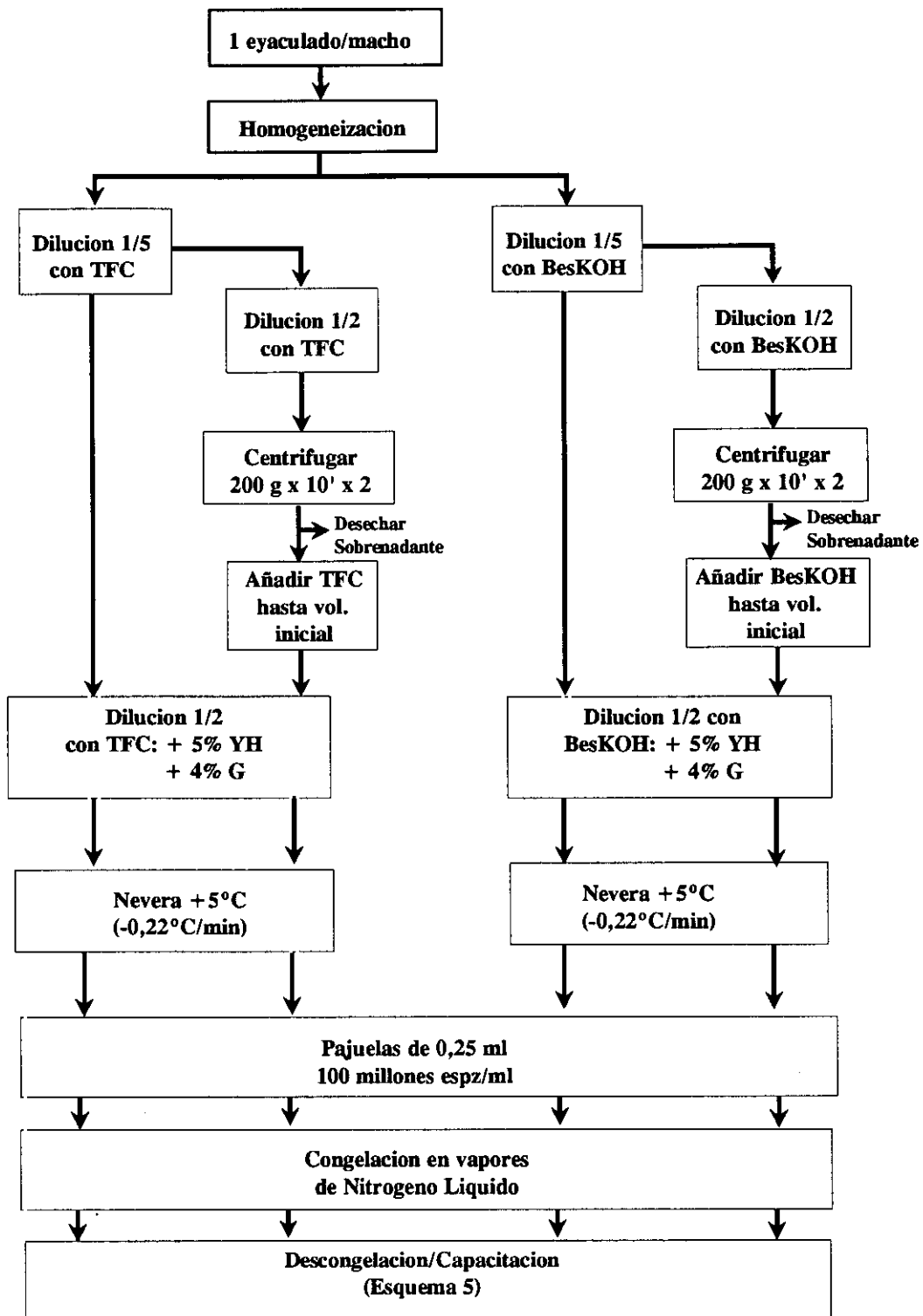
#### **3.2.4.1. DILUYENTES DE CONGELACION**

Los diluyentes de congelación aparecen reflejados en las **Tablas 9 y 10**.

#### **3.2.4.2. CONGELACIÓN DEL SEMEN CAPRINO**

Tras la obtención, homogeneización y valoración seminal se procedió a la separación del volumen final en 2 alícuotas. Cada una de ellas fue diluida 1/5 a los 10-15 minutos de su recogida con TFC y BesKOH (sin yema de huevo ni glicerol). Ambas muestras se dividieron en dos; una alícuota de cada medio se rediluyó 1/2 con el mismo suplementado con 5% de yema de huevo y 4% de glicerol pasando seguidamente a una nevera de +5°C (B y T). Las otras dos alícuotas fueron diluidas 1/2 con su respectivo medio (sin huevo ni glicerol), procediéndose a una doble centrifugación a 200 g durante 10 minutos. Se rediluyó el sedimento hasta su volumen inicial (previo a la segunda dilución) con el diluyente anteriormente utilizado, y se procedió a una dilución 1/2 con su respectivo medio suplementado con 5% de yema de huevo y 4% glicerol. (BC y TC). Todas las muestras así obtenidas fueron llevadas a la nevera de +5°C. Todas las alícuotas obtenidas se refrigeraron hasta alcanzar una temperatura de +5°C (velocidad de enfriamiento de -0,22°C/min.). En ese momento se procede al envasado en pajuelas de 0,25 ml y a su sellado con alcohol de polivinilo, siendo la concentración espermática media de cada pajuela de 100 millones espz. Las pajuelas son depositadas sobre un soporte horizontal, permaneciendo a +5°C durante 20-30 minutos.

Transcurrido este tiempo se procedió a su congelación en el tanque criogénico. Se congeló en vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos a una distancia de 5 cm del nivel del N<sub>2</sub>L. Las pajuelas fueron posteriormente almacenadas en tanques de N<sub>2</sub>L hasta el momento de su utilización (**Esquema 4**).



Esquema 4.- Diseño experimental para la congelacion del semen caprino

### **3.2.4.3. DESCONGELACIÓN DE DOSIS SEMINALES**

Las pajuelas fueron descongeladas utilizando un bañomaria a +60 °C durante 8 segundos (velocidad de descongelación: +1.500 °C/min). Se procedió a la contrastación inicial de las pajuelas tras 15-20 minutos a fin de permitir su equilibración. Aquellas dosis con un porcentaje de espermatozoides móviles inferior al 40 % fueron rechazadas.

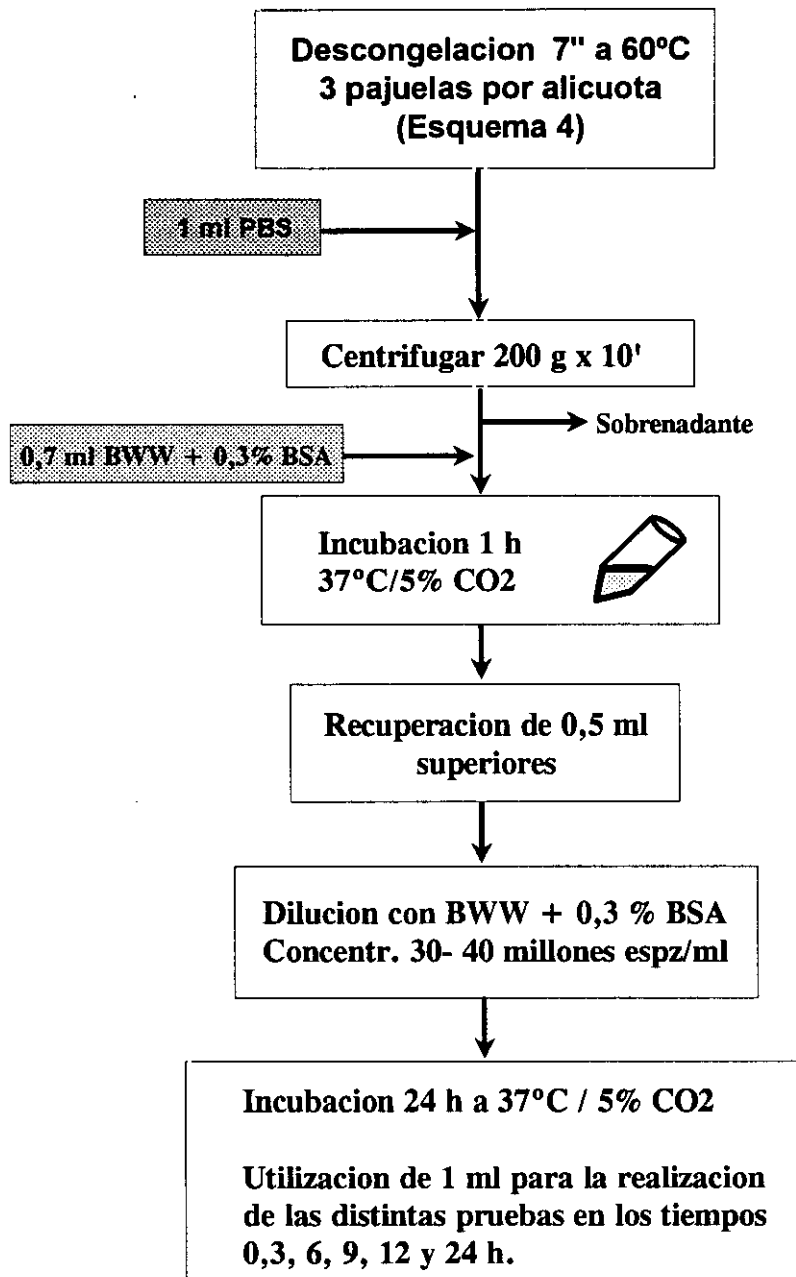
Cada alícuota está formada por el contenido de 3 pajuelas de 0,25 ml.

### **3.2.4.4. CAPACITACIÓN DEL SEMEN CONGELADO**

Tras la descongelación de las pajuelas, todas las alícuotas son adicionadas con 1 ml de PBS procediéndose a continuación a su centrifugación a 200 g durante 10 minutos, decantando el sobrenadante y añadiendo 0,7 ml de BWW + 0,3% de BSA al sedimento. Se incubó durante 1 hora en una estufa 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> transcurrido el cuál, se recuperaron los 0,5 ml superiores de cada alícuota y se procedió a su dilución con BWW + 0,3% de BSA hasta una concentración final aproximada de 30-40 millones de espermatozoides/ml, "tiempo 0" (**Esquema 5**).

Como referencia del estado de capacitación se reseñaron: porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides vivos, normalidad acrosómica, porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos con acrosoma y muertos sin acrosoma a las 0, 3, 6, 9 y 24 horas de incubación (**Esquema 5**).

Para la realización de este experimento fueron utilizados un total de 38 eyaculados, siendo utilizados 4-5 eyaculados por día de experiencia.



**Esquema 5.-** Tratamiento seguido en la capacitacion del semen caprino congelado para cada una de las series segun esquema 4.

### 3.2.5. CONTRASTACIÓN DEL SEMEN CAPACITADO

#### 3.2.5.1. MOVILIDAD INDIVIDUAL (MI)

##### 3.2.5.1.1. Solución acuosa de citrato sódico isoosmótico

La solución isoosmótica empleada en la determinación de la concentración espermática y valoración de la movilidad individual fue una solución de citrato sódico, siendo ajustada su presión osmótica a  $320 \pm 3$  mOsm/Kg mediante un osmómetro (Tabla 11).

**Tabla 11.-** Composición química de la solución de citrato isoosmótico.

Citrato Trisódico $\cdot 2H_2O$	34,6	g
Agua purificada	1000	ml
P.O. $320 \pm 3$ mOsm/kg		

##### 3.2.5.1.2. Protocolo

La MI fue expresada en porcentaje de espermatozoides móviles (0-100%) (E.M.) a la vez que se valoraba la calidad del movimiento desarrollado por los espermatozoides (C.M.) siguiendo la escala propuesta por Maxwell y Evans (1990), siendo el valor 0 correspondiente de acinesis total y el 5 a un movimiento progresivo rápido y lineal.

La determinación de estos parámetros se realizó en una gota de  $3 \mu\text{l}$  de semen diluido en citrato isoosmótico, entre porta y cubreobjetos atemperados a  $+37^\circ\text{C}$ , observándose en un microscopio óptico en campo claro conectado a un circuito cerrado de T.V. con un objetivo de 10x.



### 3.2.5.2. INDICE DE VITALIDAD

#### 3.2.5.2.1. Solución de trabajo de Naranja de acridina

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos se utilizó la tinción vital de Naranja de Acridina (Ichimura et al., 1971; Stockert et al., 1991; Hoshi et al., 1996). El tipo de fluorescencia emitida por el naranja de acridina depende de la existencia de enlaces tioles/disulfuros presentes en las protaminas nucleares que se asocian al ADN (Kosoxer et al., 1992). Dicho fluorocromo se intercala en la doble hélice de ADN (asociada a protaminas ricas en enlaces disulfuros) como monómero, generando una fluorescencia que oscila del verde al amarillo. Tras la desnaturalización de la doble hélice (asociada a protaminas ricas en enlaces tioles), el naranja de acridina se une formando agregados, generando una fluorescencia que varía del naranja al rojo.

La solución patrón (Tabla 12) de Naranja de acridina (Tejada, 1984) fue repartida en alícuotas de 1 ml y almacenada a -20°C, siendo llevada a temperatura ambiente en el momento de la realización de la solución de trabajo. La solución patrón fue diluida 1/100 en PBS sin rojo Fenol ni BSA, siendo esta solución de trabajo envasada en cristal topacio a +5°C durante un máximo de 30 días.

**Tabla 12.-** Composición química de la solución patrón y de trabajo para la tinción vital (Naranja de acridina).

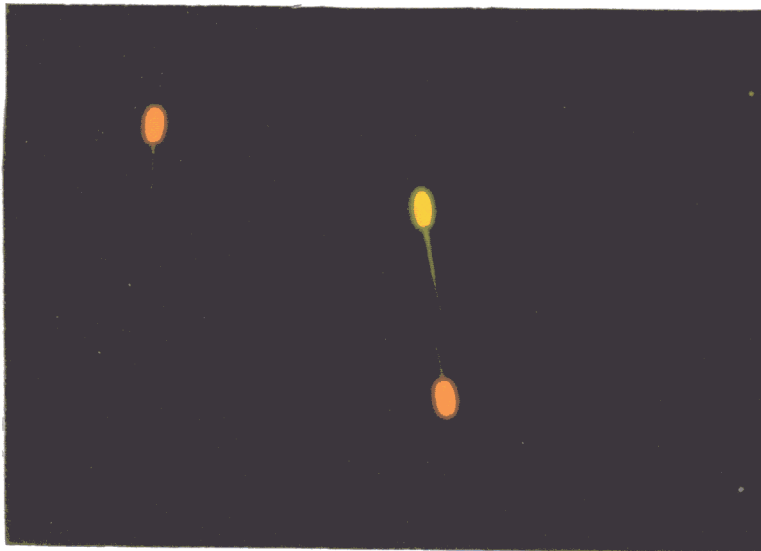
Solución Patrón	Naranja de Acridina	15	mg
	Etanol	1	ml
	Agua purificada	50	ml
Solución de trabajo	Solución Patrón	1	ml
	PBS (sin BSA ni Rojo F.)	100	ml

### 3.2.5.2.2. Protocolo

Se tomaron 200  $\mu$ l de cada alícuota de semen y se incluyeron en 200  $\mu$ l de solución de trabajo, procediéndose inmediatamente al recuento de 200 espermatozoides en un microscopio de fluorescencia con un filtro B-2A a 40x. El tiempo de observación por campo fue inferior a los 30 segundos. Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías en base a la fluorescencia emitida (**Lámina 1**):

- \* verde- amarillo, espermatozoides con ADN intacto, "vivos".
- \* naranja-rojizo, espermatozoides con ADN desnaturalizado, "muertos".

Los espermatozoides que muestran una doble coloración (verde y rojo) en la cabeza son contabilizados como espermatozoides con ADN desnaturalizado.



**Lámina 1.-** Tinción vital: Naranja de Acridina. El color verde es indicativo de ADN intacto, mientras que el rojo lo es de ADN desnaturalizado.

### 3.2.5.3. ESTATUS ACROSOMAL

#### 3.2.5.3.1. Glutaraldehído al 2% en BL-1

Para la realización de la solución de trabajo se mezclaron 8 ml de Glutaraldehído al 25% con 92 ml de solución BL-1 (Tabla 13).

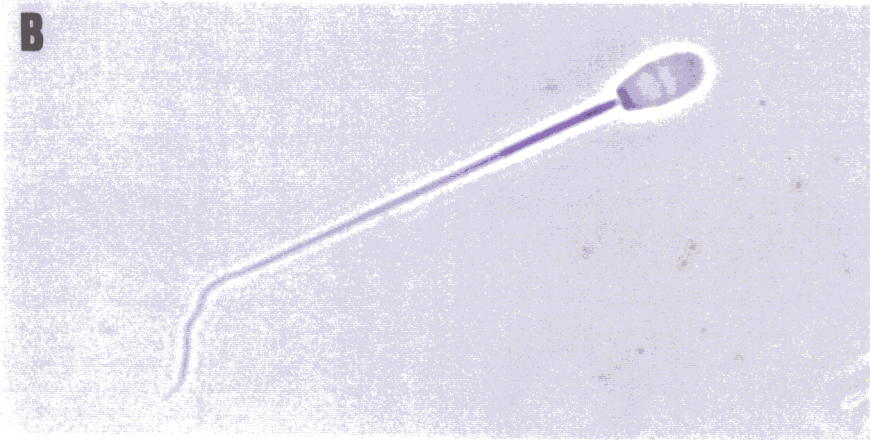
**Tabla 13.-** Composición química del BL-1 (Pursel y Jonhson, 1974).

Glucosa monohidratada	2,9	g
Citrato Trisódico ·2H <sub>2</sub> O	1,0	g
Bicarbonato Sódico	0,2	g
Agua Purificada	100,0	ml

#### 3.2.5.3.2. Protocolo

El estado del acrosoma se determinó tras la inclusión de 200 µl de las diferentes muestras en 200 µl de glutaraldehído al 2% en BL-1 (Vázquez et al., 1984 a), examinándose posteriormente un total de 200 espermatozoides por medio de un microscopio de contraste de fases a 40x. Los espermatozoides fueron clasificados atendiendo a su integridad acrosómica (Lámina 2):

- \* espermatozoides con acrosoma intacto ("normalidad acrosómica", NAR)
- \* espermatozoides con acrosoma degenerado o perdido.



**Lámina 2.-** Determinación del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal mediante microscopía de contraste de fases (100x). **A)** Espermatozoide con acrosoma; **B)** Espermatozoide sin acrosoma.

### 3.2.5.4. TEST DE PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

#### 3.2.5.4.1. Solución hipoosmótica

Se utilizó una solución hipoosmótica de citrato sódico (100 mOsm/Kg) (Tabla 14) para la determinación del porcentaje de endósmosis. La solución empleada fue almacenada a +5°C durante un período no superior a los 30 días.

**Tabla 14.-** Composición química de la solución de endósmosis.

Citrato Trisódico ·2H <sub>2</sub> O	1	g
Agua purificada	100	ml
P.O.: 100 ± 3 mOsm/Kg		

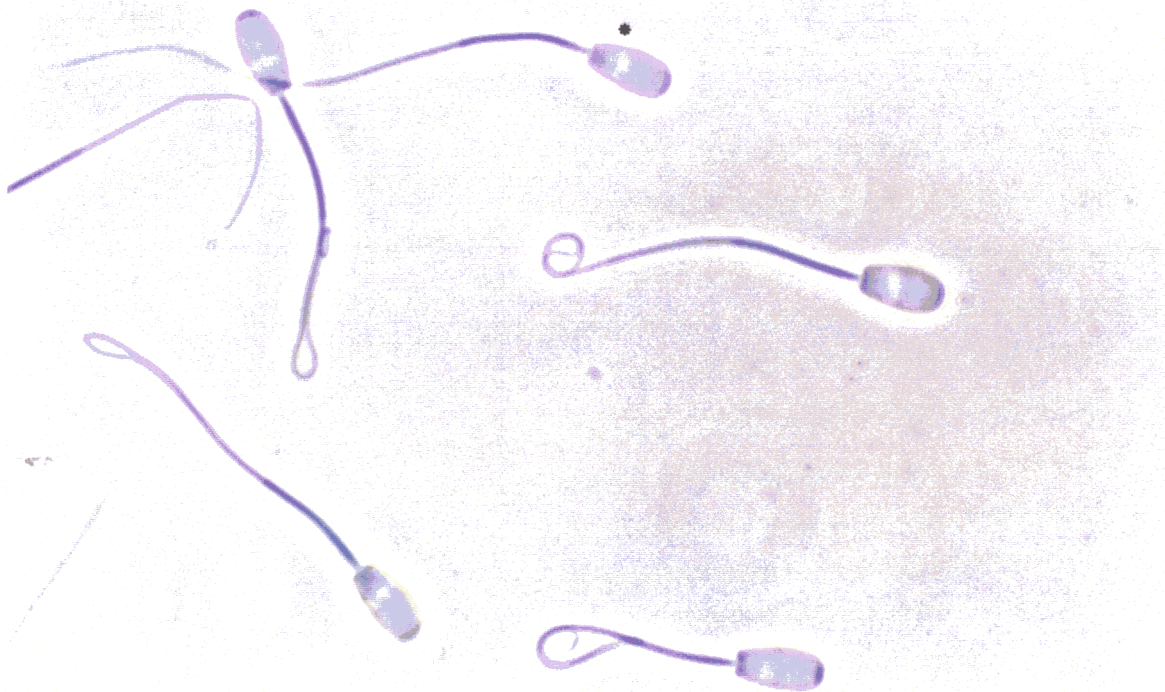
#### 3.2.5.4.2. Protocolo

La determinación de la integridad de la membrana plasmática consiste en someter al espermatozoide a una solución hipoosmótica, provocando el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior de la célula espermática para lograr el equilibrio osmótico. La prueba de endósmosis varía en cuanto a la P.O. de la solución y tiempo de exposición de los espermatozoides a la misma, dependiendo de la especie utilizada: verraco y morueco (Vázquez, 1980), humano (Jeyendran, 1984), conejo (Gafó, 1992) y caprino (Cortés, 1994).

Se mezclaron 200 µl de cada alícuota con 200 µl de la solución hipoosmótica de 100 mOsm/kg durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron

mediante la inclusión de las mismas en glutaraldehído al 2% en BL-1. Se observó el porcentaje de espermatozoides con torsión de la cola parcial (endósmosis parcial:  $E^+_p$ ) y total (endósmosis total:  $E^+_t$ ), así como los que no sufrieron ningún cambio morfológico a nivel del flagelo espermático.

Se contabilizaron un total de 200 espermatozoides por muestra mediante la utilización de un microscopio de contraste de fases a 40x, expresando el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva total + parcial ( $E^+$ ) (**Lámina 3**).



**Lámina 3.-** Determinación del porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva mediante microscopía de contraste de fases (100x). Espermatozoide con endósmosis negativa (\*); Espermatozoides en distintos grado de endósmosis (Sin marca).

### 3.2.5.5. TRIPLE TINCIÓN

#### 3.2.5.5.1. Colorantes empleados en la triple tinción

El pH de todos los colorantes utilizados en esta tinción es ajustado mediante la utilización de HCl(1N) y/o NaOH (1N). El Tripan Azul se ha de preparar el mismo día de su utilización. El resto de los colorantes son almacenados a +5°C en una nevera por un tiempo no superior a los 15 días. La **Tabla 15** refleja la composición química de todos los colorantes empleados en la técnica descrita por **Talbot y Chacon (1981)** y adaptada por **Garde (1992)** a semen ovino.

**Tabla 15.-** Composición química de los colorantes empleados en la Triple Tinción.

TRIPAN AZUL	Tripan Azul	0,1 g
	BWW (sin BSA)	10,0 ml
CACODILATO	Glutaraldehido (25%)	12,00 ml
	Ac. Cacodilico	2,14 g
pH: 7,2	Agua Ultrapura	88,00 ml
MARRON BISMARCK	Alcohol-etílico	30,0 ml
	Marron Bismack	0,8 g
pH: 2,8	Agua Ultrapura	70,0 ml
ROSA DE BENGALA	Tris	1,2 g
	Rosa de Bengala	0,8 g
pH: 5,3	Agua Ultrapura	100,00 ml

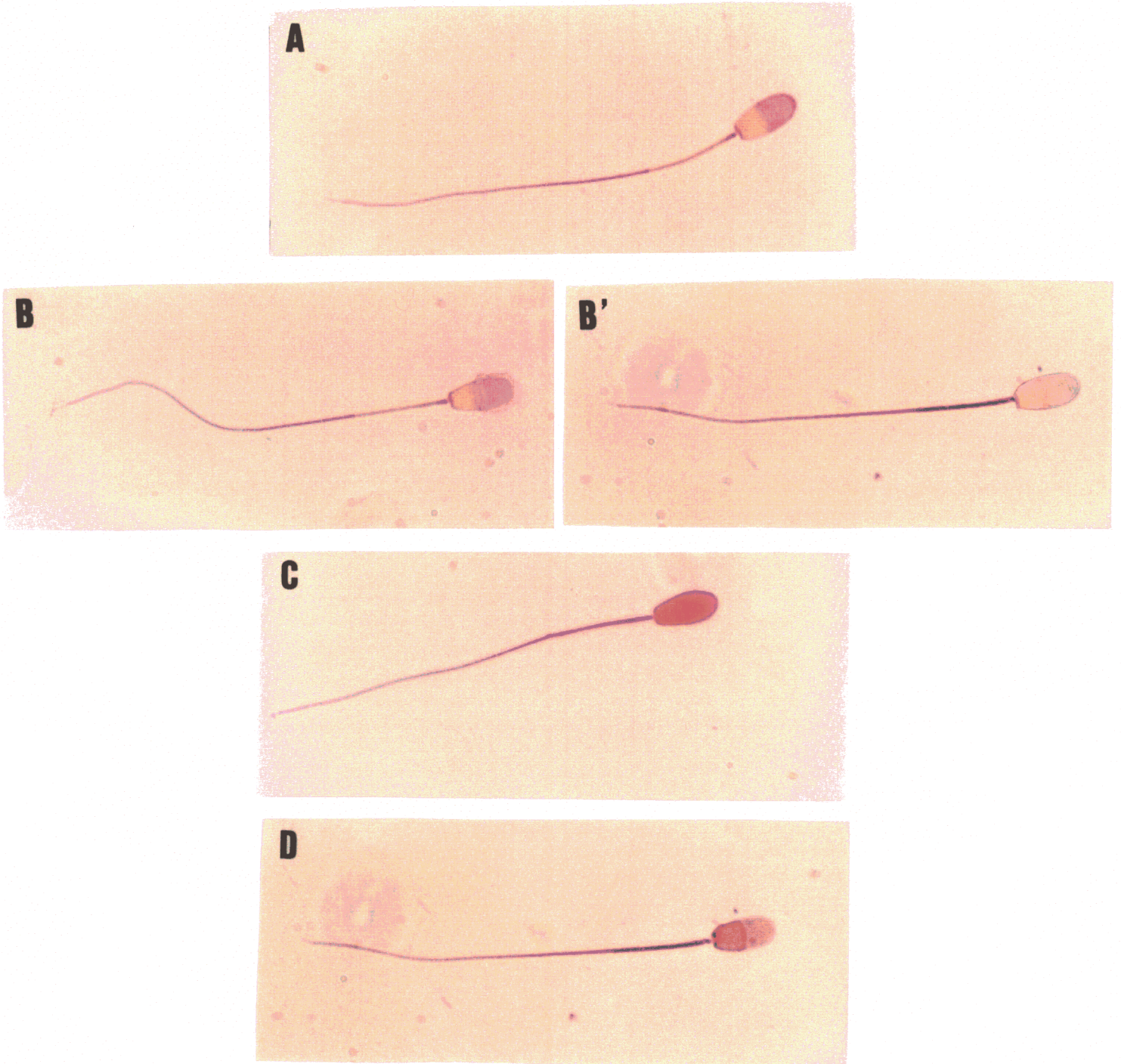
#### 3.2.5.5.2. Protocolo

Se empleó la triple tinción adaptada por **Garde y col. (1992)** a semen de morueco como técnica para la determinación de la vitalidad espermática y estatus acrosomal.

Para la realización de dicha tinción se mezclaron 200 µl de cada muestra con 200 µl de tripán azul al 1% en BWW y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Tras el periodo de incubación se realizó una extensión sobre un portaobjetos desengrasado y precalentado, dejándolo secar al aire. Una vez secas se fijan a temperatura ambiente en una solución de glutaraldehído al 3% tamponada con cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) durante 30 minutos. Los portas son lavados con agua destilada y se dejan secar al aire, siendo introducidos a continuación durante 10 minutos en una solución de marrón Bismark al 0,8% a +41°C (pH 2,8). Tras un nuevo lavado con agua destilada se dejan secar al aire para pasar a una solución de rosa de Bengala al 0,8% (pH 5,3) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a un nuevo lavado y secado de todas las preparaciones al aire para su posterior montaje en Permount. Se contabilizaron un total de 100 espermatozoides clasificándolos en cuatro categorías según su vitalidad y estatus acrosomal dependiendo de su tonalidad (**Lámina 4**):

1. Región acrosomal rosa y post-acrosomal ligeramente marrón: espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA).
2. Región acrosomal y post-acrosomal ligeramente marrón: espermatozoide vivo con acrosoma reaccionada (VR).
3. Región acrosomal rosa y post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MA).
4. Región acrosomal y post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado (MR).





**Lámina 4.-** Determinación del porcentaje de espermatozoides viables y estado acrosomal mediante la triple tinción (100x): **A)** espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA); **B)** espermatozoide vivo con acrosoma reaccionando (VR); **B')** espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado (VR); **C)** espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MA) y **D)** espermatozoide muerto sin acrosoma.

### 3.2.6. INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA

#### 3.2.6.1. $\text{Ca}^{2+}$ -IONÓFORO. SOLUCIÓN DE TRABAJO.

Se realizaron alícuotas (100  $\mu\text{l}$ ) de la solución patrón  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo (Sigma C-7522) 1 mM y solución control (DMSO) (Tabla 16), siendo congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Tras la descongelación, dichas alícuotas son diluidas 1/10 en BWW + 0,3% BSA, resultando la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo utilizada en la inducción de la reacción acrosómica de  $1\mu\text{M}$ .

**Tabla 16.-** Composición química del  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo 1 mM y solución control.

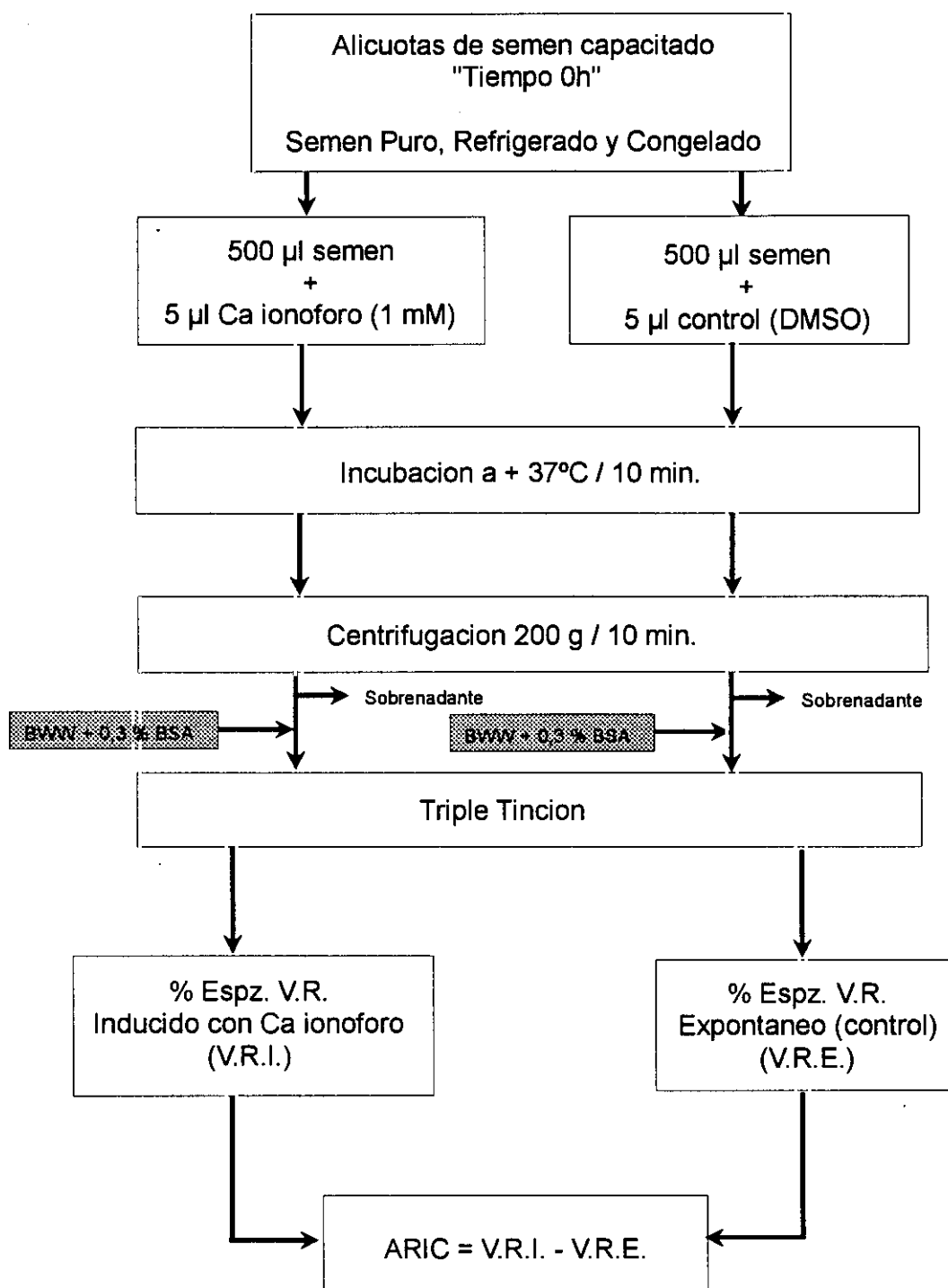
1 mM	$\text{Ca}^{2+}$ ionóforo DMSO	1,04 mg 100 $\mu\text{l}$
Control	DMSO	100 $\mu\text{l}$

#### 3.2.6.2. Protocolo

Para la determinación de la inducción de la reacción acrosómica por el calcio ionóforo se utilizó el test A.R.I.C. (Acrosome Reaction to Ionophore Challenge) (Cummins et al., 1991). Tras la capacitación de las distintas muestras (tiempo 0h) de semen heterospérmico (fresco, refrigerado y congelado) e individual, se procedió a la realización de cuatro alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  con una concentración aproximada de 30-40 millones de espz/ml.

Se adicionó 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo A23187 (1mM) (concentración final 1  $\mu\text{M}$ ) a tres alícuotas, siendo la cuarta suplementada con 5  $\mu\text{l}$  de solución control, procediéndose a continuación a la homogeneización e incubación en bañomaria a  $+37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 200 g. Se separó el sobrenadante y se añadió 100  $\mu\text{l}$  de BWW nuevo suplementado con 0,3 % BSA al sedimento (**Esquema 6**).

Se valoró la vitalidad y estatus acrosomal mediante la Triple Tinción de las distintas alícuotas. El porcentaje de espermatozoides inducidos se obtiene de la diferencia entre los V.R. obtenidos en la muestra con  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo A23187 y el control.



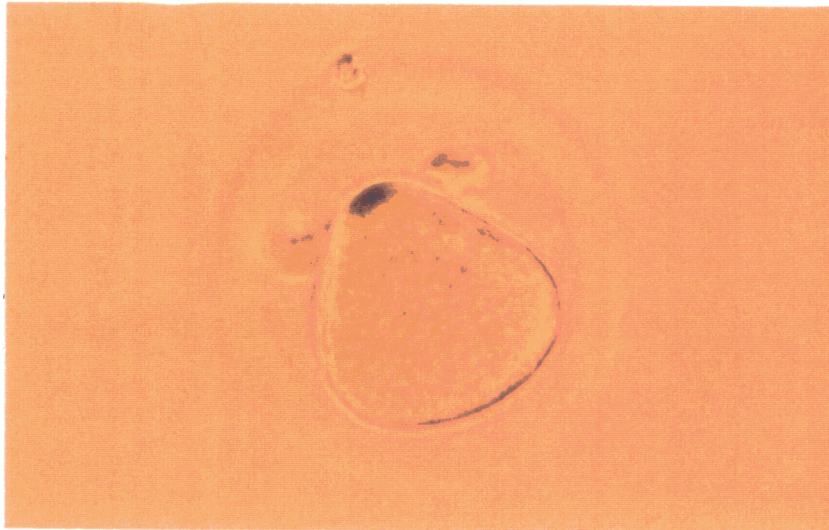
**Esquema 6.-** Diseño experimental seguido en el estudio de la reaccion acrosomica inducida y expontanea.

### **3.2.7. TEST DE HAMSTER**

Para la realización del test de hamster (T.H.) ó S.P.A. (Sperm Penetration Assay) fueron utilizados ovocitos congelados de hamster dorado obtenidos a partir de hembras superovuladas con PMSG y HCG. Los ovocitos, libres de células del cumulus, se presentan en pajuelas de 0,25 ml, realizando su descongelación aproximadamente 30 minutos antes de su utilización.

#### **3.2.7.1. DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS**

Las pajuelas pasaron de su lugar de almacenamiento, tanques criogénicos con nitrógeno líquido (-196°C), a temperatura ambiente durante 40 segundos, y seguidamente a un bañomaría a +37°C durante otros 40 segundos. Se procedió al vaciado del contenido de la pajuela en uno de los pocillos de las placas Nuck, permaneciendo a temperatura ambiente durante 15 minutos (**Lámina 5**).



**Lámina 5.-** Ovocito de hamster inmediatamente tras su descongelación (40x). Se observa una conformación anómala del citoplasma debida a la deshidratación sufrida por dicha célula durante los procesos de congelación.

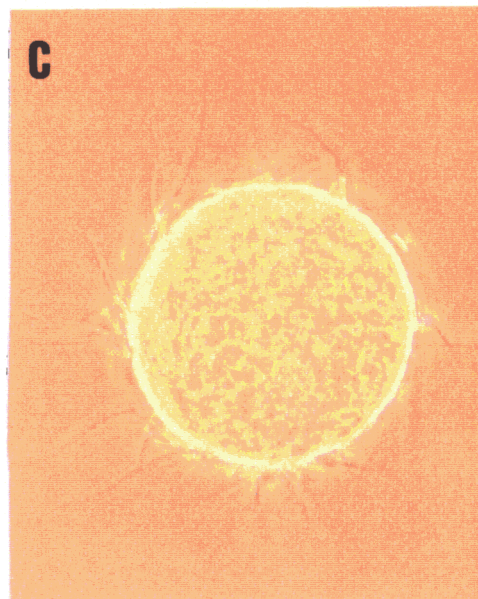
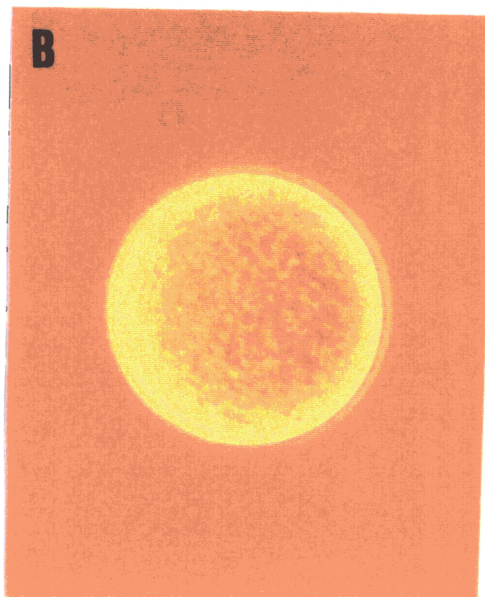
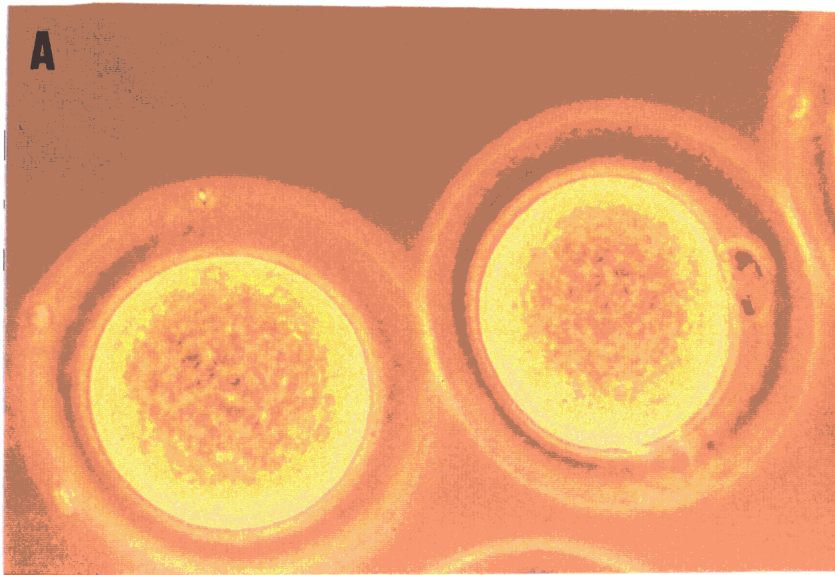
### 3.2.7.2. Protocolo

Transcurrido el tiempo de descongelación-equilibración y mediante control estereomicroscópico se eliminan aquellos ovocitos que no presenten membrana pelúcida íntegra, citoplasma esférico y primer corpúsculo polar liberado. Los ovocitos seleccionados son lavados tres veces en PBS con el objetivo de eliminar posibles restos del diluyente de congelación. Posteriormente son sometidos a la degradación de la membrana pelúcida por inclusión de los mismos en tripsina al 0,1% en PBS durante 1-2 minutos (**Lámina 6**). A continuación se lavan de nuevo en PBS y pasan en grupo de 9-12 en placas petri en microgotas de 300  $\mu$ l de BWW+0.3% BSA cubiertas por aceite de parafina.

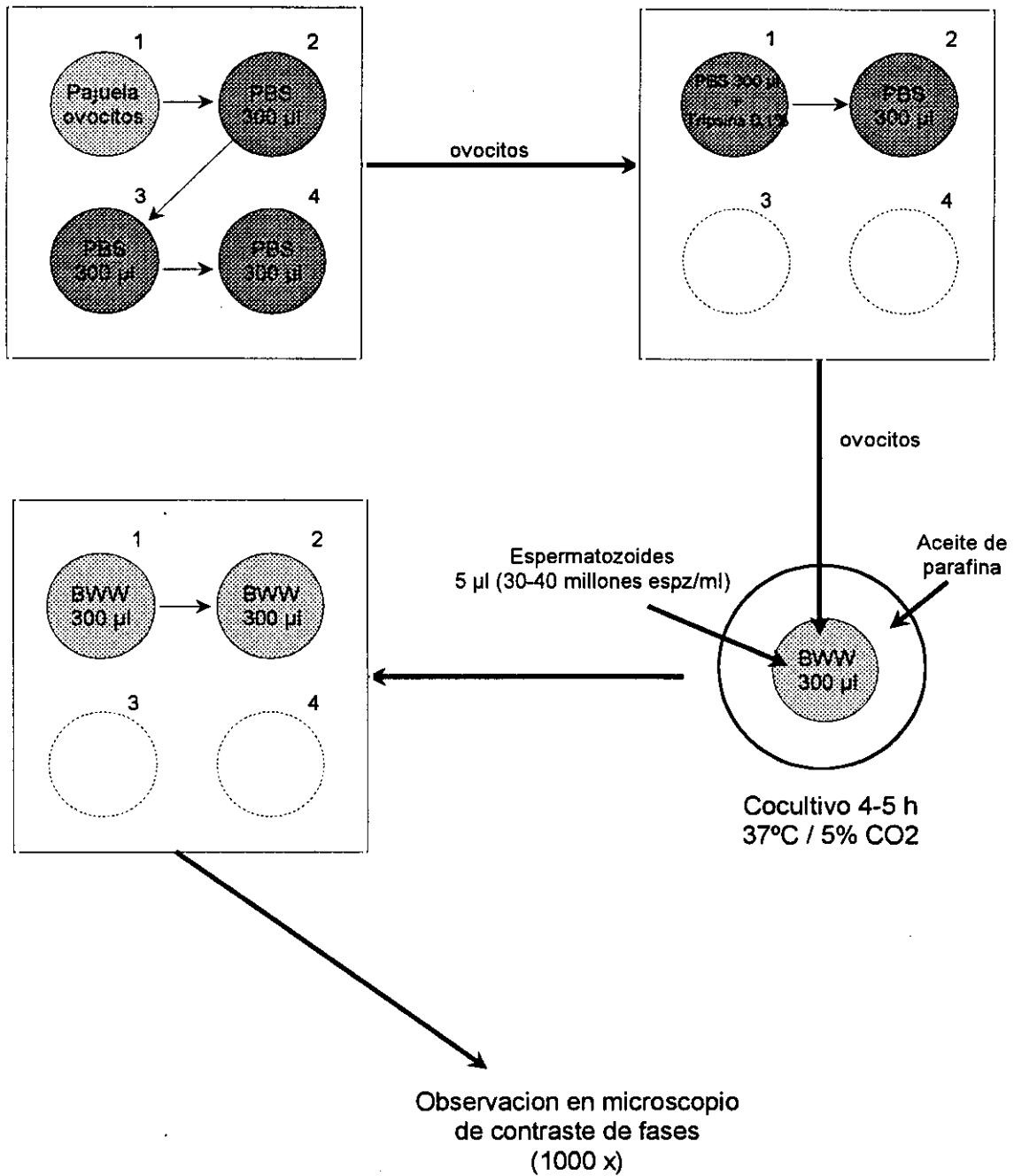
Se procede a la inseminación de los ovocitos añadiendo 3  $\mu$ l de cada muestra seminal (concentración aproximada de  $30 \times 10^6$  espz/ml), procedente de los diferentes tratamientos espermáticos utilizados, a la microgota.

Tras el co-cultivo durante 4-5 h. a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera saturada de humedad se procede al control de fertilización de los ovocitos inseminados. Mediante una lupa binocular se procede a la aspiración y doble lavado de los ovocitos en BWW fresco con el objeto de eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la membrana citoplasmática (**Lámina 6**). Los ovocitos son de nuevo agrupados y transferidos a un portaobjetos (desengrasado en alcohol eter), situándolos en posición central, procurando de arrastrar la mínima cantidad de medio. El cubreobjetos se coloca y presiona alternativamente, previa adición de vaselina en las cuatro esquinas, sobre el portaobjetos hasta que los ovocitos se comprimen lo suficiente para poder ser analizados mediante un microscopio de contraste de fases (x1000). Se marca la posición de cada ovocito en el porta con ayuda de la lupa para facilitar su posterior observación en el microscopio (**Esquema 7**).





**Lámina 6.-** Ovocitos de hamster tras el período de equilibración. Visualización en microscopía de contraste de fases a 100x. **A)** Ovocitos con zona pelúcida intacta y segundo corpúsculo polar liberado; **B)** Ovocitos sin zona pelúcida tras su tratamiento con tripsina al 0,1% y **C)** Ovocito con espermatozoides adheridos.



**Esquema 7.-** Tratamiento seguido en la Fecundación "in vitro" de ovocitos congelados de hamster con semen caprino.



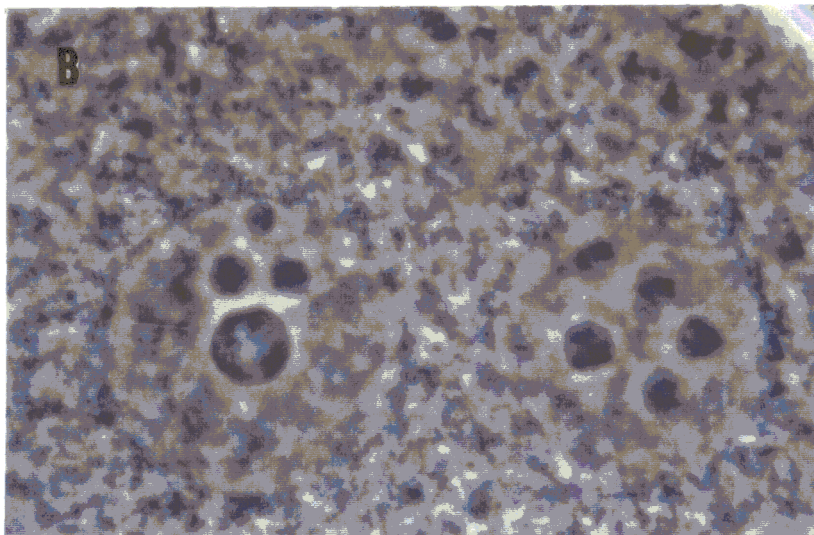
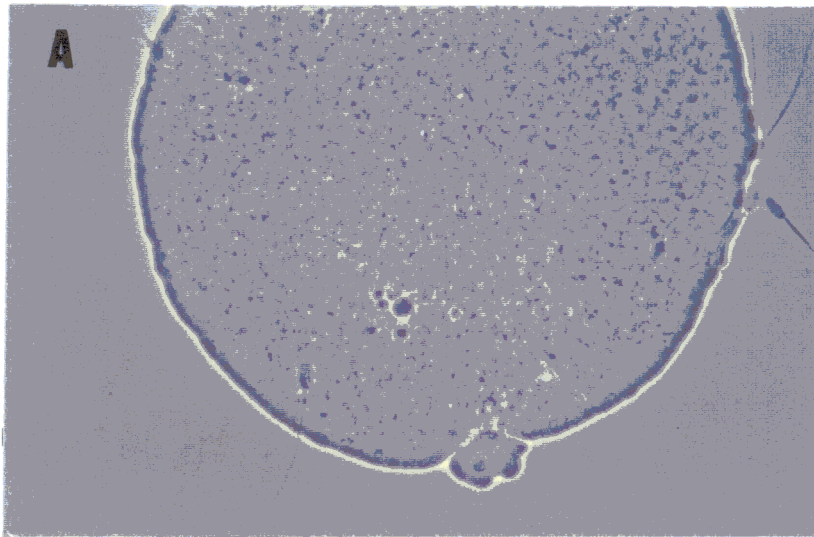
Se consideró como ovocitos penetrados aquellos que presentaban en su citoplasma cabezas hinchadas o pronúcleos masculinos acompañados de colas espermáticas visibles. Es frecuente apreciar varias cabezas de espermatozoides en el interior de un mismo ovocito, ya que, al eliminar la zona pelúcida, estamos eliminando la barrera contra la polispermia (**Lámina 7**).

Es fundamental contabilizar como fecundados únicamente aquellos ovocitos con pronúcleos que poseen una cola asociada o identificable en una región próxima a ellos, ya que los ovocitos de hamster presentan una elevada predisposición a la activación partenogénica y, por tanto, la presencia de núcleos o micronúcleos en su interior no presupone que sean debidos a una fertilización.

Del estudio de los resultados en el TH se estudiaron dos valores:

\* *Porcentaje de penetración (PP)*: Porcentaje de ovocitos que contienen en su citoplasma una o más cabezas descondensadas y/o pronúcleos masculinos con cola identificable en relación al número total de ovocitos examinados.

\* *Índice de penetración (IP)*: Número total de cabezas descondensadas y/o pronúcleos masculinos con cola identificable dividido entre el número de ovocitos penetrados. Es indicativo del grado de polispermia.



**Lámina 7.-** Penetración de espermatozoides de macho cabrío en ovocitos de hamster dorado: **A)** Ovocito con segundo corpúsculo polar liberado; **B)** Ovocito con dos pronúcleos presentes en su citoplasma.

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### **3.3.1. Experiencia 1: Efecto de los procesos de conservación del semen caprino sobre su perfil de capacitación y viabilidad espermática "in vitro".**

En esta primera experiencia se pretende estudiar el efecto ejercido por la refrigeración y congelación sobre la capacitación y viabilidad espermática. Como primer objetivo se plantea la determinación de la curva de capacitación en semen fresco heterospérmico caprino durante 24 horas según el apartado 3.2.2.. La observación del porcentaje de espermatozoides móviles, calidad de movimiento, índice de vitalidad, estatus acrosomal, test de permeabilidad de membrana y triple tinción (apartado 3.2.5.) son utilizados como métodos de diagnosis del estado de capacitación del semen caprino durante todo el período de capacitación.

Como segundo objetivo dentro de esta experiencia se plantea estudiar el efecto ejercido por las bajas temperaturas durante la refrigeración (+5°C) y congelación (-196°C), así como por los diferentes diluyentes y metodologías (con o sin centrifugación) (apartado 3.2.3. y 3.2.4.) sobre la curva patrón de capacitación del semen fresco previamente establecida, estudiándose los mismos parámetros que para el semen fresco heterospérmico

#### **3.3.2. Experiencia 2: Efecto inductor del Ca<sup>2+</sup> ionóforo sobre la reacción acrosómica en semen caprino heterospérmico fresco, refrigerado y congelado (test Aric).**

Con este estudio se pretende conocer la influencia del ionóforo A23187 sobre la capacitación espermática del macho cabrío en diferentes condiciones de conservación (refrigeración y congelación) mediante el test ARIC (apartado 3.2.6.). La valoración de

dicho test se realizó mediante la triple tinción (apartado 3.2.5.5.), considerando la variable “espermatozoides vivos reaccionados” como la de mayor relevancia debido a sus implicaciones durante la fecundación.

La influencia de los diferentes diluyentes así como los métodos de refrigeración (apartado 3.2.3.) y congelación (apartado 3.2.4.) empleados en este estudio son analizados mediante esta técnica frente a los resultados obtenidos en el semen fresco.

### **3.3.3. Experiencia 3: Fecundación “in vitro” en semen caprino capacitado. Correlación con otras técnicas laboratoriales:**

El objetivo de esta experiencia fue determinar el grado de fecundación “in vitro” a partir de espermatozoides capacitados de macho cabrío mediante la utilización del test de hamster (apartado 3.2.7.). Esta experiencia se realizó utilizando semen fresco, refrigerado y congelado a fin de determinar el efecto ejercido por los procesos de conservación espermática sobre la fusión gamética.

A partir de los resultados obtenidos se establecieron las posibles correlaciones existentes entre el resto de las variables laboratoriales y el TH.

## **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados encontrados en este estudio están representados en las diferentes tablas mediante la media  $\pm$  error estandar, apareciendo entre paréntesis el valor del coeficiente de variación, siendo este parámetro indicativo del porcentaje de la población representado por la media.

El estudio estadístico de los distintos experimentos planteados se realizó el programa estadístico SIGMA. Se empleó el análisis de varianza como método de estimación de la variabilidad y significancia existente entre las distintas variables aplicadas, siendo la técnica de *Scheffé* la utilizada para realizar comparaciones múltiples, ya que es válida para el caso de que las distintas muestras no tengan el mismo tamaño, estando concebida para todo tipo de contrastes, incluidas combinaciones lineales de medias. Para el análisis específico de determinadas condiciones, se procedió a la realización de una comparación bilateral de medias mediante la *t de Student*.

**ABRIR CAPÍTULO 4**

