

01684 2

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE LA RESPUESTA QUIMIOTACTICA DE LOS
ESPERMATOZOIDES DE
CABALLO HACIA EL LIQUIDO FOLICULAR DE YEGUA Y
DETERMINACION DE LA NATURALEZA QUIMICA DEL
QUIMIOATRAYENTE

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS
(REPRODUCCION)

PRESENTADA POR

MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

DIRECTORES DE TESIS:

DMV. JAVIER VALENCIA MENDEZ
M. en C. CARLOS VILLANUEVA DIAZ

MEXICO, DF. 1998

26634



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

COMITÉ TUTORIAL:

DR. LUIS ZARCO QUINTERO

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

DRA. ROSA MARIA PARAMO RAMIREZ

DR. CARLOS VAZQUEZ PELAEZ

M. en C. ARTURO TREJO GONZALEZ

DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ

M. en C. CARLOS VILLANUEVA DIAZ

Llegará el día en el que los seres humanos dejarán de separar a la ciencia y la religión, y aprenderán a unirlos en una sola herramienta que les permita admirar e interpretar, toda la belleza y sabiduría implícitas en las grandiosas obras del Creador, y tal vez entonces contemplarán a Dios, lo comprenderán, tratarán de imitarlo... y vivirán en paz.

DEDICATORIA

A ti mi adorado Dios, porque sé que sin ti yo no habría comenzado ni terminado nada en esta vida, porque en cada instante has estado conmigo y con los míos iluminando nuestros caminos y porque continúas colmándonos de bendiciones.

A ustedes mis adorados padres José Adolfo y María Catalina del Carmen, por todo su amor, fortaleza, paciencia y confianza, porque gracias a ustedes conocí a Dios y porque también les debo la vida y todo lo que he alcanzado en ella.

A ustedes mis queridos hermanos José Adolfo, Arturo, Gerardo, Irasema y Omar, con el deseo de que salgan adelante en sus vidas y sean felices siempre.

A ti abuelita Catalina con todo mi amor, porque en tu corazón siempre hay lugar para la bondad.

A todos ustedes tíos y tías con cariño, porque de cada uno he aprendido muchas cosas que me ayudarán a crecer como ser humano.

A ustedes primos y primas con cariño, y con el sincero deseo de que alcancen todos sus sueños.

A ustedes sobrinitas Ilianita y Melissa con mucho cariño, deseándoles vidas llenas de amor.

A ti Elena con cariño, por tantos años de amistad verdadera e invaluable.

A ti Edgar con gratitud y cariño, porque en un principio me ayudaste mucho en esta investigación, y porque alguna vez formaste parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

La autora desea expresar su sincera gratitud a todas aquellas personas quienes contribuyeron en la realización de esta investigación. Se agradece a los Dres. Javier Valencia Méndez y Carlos Villanueva Díaz directores de tesis, por la preocupación mostrada ante cada una de las dificultades que se presentaron durante el posgrado y por el intenso apoyo brindado, por su asesoría y consejos, y en general por todas sus finas atenciones.

Se agradece a cada uno de los integrantes del Comité Tutorial, por el interés mostrado en el tema de investigación, así como por sus atinadas observaciones y sugerencias para el desarrollo y avance del mismo. Al Dr. Carlos Vázquez por su colaboración y asesoría en los análisis estadísticos.

Al CONACYT por el valioso apoyo económico que tuvo a bien otorgar para la realización de este trabajo.

A Omar Navarro por su constante ayuda en la elaboración de cuadros y gráficas.

A la familia Cózar Angulo por la ayuda tan oportuna brindada a quien esto escribe al solicitar la beca.

A la Dra. Mirna Echavarría del Depto. de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) por el apoyo otorgado en el primer semestre de este posgrado y por las facilidades para el uso del laboratorio.

A la Q.F.I. Ma. de Los Angeles Díaz y Q.F.B. Adriana Flores, a las Biólogas Eva Vega, Leonor Durán, Maribel Sánchez y Margarita Zarate y al Dr. Alfonso Carrera del Lab. de Andrología del INPer, y a los Q.B.P. Ma. Antonieta Hernández, y Joel Arias, a los Biólogos Luisa Bermejo y Arturo Barrón del Lab. de Bioquímica del INPer, por su colaboración y guía en las técnicas de laboratorio.

Igualmente se agradece a los M.V.Z. Fausto Rodríguez, Jerzaín Montiel y Santiago Rodríguez del Servicio Veterinario del Agrupamiento a Caballo de la Sría. de Seguridad Pública por su valiosa colaboración en las colecciones de semen. Al M. en C. Gerardo Perera, a las M.V.Z. Clara Murcia y Susana Rojas del Lab. de Endocrinología de la UNAM por su contribución para la técnica de RIA, al M.P.A. Octavio Mejía del Depto. de Reproducción Animal de la UNAM por la donación de líquido folicular sin esteroides y al M. en C. Demetrio Ambriz de la UAM-Iztapalapa por su colaboración en el ajuste de osmolaridad del medio HTF.

A los Licenciados Juan Manuel, Julio y Joaquín Gallástegui y Máx Fernández Alonso por su sincero apoyo.

LISTA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. JUSTIFICACION.....	7
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	9
2.1. Quimiotaxis en las especies inferiores.....	9
2.2. Quimiotaxis en las especies superiores.....	11
2.3. Modelos para la evaluación de la quimiotaxis.....	12
2.4. Origen, composición y funciones del líquido folicular	19
2.5. Hormonas del líquido folicular.....	23
2.6. Actividad quimiotáctica del líquido folicular.....	27
3. MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1. Obtención del Líquido Folicular.....	31
3.2. Obtención de Eyaculados.....	32
3.3. Evaluación del Semen.....	33
3.4. Preparación de las Cámaras de Quimiotaxis.....	34
4. TRABAJOS EXPERIMENTALES.....	36
4.1. EXPERIMENTO 1.	
Evaluación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de caballo hacia el líquido folicular crudo de yegua	
4.1.1. OBJETIVO GENERAL.....	36
4.1.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
4.1.2. HIPOTESIS.....	36
4.1.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.....	36
4.1.2.2. Ensayos de quimiotaxis.....	37
4.1.3. RESULTADOS.....	39
4.1.4. DISCUSION.....	42
4.2. EXPERIMENTO 2.	
Efectos de la desnaturalización, hidrólisis por tripsina, extracción lipídica y dializado, sobre las propiedades quimiotácticas del líquido folicular de yegua hacia los espermatozoides de caballo	
4.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	45
4.2.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
4.2.2. HIPOTESIS.....	45
4.2.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.....	46
4.2.2.2. Ensayos de quimiotaxis.....	48

4.2.3. RESULTADOS.....	51
4.2.4. DISCUSION.....	54
4.3. EXPERIMENTO 3.	
Efecto quimiotáctico del líquido folicular de yegua libre de esteroides (carbón-dextrán y dializado) y del HTF contra el que se dializó vs. líquido folicular crudo, sobre los espermatozoides de caballo	
4.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	58
4.3.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	58
4.3.2. HIPOTESIS.....	58
4.3.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.....	59
4.3.2.2. Ensayos de quimiotaxis.....	60
4.3.3. RESULTADOS.....	62
4.3.4. DISCUSION.....	65
5. DISCUSION GENERAL.....	71
6. CONCLUSIONES.....	77
7. BIBLIOGRAFIA GENERAL.....	79
8. ANEXOS.....	91

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados en base al tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis.....	40
2. Porcentajes de migración específica y no específica en base al tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis.....	41
3. Número de ensayos efectuados por eyaculado en cada tratamiento del experimento 2.....	49
4. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 2.....	53
5. Porcentajes de migración específica y no específica para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 2.....	53
6. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 3.....	64
7. Porcentajes de migración específica y no específica para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 3.....	65

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
1. Modelo de doble cámara para el estudio de la quimiotaxis de los espermatozoides. Cámara A = líquidos experimentales, Cámara B = medio control negativo.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados a los 30 minutos de incubación.....	40
2. Migración corregida (migración específica menos migración no específica).....	41

LISTA DE ANEXOS

	Página
Cuadro 1. ANOVA para los resultados de migración y no migración de cada LF del experimento 1.....	91
Cuadro 2. ANOVA para los resultados de migración específica y no específica de cada LF del experimento 1.....	91
Cuadro 3. Cuadrados medios para los resultados de migración y no migración de cada LF del experimento 2.....	91
Cuadro 4. Cuadrados medios para la migración y no migración, y para la migración específica y no específica de cada LF del experimento 3.....	91

RESUMEN

NAVARRO MALDONADO, MARIA DEL CARMEN. Evaluación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de caballo hacia el líquido folicular de yegua y determinación de la naturaleza química del quimioatrayente. (Bajo la dirección del M. V. Z., D. M. V. JAVIER VALENCIA MENDEZ y M. C., M. en C. CARLOS VILLANUEVA DIAZ).

Se diseñaron tres experimentos utilizando un modelo de doble cámara (dos tubos unidos por un capilar). Los capilares (identificados con la letra C) se saturaron con ác. hialurónico al 0.05% en fluido tubal humano (HTF), las cámaras experimentales (A) con los líquidos foliculares (LF) a evaluar y las cámaras control (B) con albúmina sérica humana al 7.5% en HTF (HTF-HSA 7.5%), como control negativo. Los eyaculados se colectaron por vagina artificial transportando 5 ml en 10 ml de HTF, evaluando sus características macro y microscópicas y lavándolos dos veces, aproximando la concentración espermática a 50×10^6 espermatozoides/ml. Diez microlitros se colocaron en los capilares. En el experimento 1, se evaluó líquido folicular crudo de yegua obtenido por punción de folículos de ovarios colectados en rastro, vs. el medio control negativo. Las cámaras se incubaron a 15, 20, 25 y 30 minutos. Después cada líquido retirado se centrifugó, resuspendiendo las pastillas en 0.3 ml del mismo medio. A los 30 minutos, el porcentaje de espermatozoides migrados hacia el líquido folicular fue mayor al encontrado hacia el control negativo ($55.92 \pm 14.67\%$ vs. $17.01 \pm 17.48\%$) con diferencias significativas ($p < 0.05$). Este comportamiento fue similar para todos los tiempos de incubación ($p > 0.05$). En el experimento 2, los líquidos foliculares se trataron desnaturalizando proteínas por calor (LFcal), y por tripsina (LFtrip), separando proteínas mediante un dializado (LFdial), y separando la fracción lipídica utilizando acetona y cloroformo (LFlip). El líquido folicular crudo (LFcru) fue el control positivo. Existió una mayor migración hacia las cámaras A para el LFtrip (55.7%), LFcru (54.7%) y LFcal (57.4%) siendo intermedio el LFlip (52.5%) y menor el LFdial (44%) con diferencias a $p < 0.05$. La migración específica fue mayor que la no específica independientemente de los tratamientos ($p < 0.05$). El experimento 3 evaluó líquidos foliculares tratados con carbón-dextrán eliminando sus esteroides (LFcd), o dializados (LFdial), evaluándose también el medio HTF del recambio, determinando la actividad quimiotáctica de la fracción no proteica. El líquido folicular crudo (LFcru) fue el control positivo. Hubo mayor proporción de espermatozoides migrados en A para el medio HTF (53.8%), aunque fue similar al LFcru (47.7%), LFdial (45%) y LFcd (41.8%) a $p > 0.05$. La migración específica fue similar para todos los tratamientos (60.03 a 66.1%) ($p > 0.05$), pero siempre fue mayor que la migración no específica (34 a 40%) ($p < 0.05$). Estos experimentos apuntan hacia la existencia de quimioatracción del líquido folicular sobre los espermatozoides en equinos, y a la presencia de un quimioatrayente comprendido entre los esteroides y su proteína conjugada.

Palabras clave: Quimiotaxis, espermatozoides, líquido folicular equino

SUMMARY.

NAVARRO MALDONADO, MARIA DEL CARMEN. Evaluation of the chemotactic response of stallion spermatozoa toward mare follicular fluid and determination of the chemoattractant chemical nature. (Under the direction of M.V.Z., D.V.M. JAVIER VALENCIA MENDEZ and M. C., M. en C. CARLOS VILLANUEVA DIAZ).

Three experiments were designed using a double chamber model (two tubes joined by a capillar). Capillaries (identified with the letter C) were saturated with hialuronic acid 0.05% in human tubal fluid (HTF), experimental chambers (A) with the follicular fluids (FF) to evaluate and control chambers (B) with human seric albumin 7.5% in HTF (HTF-HSA 7.5%), as negative control. Ejaculates were collected by artificial vagina transporting 5 ml in 10 ml of HTF, evaluating their macro and microscopic characteristics and washing them twice, approximating the spermatic concentration to 50×10^6 spermatozoa/ml. Ten microlitres were placed into the capillaries. In experiment 1, the crude mare follicular fluid obtained by punction of ovary follicles collected at a slaughterhouse was evaluated, vs. the negative control medium. The chambers were incubated at 15, 20, 25 and 30 minutes. Then each withdrawn liquid was centrifuged, resuspending the pellets in 0.3 ml of the same medium. At 30 minutes, the percentage of spermatozoa that migrated toward the follicular fluid was greater than the one found toward the negative control ($55.92 \pm 14.67\%$ vs. $17.01 \pm 17.48\%$) with significative differences ($p < 0.05$). This behaviour was similar for all incubation times ($p > 0.05$). In experiment 2, follicular fluids were treated for protein denaturalization by heat (hFF), and by tripsin (tripFF), separating proteins by a dilaized (dialFF), and separating the lipidic fraction using acetone and cloroform (lipFF). Crude follicular fluid (cruFF) was the positive control. A major migration existed toward chambers A for tripFF (55.7%), cruFF (54.7%) and hFF (57.4%) being intermediate the lipFF (52.5%) and minor the dialFF (44%) with differences at $p < 0.05$. The specific migration was greater than the non-specific independently of the treatments ($p < 0.05$). Experiment 3 evaluated follicular fluids treated with charcoal-dextran eliminating their steroids (cdFF), or dilaized (dialFF), also evaluating the HTF medium of the change, determining the chemotactic activity of the non proteic fraction. Crude follicular fluid (cruFF) was the positive control. There was major portion of spermatozoa migrated toward A for the HTF medium (53.8%), although it was similar to cruFF (47.7%), dialFF (45%) and cdFF (41.8%) at $p > 0.05$. The specific migration was similar for all the treatments (60.03 to 66.1%) ($p > 0.05$), but it was always greater than the non specific (34 to 40%) ($p < 0.05$). These experiments point to the existence of follicular fluid chemoattraction toward spermatozoa in equines, and to the presence of a chemoattractant comprised between the steroids and their conjugated protein.

Key words: Spermatozoa chemotaxis, equine follicular fluid

1. INTRODUCCION

La fusión de un ovocito con un solo espermatozoide durante la fertilización, es debida a varios pasos que ocurren en un orden obligatorio. Estos pasos incluyen el reconocimiento celular específico de especies, la fusión de las membranas intra e intercelulares y la modificación de las envolturas celulares catalizadas por acción enzimática (Wassarman, 1987).

Brevemente, la cronología de la fertilización consiste en el encuentro del espermatozoide con las células del cumulus oophorus del ovocito, seguido de su aproximación y unión con la zona pelúcida a través de su membrana plasmática. Este evento inicia una primera fase o capacitación espermática, en la que ocurre una alteración inicial de la membrana del espermatozoide, permitiéndole iniciar una segunda fase o reacción acrosomal, en la que se fusionan entre sí las membranas acrosomal externa y plasmática del mismo, dando lugar a la formación de vesículas y favoreciendo la exposición de la membrana acrosomal interna, con la consecuente liberación de enzimas (acrosina y hialuronidasa). Así se permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida hasta alcanzar el espacio perivitelino del ovocito y fusionarse con la membrana plasmática de este último (Wassarman, 1987; Parrish et al. 1989).

Finalmente ocurre un rápido bloqueo de la polispermia, mediante las reacciones cortical y zonal del ovocito, las cuales involucran la fusión de la membrana plasmática de éste con la membrana de los gránulos corticales que ocupan la corteza del ovocito, y la liberación de enzimas hidrolíticas (proteinasas y peroxidasas) procedentes de estos gránulos, dentro del espacio perivitelino, con lo que se inactivan los receptores de espermatozoides localizados en la zona pelúcida. De este modo se forma una envoltura de fertilización (Wassarman, 1987).

Pero antes de que el ovocito y los espermatozoides puedan encontrarse en el sitio de fertilización, los espermatozoides eyaculados deben atravesar el cérvix, útero y la unión útero-oviducto para alcanzar el ámpula del oviducto. Cada una de estas estructuras reduce la población de espermatozoides de manera que solo los más sanos y normales tienen la oportunidad de fertilizar al ovocito. De este modo opera la selección natural que asegura la supervivencia de las combinaciones genéticas óptimas para cada generación (Harper, 1994).

El transporte de los espermatozoides depende en gran medida de la movilidad propia de estas células y también de otros factores propios del aparato genital femenino como son la presión negativa de la vagina durante el orgasmo, la presencia de moco cervical y las contracciones uterinas, mismas que impelen la porción de espermatozoides eyaculados. Junto con estos espermatozoides puede ocurrir que también sea transportado el plasma seminal que contiene cierta cantidad de prostaglandinas, las cuales son absorbidas por las paredes de la vagina y pueden estar involucradas en el incremento de las contracciones de la vagina y del útero, aunque en éste último actúen a menor escala (Harper, 1994). Aunado a ello está la acción de los cilios y las contracciones musculares del oviducto (Ebert, 1965).

A su paso por el cérvix, el moco cervical permite la selección de los espermatozoides viables impidiendo que sean fagocitados por los leucocitos, ya que un 60% de los espermatozoides anormales o muertos son fagocitados por los neutrófilos polimorfonucleares debido a que su presencia induce la quimiotaxis de estos neutrófilos mediante la activación del complemento (Troedsson et al. 1998), o son eliminados por el movimiento del moco hacia la vagina; por ello es probable que las criptas cervicales funcionen como un reservorio que permita la liberación continua de los mejores espermatozoides. Sin embargo el principal sitio de almacenamiento de espermatozoides para la mayoría de las especies mamíferas es la región ístmica del oviducto. De este modo, el cérvix provee una barrera para

el ascenso de espermatozoides hacia el útero (Harper, 1994). En el caso de los equinos, dado que la mayoría de los espermatozoides son depositados dentro del útero durante la eyaculación, la unión útero-oviducto representa una barrera más importante que el cérvix para que los espermatozoides alcancen el sitio de fertilización en el ámpula (Troedsson et al. 1998).

Una vez en útero, las contracciones uterinas son iniciadas por la acción de la oxitocina plasmática que se incrementa por estímulo sexual, durante y después del orgasmo en humanos, equinos, bovinos y porcinos, y como resultado de una reacción inflamatoria al semen. De esta manera el útero remueve el excedente de espermatozoides, los productos seminales y los contaminantes fuera del aparato reproductor femenino, al mismo tiempo que favorece el transporte de los espermatozoides seleccionados hacia el oviducto (Troedsson et al. 1998). También en el útero existe la acción de un factor inductor de las contracciones uterinas y de la movilidad espermática conocido como PAF (platelet-activating factor), de naturaleza lipídica, presente tanto en los espermatozoides como en los tejidos uterinos de humanos, lepóridos y ratas (Harper, 1994). Por otra parte, las prostaglandinas uterinas y las provenientes del plasma seminal también favorecen la ocurrencia de contracciones uterinas, aunque estas últimas lo hagan en mucho menor escala (Troedsson et al. 1998). Además, al momento de la ovulación el endometrio sufre cambios en su epitelio y en sus secreciones, las cuales son ricas en proteínas tales como albúmina, prealbúmina, transferrina y postranferrina, y en un aminoácido llamado taurina que mantiene la movilidad del espermatozoide, protegiéndolo del efecto dañino de las altas concentraciones de potasio, y manteniendo así un nivel interno de calcio adecuado para su movilidad (Harper, 1994). Esta movilidad del espermatozoide no solamente es importante para su transporte, sino que adquiere un papel preponderante en la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Ebert, 1965).

En la unión útero-oviducto también ocurren contracciones, por acción de las prostaglandinas locales (PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$), que no solo favorecen la captura del ovocito desde la superficie del ovario, sino también la propulsión de espermatozoides a través de la unión útero-oviducto y hacia el sitio de almacenamiento en el istmo (Harper, 1994). De este modo, esta región funciona como filtro de espermatozoides ya que después de que los espermatozoides entran en el oviducto, son distribuidos de dos maneras: unos cuantos son rápidamente transportados a la región ampular, pero no son los que fertilizan al ovocito en aquellas especies en las que la monta tiene lugar antes de que ocurra la ovulación, mientras que otros permanecen en la región proximal del istmo hasta que ocurre la ovulación, región en donde se ha propuesto que pudieran quedar ligados a las células epiteliales, por lo que se suprimen la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides (Parrish et al. 1989; Harper, 1994; Troedsson et al. 1998). Una vez ocurrida la ovulación los espermatozoides reanudan su movilidad hasta alcanzar al ovocito (Parrish et al. 1989; Ward and Kopf, 1993).

Algunos cambios ocurridos en dicha región que podrían estar involucrados en el cese temporal de la movilidad espermática son: las elevadas concentraciones de esteroides como la androstenediona y el estradiol (E_2), que regulan las contracciones del istmo del oviducto de cerda (Hunter et al. 1983). Las acciones enzimáticas (anhidrasa carbónica) que ocurren para regular el estado ácido-básico del fluido luminal en esa región, las cuales regulan la inmovilidad de los espermatozoides en porcinos (Rodríguez-Martínez et al. 1991), la concentración de potasio como inhibidor in vitro de la hiperactivación del movimiento flagelar del espermatozoide, y de piruvato como estimulador in vitro de la hiperactivación del movimiento flagelar del espermatozoide de conejo (Burkman et al. 1984), el gradiente de temperatura desde el istmo hasta el ampulla, en donde la temperatura en el istmo es más baja que en el ampulla del oviducto de cerda (Hunter and Nicol 1986), y las concentraciones de catecolaminas (dopamina,

epinefrina y norepinefrina) que se incrementan durante el estro y están más elevadas en el istmo que en el ámpula del oviducto de coneja, regulando la actividad de la musculatura lisa a este nivel (Khatchadourian et al. 1987). Aunque se desconoce con exactitud, la manera como ejercen su influencia en ello (Harper, 1994).

Por su parte, la supresión de la capacitación espermática y de la reacción acrosomal en el istmo del oviducto, se debe a que cuando los espermatozoides quedan ligados a las células epiteliales del oviducto, las concentraciones de calcio intracelular de los espermatozoides se mantienen en niveles basales (Troedsson et al. 1998).

El tiempo que los espermatozoides permanecen en este sitio de almacenamiento puede llegar a ser muy largo en algunos mamíferos como los equinos, en los que se ha observado que cuando se inseminan yeguas 6 días antes de que ocurra su ovulación, quedan gestantes. Una posible explicación de esta longevidad de los espermatozoides almacenados está en algunas proteínas provenientes del plasma seminal, las cuales rodean a los espermatozoides protegiéndolos de la fagocitosis selectiva, porque reducen la migración y quimiotaxis de los neutrófilos que fagocitan a los espermatozoides. Además, previenen la ocurrencia de la capacitación espermática prematura, es decir que actúan como factores descapacitantes (Troedsson et al. 1998). También algunas proteínas provenientes del fluido oviductal protegen al espermatozoide, tal es el caso de una glicoproteína de 54 a 66 kilodaltons presente en este fluido en humanos y ovinos, y que se une a la cabeza del espermatozoide favoreciendo el incremento de su movilidad, previniendo su reacción acrosomal, e inhibiendo la activación del complemento (Lippes y Wagh, 1989).

La liberación de los espermatozoides de su sitio de almacenamiento probablemente ocurre por una hiperactivación del movimiento flagelar asociada a

la capacitación espermática, la cual según Parrish et al (1989), se ve favorecida por un factor capacitante (sulfato de heparina) presente en el fluido oviductal. Esta liberación también se ve influenciada por el momento de la ovulación, pero el mecanismo para que esto suceda no está completamente comprendido, aunque se sugiere que tanto el líquido folicular como los fluidos oviductales que son liberados junto con el ovocito al momento de la ovulación, causan un incremento de la velocidad de movimiento de los espermatozoides, favoreciendo la direccionalidad de los mismos hacia el sitio de fertilización (Lippes y Wagh, 1989; Horne y Thibault, 1962; Harper, 1994). Aunado a esto, el inicio de la capacitación puede ser otro factor que provoque la separación de los espermatozoides que se encuentran ligados a las células del oviducto (Troedsson et al. 1998).

Cuando los espermatozoides reanudan su movimiento desde el istmo hasta el ámpula, los cilios de las células epiteliales incrementan y cambian la dirección de sus movimientos de ser adovarianos a convertirse en abovarianos y junto con el cambio en la dirección del flujo del fluido luminal, previenen que los gametos se muevan a través de la unión ampular-istmica pero sin afectar el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización (Horne y Thibault, 1962, Harper, 1994).

Una vez superadas todas estas barreras, los gametos masculino y femenino de los mamíferos, llegan al sitio de fertilización y se encuentran gracias a ciertos mecanismos de atracción que recuerdan a los existentes para otras especies tanto vegetales como marinas, en las cuales se ha visto que el proceso de fertilización es precedido por una señal química del gameto femenino hacia los gametos masculinos, fenómeno que parece asegurar que un adecuado número de estas células alcance el sitio de fertilización. Este sistema de atracción es de vital importancia en las especies que tienen una fertilización extracorpórea, dado que el encuentro de los gametos es un factor determinante para su sobrevivencia (Villanueva et al. 1990).

La filogenia de estos sistemas de atracción química entre las células germinales puede remontarse a las primeras etapas de la evolución, ya que se ha determinado que en las células que tienen la capacidad de desplazarse como es el caso de las bacterias (*Escherichia coli*) y los leucocitos polimorfonucleares, ciertas sustancias químicas funcionan como señuelos y son captadas por los sitios receptores específicos localizados en la membrana celular. De esta forma, la célula se desplaza en la dirección del quimioatrayente (Jawets et al. 1981; De Robertis y De Robertis, 1981; Ganong, 1992).

En los mamíferos, al llegar los gametos masculino y femenino al sitio de fertilización, la posibilidad del encuentro entre ambos se facilita por un mecanismo de atracción química que aparentemente es producido por el ovocito o por las estructuras que lo rodean y que está presente en el líquido folicular de folículos maduros (Villanueva et al. 1990; Villanueva et al. 1992; Cohen-Dayag et al. 1994; Ralt et al, 1994).

Recientemente se han aislado ciertas sustancias del líquido folicular de humano que han sido evaluadas en laboratorio, observándose que poseen actividades leucotácticas, angiogénicas y mitogénicas; por lo que es muy probable que también puedan estar involucradas en la quimioatracción de las células germinales masculinas (Bryant et al. 1988) como señalan Villanueva et al. (1992), quienes en estudios posteriores encontraron que la progesterona actuaba como quimiotáctico del líquido folicular sobre los espermatozoides en humanos (Villanueva et al. 1995).

1.1. JUSTIFICACION

En los mamíferos domésticos, aún no se han evaluado lo suficiente los componentes del líquido folicular en cuanto a su implicación en estos sistemas de quimioatracción in vitro, por lo que el presente trabajo pretende determinar si el líquido folicular de yegua ejerce quimioatracción sobre los espermatozoides de

caballo y en caso de que así sea, determinar la naturaleza química de la o las sustancias implicadas en ello. De esta forma sería factible incrementar en sistemas in vitro la afinidad de los espermatozoides hacia los ovocitos, favorecer su movilidad, su capacitación y reacción acrosomal, y por ende la fertilización.

Este tipo de estudios podría a futuro darle una nueva utilidad al líquido folicular y a su(s) componente(s) quimiotáctico(s), que como sucede en el caso de la inducción y sincronización de estros, proporcione una herramienta más en la búsqueda de la eficiencia en la reproducción animal al incrementar los índices de fertilidad, así como al solucionar o evitar algunas de las causas de infertilidad.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Quimiotaxis en las especies inferiores.

La quimiotaxis puede definirse como la respuesta de una célula móvil ante un gradiente químico, lo que ocasiona una modificación en la dirección en que viaja para acercarse hacia el atrayente o alejarse de un repelente. Por otra parte, la quimiocinesis se conoce como el cambio en la velocidad con la que las células se mueven a causa de un estímulo químico (Rait et al. 1994).

La quimiotaxis ha sido estudiada primordialmente en las bacterias y en los mecanismos de defensa de los procesos inflamatorios y se ha mostrado por ejemplo, que los productos bacterianos actúan recíprocamente con factores plasmáticos y células del sistema inmune, para producir sustancias que atraen a los neutrófilos hacia el área infectada. Estas sustancias quimioatrayentes también incluyen a los componentes del sistema de complemento C3, C5 y al complejo C5,6,7; los cuales se encargan de atraer a los leucocitos, a los leucotrienos, a los polipéptidos de los linfocitos, a las células cebadas y a los basófilos (Ganong, 1992; Jawets et al. 1981).

A este respecto, Subandrio et al. (1997) evaluaron la migración de neutrófilos dentro del lumen uterino de bovinos, en presencia de dos quimioatrayentes intrauterinos (un filtrado de bacterias Actinomyces pyogenes y una suspensión de glicógeno de ostras). Además trataron parenteralmente a las vacas con progesterona (P4) o con E2 y encontraron que había un mayor número de neutrófilos migrados hacia ambos quimioatrayentes (principalmente hacia el filtrado de bacterias), cuando se les había administrado P4 que cuando se les administró E2. Concluyendo que la P4 exógena realza significativamente la respuesta migratoria de los neutrófilos hacia los quimioatrayentes.

En estudios relacionados con los hongos, se ha visto un aspecto de la comunicación celular que tiene lugar durante la formación de agregados multicelulares. Esto incluye a la quimiotaxis, que en el caso del hongo Dictyostelium discoideum es efectuada por el nucleótido 3'5'AMPc, el cual actúa como mensajero quimiotáctico. Este AMPc se fija a los receptores de la superficie celular, provocando un aumento transitorio en los niveles de calcio intracelular (Darnell et al. 1988).

También en algunas plantas como los helechos, se ha descubierto que el ácido málico presente en la capa de líquido que cubre la superficie del prótalo, ejerce una función quimiotáctica sobre los gametos masculinos de este vegetal, atrayéndolos hacia el gameto femenino. Ambas células están presentes en el prótalo (Monroy, 1969). En las algas briofitas y las pteridofitas, los gametos masculinos reaccionan a la presencia de un gradiente de agente químico, aunque no se ha determinado su naturaleza química (Austin, 1967).

Sin embargo, aún cuando la quimiotaxis ha sido evaluada de manera exhaustiva en células de diferentes organismos vegetales, la atracción química entre gametos todavía se considera como un campo poco explorado (Ralt et al. 1994).

Algunos estudios llevados a cabo en el erizo de mar, señalan la existencia de un mecanismo que asegura que los espermatozoides puedan quedar adheridos a la superficie del ovocito, debido a que este último produce una sustancia llamada "Fertilizina", que reacciona con los espermatozoides y los aglutina específicamente. En los mamíferos, todavía no se ha demostrado inequívocamente un proceso similar (Monroy, 1969; McLaren, 1974).

Otras sustancias producidas por el ovocito están relacionadas con la atracción química entre los gametos; tal es el caso de dos péptidos pequeños

denominados "Speract" y "Resact" también presentes en el erizo de mar, que tienen como función la señalización química, la activación de la movilidad del espermatozoide y el aumento de su metabolismo. La síntesis de estas moléculas se lleva a cabo aparentemente en el ovocito, ya que se ha demostrado que en la biblioteca genética de esta célula existen 8 secuencias que podrían dar lugar a la formación de estas moléculas (Garbers, 1989).

Otros péptidos pequeños han sido aislados en el pez estrella, que estimulan la respiración, movilidad y metabolismo de los fosfolípidos en el espermatozoide, favoreciendo la entrada de calcio a la célula (Ward and Kopf, 1993).

En el cangrejo herradura, el espermatozoide liberado es inmóvil hasta que encuentra un factor iniciador de la movilidad (SMI), que se origina del ovocito y que produce un incremento en la movilidad en un 99%. Algo similar ocurre en el pez arenque, especie en la que el espermatozoide liberado es móvil hasta que queda en contacto con el área micropilosa del corion del ovocito, con lo que se incrementa la movilidad en un 90% (Ward and Kopf, 1993).

2.2. Quimiotaxis en las especies superiores

En los mamíferos (humano, equino, bovino, ovino, porcino, lepórico y hámster), existen las evidencias de que la mayor parte de los espermatozoides que entran en el oviducto, son almacenados en el istmo caudal del oviducto, en un estado de movilidad reducida, y que minutos después de ocurrida la ovulación, estos espermatozoides almacenados reanudan su movilidad alcanzando el ámpula, que es el sitio de fertilización (Ward and Kopf, 1993; Harper, 1994; Troedsson et al. 1998).

En el caso de los equinos, los espermatozoides quedan atrapados en las células epiteliales del oviducto en la porción más baja del istmo, esta interacción es necesaria para que se forme un reservorio de espermatozoides en el oviducto,

y además permite que ocurran cambios funcionales asociados con la selección, longevidad y capacitación de los espermatozoides. Este último proceso es debido a los cambios en las proteínas y glicoproteínas de la membrana plasmática del espermatozoide (Osman et al. 1989, Thomas et al. 1995).

Harper (1982) mostró que las células del folículo que rodean al ovocito de rata, tienen una disposición radial y que este arreglo de las células podría ser el que orienta al espermatozoide hacia el ovocito, además sugirió que el ovocito podría liberar mensajes químicos para atraer al espermatozoide y así favorecer la fertilización.

Wassarman (1987) menciona que en los ratones existe un receptor específico de esta especie conocido como ZP3, que es una de tres glicoproteínas que conforman la zona pelúcida del ovocito, con un peso molecular de 83,000 y que está ligada a ciertos oligosacáridos de peso molecular de 3,900 los cuales son necesarios para la unión de los espermatozoides con el ovocito, para la inducción de su reacción acrosomal y por ende para favorecer la fertilización.

En hámsters, se conoce la existencia de algunas sustancias sensibles a las proteasas que tienen pesos moleculares de 1000 a 5000 daltons; mismas que son liberadas por el cumulus oophorus a diferentes tiempos durante la interacción inicial entre el espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida antes de la penetración y que pueden estar ejerciendo una atracción sobre los espermatozoides, (Ballesteros et al. 1988). Aunque estos autores no evaluaron la manera como estas proteínas ejercen dicha quimioatracción.

2.3. Modelos para la evaluación de la quimiotaxis

La posibilidad de que en las especies superiores los espermatozoides pudieran estar sujetos a los mecanismos de atracción química, es sugerida por algunas evidencias de fenómenos de migración espermática transperitoneal, como

fue observado por Brown et al (1987), quienes describieron el caso de una mujer con una anomalía congénita, consistente en un útero unicorne que presentaba un oviducto izquierdo heterotópico separado del útero, y uno derecho normal; y en donde el oviducto izquierdo contenía una gestación ectópica. Szlachter y Weiss (1979), señalan el caso de otra mujer con útero unicorne, en donde el oviducto derecho era más corto que el izquierdo y aparecía separado de sus porciones proximal y distal por un espacio de 3 cm, mientras que el oviducto izquierdo presentaba adherencias, y los ovarios parecían normales, observando una gestación ectópica en el oviducto derecho que sugería que los espermatozoides habían atravesado el oviducto izquierdo, cruzando la cavidad peritoneal y entrando en el oviducto derecho a través de su fimbria.

Otro caso es descrito por Sultan y Bedford (1996), quienes removieron uno de los dos ovarios a un grupo de ratas, para después darles monta utilizando machos fértiles, al momento del estro. Posterior a las 8 horas de la monta, las ratas fueron sacrificadas para recuperar los oviductos y evaluar el contenido de la región ampular (ovocitos y espermatozoides). Con este experimento, observaron que siempre era mucho mayor el número de espermatozoides encontrados en el ámpula del oviducto ipsilateral al ovario intacto, en comparación con el oviducto correspondiente al lado ovariectomizado, sugiriendo una migración de los espermatozoides hacia el lado en donde ocurre la ovulación.

La aparente migración de los espermatozoides, podría estar motivada por una atracción química, lo cual queda parcialmente demostrado en los trabajos de Gnessi et al. (1986), quienes observaron que el péptido sintético N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLPh) tiene un efecto quimiotáctico sobre el espermatozoide humano. Este péptido se deriva de las bacterias y se conoce que atrae a los neutrófilos al sitio de infección (Gnessi et al. 1986). Para evaluar la actividad quimiotáctica, los autores utilizaron un modelo de doble cámara consistente en una cámara superior y otra inferior separadas entre sí por una membrana o filtro

de policarbonato con poros de 5.0 μ m. Suspendieron una concentración espermática de 1×10^6 espermatozoides/ml en un medio a base de PBS-BSA (Phosphate buffer solution-bovine serum albumin) y colocaron 25 μ l de esa suspensión en las celdas de la cámara inferior. En la cámara superior colocaron 40 μ l del péptido sintético N-formil preparado en PBS. Cubrieron las cámaras con cubreobjetos y las incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para después invertir las cámaras y centrifugarlas a 300 rpm (revoluciones por minuto) durante 20 minutos, en una centrifuga equipada con un rotor que sedimentó a los espermatozoides que habían migrado dentro de la cámara superior y hacia el cubreobjetos. Este se removió de la cámara y se secó al aire para contar y promediar las células migradas hacia el cubreobjetos ayudándose de un microscopio.

Para demostrar la unión del péptido N-formil a la membrana de los espermatozoides, los mismos autores incubaron 2×10^6 espermatozoides/ml con el péptido marcado, durante 20 minutos en PBS, para después terminar la incubación adicionando un buffer y filtrando la mezcla en fibra de vidrio. Lavaron los filtros en un buffer y luego los suspendieron en una mezcla de flúor para escintilación, midiendo la radioactividad en un espectrómetro. Definieron la unión no específica como la cantidad de péptido marcado unido a los espermatozoides, en presencia del mismo péptido sin marcar, y la unión específica como la cantidad total de péptido marcado menos la unión no específica. En este estudio encontraron que existía unión específica del péptido sintético N-formil con la membrana de los espermatozoides de humano, y que la habilidad de este péptido para ejercer quimiotaxis sobre los espermatozoides era proporcional a su habilidad para unirse a los sitios receptores específicos. Señalan además, que los receptores de membrana del espermatozoide para este péptido, son muy similares a los receptores de membrana de los leucocitos polimorfonucleares para este mismo péptido. Ellos explican que estos péptidos son potencialmente producidos en el aparato genital femenino cuando existe un daño tisular o infección

bacteriana, y que probablemente sirvan para apartar a los espermatozoides del ovocito, evitando que lo fertilicen en condiciones desfavorables.

Más tarde, Ballesteros et al. (1988) siguiendo una metodología similar a la anterior, corroboraron que la membrana plasmática de los espermatozoides de humano poseía los sitios de unión para este péptido sintético, aunque no determinaron si dicho péptido ejercía quimioatracción sobre ellos. Los autores mantuvieron espermatozoides intactos o cantidades equivalentes de preparaciones de membranas plasmáticas en un buffer, para luego adicionarlos a tubos que contenían al péptido sintético marcado, y en presencia o ausencia del mismo péptido sin marcar. Incubaron la mezcla 60 minutos, terminando la incubación mediante la adición de un buffer, mezclándolo y centrifugándolo para luego lavar el precipitado y resuspenderlo en medio PBS. Estas preparaciones las mezclaron después para escintilación, midiendo la radioactividad en un contador. La unión no específica y específica fue determinada de igual forma que en el experimento de Gnessi et al (1986). De este modo determinaron dos probables funciones de estos sitios receptores, la unión al péptido, y el transporte de éste al interior del espermatozoide.

Por su parte, Villanueva et al. (1990) evaluaron la actividad quimiotáctica del líquido folicular sobre los espermatozoides en humanos, utilizando un modelo de la leucotaxis modificado en agarosa, medio HAM con HEPES y HSA (human seric albumin), y un amortiguador Baker. Hicieron 5 celdas de 7 mm (una central y una en cada esquina a 25 mm de distancia entre ellas), en platos de vidrio cubiertos con agarosa 0.8% en amortiguador Baker. Lavaron 2 veces a los espermatozoides en el medio HAM preparado hasta obtener una concentración espermática de 20×10^6 espermatozoides/ml. Quince microlitros de éste se colocaron en la celda central a igual volumen que los líquidos de su periferia: líquido folicular de folículos maduros o inmaduros, medio HAM, o agua deionizada como control. Los platos se incubaron a 37°C por 6 horas en una cámara húmeda con atmósfera controlada,

fijados con glutaraldehído y analizados al microscopio a un aumento de 400 X. Encontraron que las celdas control contenían de 0 – 468 células, las celdas con líquido folicular de folículos maduros contenían de 27 – 1,068 células y las celdas con medio HAM o con líquido folicular de folículos inmaduros contenían similar número de células (< de 30), es decir que el líquido folicular de folículos maduros ejercía quimioatracción sobre los espermatozoides.

En un estudio posterior, Villanueva et al. (1992) utilizaron un modelo de doble cámara, las cuales eran unidas por un capilar que contenía ácido hialurónico al 0.5% en medio HTF (human tubal fluid). Dejaron incubar el ácido en los capilares en una cámara con atmósfera controlada, durante 30 minutos para después agregar al capilar 15 μ l de espermatozoides lavados en HTF con una concentración espermática de 50×10^6 células/ml. Posteriormente agregaron simultáneamente los líquidos experimental (líquido folicular de folículos maduros) y control (HTF) en cada cámara y dejaron incubando a 37°C durante un tiempo que varió de 10 a 120 minutos en atmósfera controlada (5% CO₂, 95% aire). Después detuvieron el experimento colocando dos clamps en los capilares cercanos a las cámaras. Los líquidos recuperados se centrifugaron y las pastillas se suspendieron en 1 ml de HTF contando 10 μ l en el hemocitómetro.

Al líquido folicular también le determinaron su concentración de proteína total por el método Bradford y sus niveles hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2) por un método de radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo utilizando un kitt, y encontraron niveles hormonales de 232 ng/ml de E2, 10.2 μ g/ml de P4, y una concentración de proteína total de 125.6 mg/ml.

Sobre la quimiotaxis, encontraron que la máxima migración ocurrió en aquellos experimentos que utilizaron ácido hialurónico al 0.5%, ya que cerca del 50-55% de las células aplicadas alcanzaron la cámara experimental, y que esta migración disminuía a medida que la concentración del ácido se acercaba al 1%;

existiendo una relación lineal entre el número de células aplicadas y la tasa de migración, y un plateau de 70% de migración en el líquido folicular (450,000 células) a los 10 minutos de incubación, mismo que se mantuvo a medida que pasaba más tiempo de incubación contra el medio control que fue de 0-100,000 células.

En 1994, Cohen-Dayag et al. utilizaron un modelo de doble cámara consistente en dos cámaras de 9.8 mm de diámetro selladas, y conectadas entre sí por un tubo de 33 mm longitud x 2.8 mm diámetro. Trataron al líquido folicular para precipitación de sus proteínas con acetona al 90% y a la fracción resultante la designaron como el quimioatrayente. Las cámaras utilizadas fueron dos, a la primera le aplicaron 1 ml de espermatozoides suspendidos en medio BWW (Biggers, Whitten and Whittingham) en uno de sus compartimentos y 1 ml del medio control (BWW) en el otro compartimento, el tubo conector contenía BWW. A la segunda cámara la prepararon igual solo que en lugar de medio control, el segundo compartimento contenía al quimioatrayente. Incubaron durante 60 minutos a 21-24°C y después colectaron y centrifugaron las suspensiones de ambas cámaras, contando las células en el microscopio.

Observaron que más espermatozoides se encontraban en el segundo compartimento cuando contenía al quimioatrayente que cuando contenía al BWW, y que el número de espermatozoides migrados era mayor a los 15 minutos de incubación que a los 60 minutos.

Por último, en el mismo año Ralt et al. utilizaron un modelo a base de celdas de teflón y capilares de polietileno en un sistema multicapilar. Las celdas las llenaron con 100 µl de una concentración espermática de 20×10^6 espermatozoides/ml en medio BWW o en la solución de prueba (líquido folicular tratado para precipitación de proteínas con acetona al 90% y a diferentes diluciones). Los capilares los llenaron con BWW o con la solución de prueba y los

cerraron por uno de sus lados con un clamp. El lado abierto del capilar lo insertaron en cada celda y todo el armado lo incubaron 30 minutos a 37°C en cámara con atmósfera controlada. Después de la incubación vaciaron el contenido de cada capilar en tubos que contenían 8% de glutaraldehído en agua y los espermatozoides se contaron con el hemocitómetro. Para ellos, el hecho de que se concentraran más espermatozoides en el capilar cerca de su lado abierto (junto a las celdas con líquido folicular) que de su lado cerrado, significó quimiotaxis, quimiocinesis o atrapamiento; este último lo entendieron como un efecto negativo del líquido folicular en la movilidad del espermatozoide, o como un cambio en el comportamiento del nado en respuesta a un gradiente del químico.

También observaron que cuando las celdas y los capilares contenían líquido folicular, los espermatozoides en las celdas eran sensibles al gradiente descendiente del líquido folicular conforme se movían dentro del capilar, de modo que se acumulaba un menor número de ellos en el capilar que tenía este gradiente vs. el capilar que no contenía este gradiente de líquido folicular, y a esto le llamaron "quimiotaxis". Cuando tanto la celda como el capilar contenían líquido folicular, había más espermatozoides que alcanzaban el capilar que cuando ambos (celda y capilar) contenían BWW y a esto le llamaron "quimiocinesis". Con este modelo, determinaron que más espermatozoides migraban dentro del capilar que contenía líquido folicular diluido 3000 veces en BWW que en el capilar que contenía solo BWW y que la migración era cada vez mayor en la medida en que se incrementaba el tiempo de incubación de 20-100 minutos (200,000-1,500,000 células respectivamente).

En otra serie de experimentos, Ralt et al (1994) utilizaron una cámara sellada con una profundidad de 10 μm de modo que los espermatozoides pudieran nadar solo en dos dimensiones dentro del plano focal de un microscopio durante el tiempo de observación. La cámara contenía 4 celdas, a 2 de ellas opuestas entre sí las llenaron con espermatozoides lavados y a las otras 2 también opuestas

entre sí las llenaron, una con BWW y la otra con la solución de prueba. El comportamiento de los espermatozoides en esta cámara lo videograbaron dentro del primer minuto de haberla sellado y durante los siguientes 15 minutos, observando que había 2 veces más espermatozoides en la celda que contenía líquido folicular que en la que contenía BWW y que todos los espermatozoides en la cámara eran móviles.

Más adelante determinaron que al menos uno de los componentes quimiotácticos del líquido folicular era de un peso menor a los 10 kilodaltons. Luego, precipitando el líquido folicular con acetona examinaron la actividad quimiotáctica de la pastilla y del sobrenadante tras la evaporación de la acetona y vieron que solo el sobrenadante tenía esta actividad.

2.4. Origen, composición y funciones del líquido folicular

El líquido folicular se origina a partir de la sangre que circula por los vasos que rodean al folículo en desarrollo, extravasándose hasta formar y llenar el antro folicular. Entre este líquido y la vasculatura que rodea al folículo no existe contacto, ya que los vasos sanguíneos no penetran la teca interna del folículo, pero la permeabilidad de la barrera que separa el plasma sanguíneo del líquido folicular responde a estímulos gonadotrópicos (Shalgi et al. 1972b).

Sin embargo el líquido folicular no solamente es un trasudado de sangre, sino un complejo de componentes provenientes del suero y de secreciones sintetizadas por el folículo. La fisiología del ovario está controlada por muchos factores exógenos y endógenos, incluyendo los cambios hormonales que ocurren en el líquido folicular a lo largo del ciclo estral. Estos cambios en el líquido folicular influyen en la esteroidogénesis, la maduración del ovocito, la ovulación y el transporte del ovocito por el oviducto, así como en la preparación del folículo para la formación del cuerpo lúteo y su funcionalidad (Eissa, 1996). En equinos, se ha visto que el líquido folicular actúa suprimiendo transitoriamente la maduración del

ovocito (Hinrichs et al. 1995), mientras que en bovinos favorece la maduración de los ovocitos fertilizados in vitro cuando al medio que los mantiene se les agrega de 10 a 30% de líquido folicular (Kim et al. 1996).

Con respecto a sus componentes proteicos, se sabe que existe similitud entre las proteínas del plasma y las del líquido folicular (Shalgi et al. 1972; De Jong and Sharpe, 1976), y se ha visto que tienen influencia sobre los espermatozoides de animales domésticos; tal es el caso de la albúmina, la cual incrementa la movilidad de los espermatozoides en estudios in vitro. Esta albúmina puede obtenerse sintéticamente como es el caso de la albúmina sérica bovina (BSA) que se utiliza como un medio en el cual se mantiene a los espermatozoides en condiciones de laboratorio, y que se ha observado que funciona como un protector de la membrana acrosomal, incrementando la longevidad de los espermatozoides cuando es adicionada al semen de cerdo, toro, conejo, carnero y caballo (Harrison et al. 1978). En espermatozoides de pavo incrementa significativamente su movilidad (Bakst and Cecil, 1992). Al incluirla en las técnicas de laboratorio para la separación de espermatozoides móviles de bovino, la BSA (cuando está libre de ácidos grasos) sirve como seleccionador de los mejores espermatozoides, puesto que solo aquellos espermatozoides que poseen el precursor del colesterol "sulfato de colestril" (principal componente de la membrana plasmática que cubre al acrosoma) y que son morfológicamente normales, se unen a la BSA. Este sulfato de colestril es entonces un precursor del colesterol, que en presencia de albúmina, se une a ella durante la capacitación espermática, regulando la salida de colesterol de la membrana de los espermatozoides y favoreciendo el influjo de calcio. Además de que al permitir este cambio lipídico, estabiliza la membrana y reduce la fragilidad osmótica de los espermatozoides (Parent et al. 1997).

Otras sustancias presentes en el líquido folicular diferentes a la albúmina, pueden encontrarse relacionadas con este efecto de movilidad espermática, dado

que en este fluido se han encontrado concentraciones elevadas de sustancias que tienen funciones leucotácticas, angiogénicas y mitogénicas, que favorecen el aumento del número de células involucradas en la respuesta inmune, así como el incremento de su movilidad hacia el sitio de infección (Bryant et al. 1988).

Pero también en el líquido folicular pueden encontrarse sustancias que al ser aplicadas parenteralmente, actúan sobre el estímulo o la inhibición de la liberación de hormonas hipofisiarias; tal es el caso de la inhibina, que en cerdas está presente a concentraciones de 65 a 70 ng/ml en el líquido folicular (Biggs et al. 1993). Esta es una hormona glicoproteica producida por las células de la granulosa en el folículo y se encarga de suprimir la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) por la hipófisis anterior. Esto permite seleccionar al folículo preovulatorio dominante; a medida que se elevan los niveles de inhibina y estradiol y disminuyen las concentraciones de FSH. De este modo la inhibina limita el desarrollo continuo de los folículos más pequeños, los cuales se vuelven atrésicos (Badinga et al. 1992; Roser et al. 1994). De ahí que el líquido folicular sea utilizado en tratamientos que llevan la finalidad de suprimir a la FSH en bovinos (Ireland et al. 1983; Badinga et al. 1992) y en ratas (De Jong and Sharpe, 1976).

En ovinos, la aplicación intramuscular de líquido folicular equino (Zárate et al. 1996; Hernández et al. 1997) u ovino tratado para eliminar sus elementos esteroides, provoca una caída abrupta de los niveles de FSH séricos, que después de 60 horas se elevan por rebote junto con la hormona luteinizante (LH), esto es debido a que este líquido folicular contiene altas concentraciones de inhibina por lo que también disminuyen los niveles de ésta en suero, así como las concentraciones de testosterona, androstenediona y estradiol. Los niveles de estas tres últimas hormonas disminuyen a consecuencia de que la FSH está en concentraciones insuficientes para mantener la actividad de aromatización de los andrógenos efectuada por las células de la granulosa. Esto permite un retraso en

el inicio del estro (Baird et al. 1990; Henderson et al. 1986). Así, el líquido folicular equino evita la regresión prematura del cuerpo lúteo y retrasa la presentación del estro inducido con prostaglandina F₂ α en ovejas (Zárate, 1996; Hernández et al. 1997).

Sin embargo, la inhibina del líquido folicular no se ha evaluado en cuanto a su actividad sobre la movilidad de los espermatozoides.

Existen además otras proteínas en el líquido folicular como el péptido llamado IGF-I (insulin-like growth factor), que modula el crecimiento y función de las células de la granulosa y que está involucrado en el desarrollo de los folículos dominantes (Badinga et al. 1992); la proteína reguladora del folículo (FRP), que funciona como inhibidora de su crecimiento en ratas y monos; y el factor epidermal de crecimiento, que inhibe la acción de la FSH y la LH en las células del ovario, con lo cual se impide la secreción hormonal y el crecimiento del folículo (Baird et al. 1990).

Otros compuestos no esteroideos presentes en este líquido son factores inhibidores, como la folistatina inhibidora del desarrollo folicular, el inhibidor de la maduración del ovocito, los inhibidores de la luteinización, y el inhibidor del receptor de unión de la FSH; todos ellos importantes en la regulación de la función reproductiva (Henderson et al. 1986; Zárate, 1996). También existen factores activadores como la activina (Zárate, 1996), y otros compuestos no proteicos como los electrolitos (sodio, potasio y cloro), los cuales se encuentran en concentraciones similares a las de las soluciones salinas fisiológicas (Shalgi et al. 1972a).

Con respecto a la actividad que el líquido folicular ejerce sobre los espermatozoides, en porcinos se ha observado que éste sirve como un medio del cual dependen la tasa de penetración espermática y el número de

espermatozoides presentes en los ovocitos penetrados (Funahashi and Day, 1993). Estos autores encontraron que al agregar líquido folicular a un medio de incubación de gametos para fertilización in vitro, el número de espermatozoides que se unía a la zona pelúcida del ovocito de cerda, disminuía. Es decir que el líquido folicular reducía la incidencia de polispermia al adicionar de 0.1 a 1% de este líquido a un medio para fertilización in vitro; aunque no señalan la razón por la cual ocurre esto.

Siegel y Graczykowski (1991), encontraron que el líquido folicular de folículos preovulatorios de cerda, incrementaba la tasa de penetración de espermatozoides humanos en el ovocito de hámster.

Otras funciones del líquido folicular sobre los espermatozoides incluyen el aumento de su movilidad (Lee et al. 1992) y de su consumo de oxígeno (Beck et al. 1976), la quimiotaxis (Villanueva et al. 1990; Villanueva et al. 1992; Cohen-Dayag et al. 1994; Ralt et al. 1994; Lee et al. 1994) y la quimiocinesis (Ralt et al. 1994).

2.5. Hormonas del líquido folicular

Estudios efectuados en bovinos demuestran que las concentraciones relativas de esteroides y gonadotropinas del líquido folicular varían ampliamente entre folículos, y que el medio ambiente intrafolicular de esteroides y gonadotropinas puede ser un importante regulador del desarrollo folicular (Henderson et al. 1982).

Conforme el tamaño del folículo se incrementa, el medio ambiente del líquido folicular cambia de ser predominantemente androgénico a ser predominantemente estrogénico, siendo la principal hormona presente el 17β - estradiol formado a partir de la aromatización de andrógenos, función que es llevada a cabo por las células de la granulosa tras un estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH)

(Henderson et al. 1982). Esta hormona se encuentra a concentraciones de 0.39 $\mu\text{g/ml}$ en folículos preovulatorios de humano (Lobo et al. 1985), a concentraciones de 25 a 32 ng/ml en el líquido folicular de folículos preovulatorios de cerda (Biggs et al. 1993), y a concentraciones de 242.6 ng/ml en el líquido folicular de folículos preovulatorios de yegua (Bergfelt and Ginther, 1986).

Otra hormona importante presente en el líquido folicular es la progesterona (P4) (Henderson et al. 1982), que en humanos se encuentra a concentraciones de 12.8 $\mu\text{g/ml}$ en el líquido de folículos preovulatorios (Lobo et al. 1985), en vacas a concentraciones de 86.7 ng/ml también en el líquido de folículos preovulatorios (Silván et al. 1993), y en yeguas de raza Pony a concentraciones de 86.1 ng/ml en el líquido de folículos de diferente tamaño (Bergfelt and Ginther, 1986).

Sin embargo, otros autores han encontrado concentraciones de estas hormonas esteroideas diferentes a las anteriormente descritas; por ejemplo Gentry et al. (1996) encontraron en equinos una hormona de naturaleza proteica presente en el líquido folicular de folículos preovulatorios (entre 3 y 6 cm de diámetro) llamada fibronectina, la cual era sintetizada por las células de la granulosa de estos folículos, y cuyas concentraciones se correlacionaban con el tamaño de los folículos y con los niveles de estradiol de los mismos. Esto es que a medida que se elevan las concentraciones de fibronectina, se promueve el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa. Por consiguiente, al aumentar el número de estas células y desarrollarse el folículo, también ocurre un incremento en los niveles de E2 que va de los 180 ng/ml (folículos de 3 a 3.9 cm de diámetro) a los 330 ng/ml (folículos de 4 a 6 cm de diámetro). En cambio, los niveles de P4 del líquido folicular permanecen intactos (40 a 70 ng/ml), ya que no existe una correlación de esta proteína con la P4; lo cual confirma que el estradiol es la hormona predominante en el líquido folicular de los folículos preovulatorios.

Por su parte, Schmid et al. (1998) encontraron concentraciones de P4 de 250 a 1200 ng/ml en el líquido folicular de folículos preovulatorios de yegua mayores a 35 mm de diámetro, que contribuían a la maduración del ovocito.

Una hormona más del líquido folicular es la testosterona, que se encuentra a concentraciones de 4.7 ng/ml en el líquido folicular de folículos preovulatorios en humano (Lobo et al. 1985), y a concentraciones de 32 a 61 ng/ml en el líquido de folículos preovulatorios de cerda (Biggs et al. 1993).

Con respecto a la actividad del estradiol y la progesterona sobre los espermatozoides, se ha visto que el E2 se relaciona con el consumo de oxígeno y la producción de lactato del espermatozoide humano (Beck et al. 1976), y con el incremento de la penetración espermática en la prueba de ovocito de hámster (Chan et al. 1983); mientras que la P4 tiene una función primordial sobre la capacitación de los espermatozoides del ser humano. Esta acción está dada por su capacidad para inducir la reacción acrosomal al favorecer una rápida entrada de calcio en el espermatozoide, y por consiguiente un incremento de calcio intracelular (Osman et al. 1989, Blackmore and Lattanzio, 1991). En ratones se ha observado que el calcio provoca la capacitación in vitro del espermatozoide y que el consumo de éste ocurre en la cabeza del mismo. Sus funciones son: incrementar la movilidad del espermatozoide, dar lugar a la excitosis del acrosoma, estimular la actividad de la acrosina durante la reacción acrosomal, y favorecer la fertilización (Osman et al. 1989, Adeoya-Osiguwa and Fraser, 1993; Moos et al. 1993).

Sin embargo, Castañeda et al. (1996) evaluaron el efecto de la adición de 5mg de P4 al semen de cerdo antes de congelarlo o después de descongelarlo sobre la morfología acrosomal, la movilidad de los espermatozoides, y la fertilidad posterior a la inseminación artificial; encontrando que esta hormona no afectaba

los valores de tales características ni al ser adicionada al semen antes de congelarlo, ni al adicionarla después de descongelarlo.

Aún así, otros autores han encontrado que la progesterona tiene sus sitios de unión en la superficie del espermatozoide, que regulan la entrada de calcio al interior del mismo, lo cual influye en la reacción acrosomal. Esto sugiere la ocurrencia de cambios en la membrana del espermatozoide que intervienen en la fertilización (Osman et al. 1989; Blackmore et al. 1990).

Blackmore y Lattanzio (1991) demostraron que estos receptores de superficie únicos para la P4, exhiben una especificidad esteroidea poco usual, ya que al utilizar potentes antiprogestágenos (RU38486 y ZK98.299) resultó inefectiva la inhibición de los efectos de la progesterona y que los progestágenos sintéticos como el megestrol, acetato de medroxiprogesterona, norgestrol, noretinodrol, noretindrona, R5020 y el acetato de ciproterona, fueron débiles estimuladores del incremento de las concentraciones de calcio.

Además de su función sobre la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides in vitro a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Morales et al. 1992), la P4 también estimula la hiperactivación de la movilidad de los espermatozoides a concentraciones de 3.1 ng/ml (Uhler et al. 1992), y estimula la quimiotaxis a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Villanueva et al. 1995).

Esta hiperactivación de la movilidad espermática se manifiesta como la pérdida de la linealidad en el desplazamiento de los espermatozoides y se asocia con cambios específicos como son el incremento en la velocidad curvilínea (VCL), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la amplitud de la frecuencia de batido del flagelo (BCF), mismos que pueden ser medidos con la ayuda de analizadores seminales como el Hamilton-Thorn (Zhu et al. 1994). La quimiotaxis se manifiesta como el cambio en la dirección en la que se mueven los

espermatozoides y que los acerca a un gradiente del atrayente o los aleja de un repelente (Ralt et al. 1994)

A diferencia de la P4, el estradiol, a concentraciones de 1.156 pg/ml actúa como quimiocinético sobre los espermatozoides (Villanueva et al. 1995), es decir que solo modifica la velocidad a la que se mueven los espermatozoides (Ralt et al. 1994), pero sin atraerlos hacia dicha hormona. La testosterona, otra hormona presente en el líquido folicular, parece tener una actividad de inhibición de la migración espermática a concentraciones de 900 pg/ml en estudios in vitro (Villanueva et al. 1995).

2.6. Actividad quimiotáctica del líquido folicular

En estudios efectuados en humanos, recientemente se ha encontrado que el líquido folicular de ovocitos maduros posee actividad quimiotáctica (Villanueva et al. 1990). De hecho esta parece ser la primer evidencia de la existencia de señales de quimioatracción en el líquido folicular de mamíferos superiores. Los mismos autores mencionan que ciertas sustancias aisladas del líquido folicular de humano pueden tener una función de quimioatracción hacia las células germinales masculinas, y que la variabilidad en la respuesta de estas células a los quimioatrayentes puede deberse a diferencias en la concentración de las sustancias quimiotácticas en el líquido folicular. También señalan que es probable que ciertos pasos en la capacitación del espermatozoide, que normalmente ocurren en el aparato genital femenino, sean necesarios para que el espermatozoide logre expresar su capacidad de respuesta hacia un quimioatrayente.

En dicho estudio, Villanueva et al. (1990) utilizaron un modelo de la leucotaxis modificado mediante un método que utiliza agarosa, en donde mostraron que existía una gran variabilidad en la tasa de migración de los espermatozoides hacia el líquido folicular. En un segundo estudio, Villanueva et al.

(1992) llevaron a cabo una variación del modelo utilizado anteriormente, desarrollando un modelo de doble cámara que utilizaba ácido hialurónico y líquido folicular para estudiar la migración del espermatozoide. Encontraron una relación lineal entre el número de células incorporadas en el ensayo y la tasa de migración, sugiriendo que la habilidad a la respuesta de una señal química no se limitaba a un cierto número de células, sino que era una característica común a la mayoría de los espermatozoides presentes en el semen. También fue evidente que el tiempo de respuesta a los efectos del líquido folicular era corto, lo que podía indicar la existencia de mecanismos de transducción de la señal similares a los de otros quimioatrayentes.

Además mencionan que existe la posibilidad de que la capacitación de los espermatozoides ocurra durante la migración en el ácido hialurónico, y ponen a consideración el modelo utilizado, no solo para el estudio de la quimiotaxis en gametos humanos, sino también en otras especies en las cuales este fenómeno no ha sido suficientemente evaluado.

Cohen-Dayag et al. (1994) también han corroborado que el espermatozoide tiene atracción por el líquido folicular, pero que solo una pequeña fracción de la población espermática responde a dicha atracción, y que la respuesta cambia con el tiempo, de tal manera que unos espermatozoides pierden su respuesta mientras que otros la van adquiriendo. Aunque desconocen el significado fisiológico de esta respuesta, suponen que el papel de la atracción es el de seleccionar al espermatozoide que sea capaz de fertilizar al ovocito; así, solo el espermatozoide capacitado tendrá la habilidad de ser atraído por sustancias secretadas por el ovocito o las células que lo rodean.

Ralt et al. (1994) por su parte, mostraron que el líquido folicular estimulaba las actividades quimiotácticas y quimiocinéticas de los espermatozoides de humano y la hiperactivación de su movilidad. Señalan que tales actividades se

debían a la presencia en este líquido de péptidos menores de 10 kilodaltons, pero que hubo una serie de factores que no les permitieron determinar de manera específica los fenómenos de quimiotaxis y quimíocinesis, siendo la principal dificultad que solo una pequeña fracción de la población espermática respondía en estos experimentos.

Lee et al (1992) evaluaron líquido folicular porcino y purificaron un estimulador de la movilidad espermática que correspondía a una glicoproteína de peso molecular de 52,000 cuya secuencia aminoácido N-terminal era similar a la de la Antitrombina III del humano, equino y bovino.

Dos años más tarde los mismos autores encontraron que tanto el líquido folicular como el plasma sanguíneo del porcino exhibían un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides. En un modelo consistente en la utilización de cámaras de quimiotaxis que tenían una cámara superior y otra inferior separadas por una membrana o filtro de policarbonato, aplicaron la proteína en medio PBS (Phosphate Buffer Saline) en la cámara inferior y una suspensión de 3 millones de espermatozoides en la cámara superior. Los espermatozoides migraron hacia la proteína al incubar las cámaras durante 15 minutos a temperatura ambiente (Lee et al. 1994).

En conclusión, la quimiotaxis es un fenómeno que parece garantizar la llegada de un número adecuado de espermatozoides al sitio de la fertilización y asegurar la posibilidad de contacto entre los gametos. En las especies inferiores la quimiotaxis entre los gametos es mediada por sustancias de naturaleza peptídica, pero aún cuando en algunas especies superiores se han detectado proteínas con una actividad similar; las evidencias que se han presentado en el modelo de la fertilización humana apuntan hacia los esteroides presentes en el líquido folicular, como los moduladores de esta respuesta, y de hecho parece ser que la P4 no solamente se encuentra actuando como efector de la reacción acrosomal, sino

que también podría intervenir en el fenómeno de la atracción química. Esto plantea la posibilidad de que en otras especies en la escala evolutiva se expresen los mismos mecanismos de atracción química entre los gametos, lo cual hasta el momento no ha sido completamente demostrado. Entre los equinodermos y los mamíferos pudiera haber existido algún cambio en la forma de señalización que trajera a los esteroides sexuales al terreno de la quimioatracción y de ser cierto esto entonces sería factible demostrar que en otras especies de mamíferos el encuentro de los gametos se favorece por la acción de los esteroides del líquido folicular.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Obtención del Líquido Folicular.

La obtención del líquido folicular se realizó colectando ovarios de yeguas sacrificadas en el rastro "5 de Junio" ubicado en San Vicente Chicoloapan en el km. 29 de la carretera México – Texcoco. No se tomaron en cuenta ni la raza ni la edad de las yeguas sacrificadas, siendo el único criterio de selección, la presencia de folículos mayores a 35 mm de diámetro, que se sabe corresponden al tamaño de los folículos preovulatorios (Ginther and Bergfelt, 1993).

De acuerdo con lo anterior, se midió el tamaño de los folículos de cada ovario, colectando el líquido de aquellos folículos mayores a 35 mm de diámetro, ya que según señalan Ginther y Bergfelt (1993) este tamaño corresponde al de los folículos preovulatorios. La obtención del líquido se realizó utilizando jeringas de 20 ml con aguja. Los líquidos de cada folículo fueron colectados en un frasco de plástico estéril. Estos líquidos se dejaron sedimentar después de su obtención, y el sobrenadante se aspiró con jeringas sin aguja descartando la porción sedimentada. Para su transporte al laboratorio, los líquidos foliculares se mantuvieron a 4°C.

Una vez en el laboratorio se procedió a centrifugar los líquidos a 1500 x g durante 20 minutos, recuperando el sobrenadante y descartando el sedimento.

Posteriormente se agregaron 100 UI/ml de penicilina G y 50 UI/ml de sulfato de estreptomicina a los líquidos y después se separaron en alícuotas de 5 a 8 ml en tubos de colección que se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso posterior.

Los tratamientos efectuados a este líquido folicular, fueron diferentes para cada experimento, por lo que se especifican en la sección 4 de esta tesis correspondiente a los trabajos experimentales.

3.2. Obtención de Eyaculados.

Se utilizaron cuatro sementales, uno cruza de Cuarto de Milla con Español y los otros raza Cuarto de Milla, pertenecientes al Agrupamiento a Caballo de la Secretaría de Seguridad Pública del Distrito Federal, ubicado en la Delegación Iztapalapa.

Para el primer experimento se obtuvieron 8 eyaculados, para el segundo experimento 4, y para el tercer experimento solamente se obtuvo un eyaculado, es decir que en total se utilizaron 13 eyaculados de los diferentes caballos en los ensayos de quimiotaxis.

La obtención de las muestras de semen se efectuó durante los meses de marzo a julio para el primer y segundo experimento, y en noviembre para el tercer experimento. Esta recolección se efectuó por las mañanas, siguiendo las recomendaciones de Blanchard y Varner (1996a, 1996b), utilizando una vagina artificial tipo Hanover, con una temperatura interior de 42°C al momento de la obtención de los eyaculados. Se utilizó un filtro en el frasco colector, para separar y descartar la porción gelatinosa. La lubricación del interior de la vagina artificial se efectuó con carboximetil celulosa.

Para las montas se utilizaron hembras en estro las cuales eran receladas por los mismos sementales que se muestrearon.

Posterior a la toma de las muestras, se determinaron las características macroscópicas del semen libre de gel, tales como volumen y color. Acto seguido se tomaron 5 ml de eyaculado que se diluyeron 1:1 (v:v) en otros 5 ml de medio

HTF (Human Tubal Fluid) sin albúmina y se transportaron en baño María al laboratorio manteniendo su temperatura a 37°C. El resto del eyaculado se desechó.

3.3. Evaluación del Semen.

En el laboratorio se tomó una alícuota de 13.5 µl de semen diluido en HTF que se evaluó en un analizador seminal Hamilton-Thorn IVOS 2000 (Burns and Reasner, 1995), para determinar algunas características microscópicas tales como concentración espermática, movilidad y movilidad progresiva (Jasko et al. 1991).

Después se tomó 1 ml de semen diluido y se suspendió en 1 ml de medio HTF-HSA (Human Serum Albumin) al 7.5% (1:1/v:v) para un primer lavado. Se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos descartando el sobrenadante para resuspender la pastilla en 1 ml del mismo medio para un segundo lavado; después se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo descartándose el sobrenadante.

Estas muestras de semen equino no fueron sometidas a técnicas para la selección de espermatozoides móviles o capacitados, como son la técnica del Swim up (Berger et al. 1985), o las técnicas de columnas de fibra de vidrio o Sephadex (Casey et al. 1991), sino que solo fueron sometidas a dos lavados en medio HTF-HSA al 7.5%.

De este modo solamente se consideró la concentración espermática inicial determinada por el analizador seminal, y con base en ella se agregó el medio a la pastilla de espermatozoides de acuerdo a la siguiente fórmula despejada:

$$V2 = C1V1/C2$$

Donde:

V2 = volumen requerido

C1 = concentración espermática original

V1 = volumen original

C2 = concentración espermática requerida (50×10^6 espermatozoides/ml)

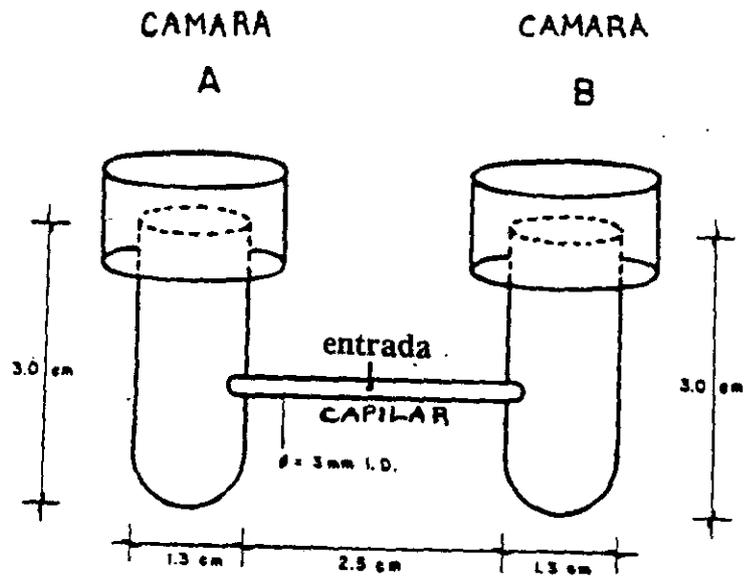
Por lo cual se resuspendió la pastilla en tanto medio HTF-HSA como fuera necesario para aproximar la concentración espermática a 50×10^6 espermatozoides/ml. Después se tomaron 13.5 μ l de la muestra para reevaluar la concentración; si se acercaba a 50×10^6 espermatozoides/ml se continuaba el ensayo, si era mucho mayor a ésta se agregaba más medio a la pastilla según la fórmula anterior, y si era menor se recentrifugaba a 400 x g durante 5 minutos.

3.4. Preparación de las Cámaras de Quimiotaxis.

La quimiotaxis de los espermatozoides se evaluó con base en la metodología descrita por Villanueva et al. (1992). El modelo de doble cámara se diseñó utilizando dos tubos de fondo redondeado de plástico policarbonato, cuyas dimensiones eran 12 x 25 mm conectados mediante un capilar no tóxico. Al capilar se le hizo un agujero de 0.2 mm a igual distancia de las cámaras (Esquema 1). Las cámaras y los capilares se designaron con las letras A, B y C respectivamente, de tal forma que en las cámaras A se colocaran los líquidos experimentales y en las B los medios control negativo, mientras que en los capilares se colocaron los espermatozoides. Cabe señalar que la selección de las que serían cámaras A fue variable, es decir que una cámara A podría ser después una cámara B, ya que estas cámaras no se marcaron de ninguna manera, solo se marcaron las gradillas en que se colocaron.

Las cámaras de quimiotaxis fueron lavadas exhaustivamente con agua deionizada antes de ser utilizadas. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se colocaron en sus gradillas correspondientes.

Esquema 1. Modelo de doble cámara para el estudio de la quimiotaxis de los espermatozoides. Cámara A = líquidos experimentales, Cámara B = medio control negativo (Villanueva et al. 1992)



4. TRABAJOS EXPERIMENTALES

Esta tesis consta de tres experimentos de quimiotaxis. El primer experimento sirvió para determinar la actividad quimiotáctica del líquido folicular de yegua y los experimentos 2 y 3 trataron de determinar algunas propiedades físico-químicas del agente quimioatrayente del líquido folicular de yegua. Se especifican los objetivos, hipótesis, y los diferentes tratamientos efectuados a los líquidos foliculares para cada experimento, así como la metodología específica seguida para los ensayos de quimiotaxis de cada experimento, sus resultados y discusión.

4.1. EXPERIMENTO 1.

Evaluación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de caballo hacia el líquido folicular crudo de yegua

4.1.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el líquido folicular ejerce una actividad quimiotáctica sobre los espermatozoides en la especie equina.

4.1.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

Evaluar el porcentaje de espermatozoides que migra hacia el líquido folicular, y hacia el medio control negativo (HTF-HSA 7.5%).

4.1.2. HIPOTESIS.

El número (%) de espermatozoides que migran hacia las cámaras con líquido folicular, excede al número (%) de espermatozoides que migran hacia las cámaras con líquido control, después de incubarlos por X tiempo a temperatura ambiente.

4.1.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.

Considerando que en este experimento solo se pretendía evaluar la presencia o ausencia de actividad quimiotáctica del líquido folicular sobre los espermatozoides, no se le dio mayor tratamiento a este líquido que el ya mencionado en la sección 3.1 de esta tesis.

4.1.2.2. Ensayos de Quimiotaxis.

En este experimento se utilizaron 8 eyaculados de dos diferentes caballos. Para el primer eyaculado obtenido, se efectuaron 5 repeticiones, mientras que en el segundo, tercer y cuarto eyaculados obtenidos para este experimento, se efectuaron 7 repeticiones haciendo un total de 26 ensayos. Para el quinto eyaculado se efectuaron 8 repeticiones, mientras que en el sexto, séptimo y octavo eyaculados se efectuaron 7 repeticiones haciendo un total de 29 ensayos, (26 + 29 = 55 ensayos).

Las cámaras se prepararon siguiendo la metodología descrita por Villanueva et al. (1992) saturando los capilares con 130 μ l de ácido hialurónico al 0.05% en medio HTF, mismos que se designaron con la letra C. Posteriormente se llenaron simultáneamente las cámaras experimental y control negativo (A y B) con 1 ml de líquido folicular crudo de yegua y 1 ml de HTF-HSA al 7.5% respectivamente, dejándolas 10 minutos en reposo a temperatura ambiente para que se formara un gradiente de los líquidos. Después de este tiempo se retiraron 10 μ l de cada capilar sustituyéndolos con otros 10 μ l de la muestra de semen lavado de caballo, cuya concentración espermática era de aproximadamente 500,000 células. Las cámaras se dejaron incubando a 37°C.

Debido a que en este experimento no se controló el tiempo de incubación que se dejó a cada cámara de quimiotaxis para que ocurriera la migración de los espermatozoides, hubo una variación en cuanto a este factor que sin embargo fue evaluada dentro de los resultados de quimiotaxis; incluyéndose para determinar si existía algún efecto del tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis, sobre la respuesta quimiotáctica, agrupándose como se señala a continuación:

T1 = 21 cámaras incubadas 15 minutos

T2 = 22 cámaras incubadas 20 minutos

T3 = 7 cámaras incubadas 25 minutos

T4 = 5 cámaras incubadas 30 minutos

De este modo, se evaluaron en total 55 ensayos de quimiotaxis.

Después del período de incubación, los líquidos de las cámaras y de los capilares fueron aspirados y transferidos a tubos de 12 x 75 mm, para centrifugarlos a 1500 x g durante 8 minutos. Los pellets de espermatozoides se resuspendieron en 0.3 ml de HTF-HSA y las cuentas de espermatozoides se efectuaron en alícuotas de 10 μ l en un hemocitómetro.

Para obtener los porcentajes de migración y no migración, se sumó el número de espermatozoides contados en las cámaras A y B, y en los capilares C (A + B + C).

Después, el número de espermatozoides encontrados en A se multiplicó por 100% y se dividió entre el total anteriormente obtenido. Lo mismo se hizo con el número de espermatozoides encontrados en B y con aquellos encontrados en C. Entendiéndose como porcentaje de migración, al porcentaje de espermatozoides migrados en A o en B, y como porcentaje de no migración, al porcentaje de espermatozoides que permanecieron en los capilares C.

Además, se calculó el total de espermatozoides que migraron, sumando solamente el número de espermatozoides encontrados en las cámaras A y B (a este resultado se le llamará en lo sucesivo migración total o MT). A partir de ésta, se obtuvo el porcentaje de migración específica, multiplicando el número de células encontradas en la cámara A por 100% y luego dividiéndolo entre la migración total. La migración no específica se obtuvo multiplicando el número de

células encontradas en la cámara B por 100% y luego dividiéndolo entre la migración total.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando un análisis de varianza (Steel and Torrie, 1980), cuyo modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + \delta(i) + T_j + CT_{ij} + E(ij)_k$$

Donde:

Y_{ijk} = k-ésima respuesta aleatoria de migración transformada a la raíz cuadrada asociada al j-ésimo tiempo de incubación (T_j), al i-ésimo ensayo (C_i), y a la interacción entre ambos (CT_{ij}); μ representa la media poblacional, $\delta(i)$ es el error de restricción debido a la aleatorización NID ($0, \sigma^2\delta$), y $E(ij)_k$ es el error aleatorio NID ($0, \sigma^2$).

4.1.3. RESULTADOS.

La concentración espermática y la movilidad progresiva de las muestras de semen obtenidas de los sementales fueron $139 \pm 59.6 \times 10^6$ espermatozoides/ml y $65.6 \pm 4\%$ respectivamente. El coeficiente de variación de la movilidad progresiva de los espermatozoides de los 8 eyaculados fue de 6.1%.

De un total de 55 ensayos, en 51 de ellos los espermatozoides migraron hacia las cámaras A o B (92.7%). Cuatro ensayos (7.2%) se descartaron porque no ocurrió migración hacia el líquido folicular ni hacia el medio control; en estos ensayos los espermatozoides permanecieron en los tubos capilares. En 48 ensayos de 51 (94%) en donde sí hubo migración, hubo una diferencia cuatro a seis veces mayor en el porcentaje de espermatozoides migrados hacia el líquido folicular, y solo en tres ensayos el porcentaje de espermatozoides migrados fue

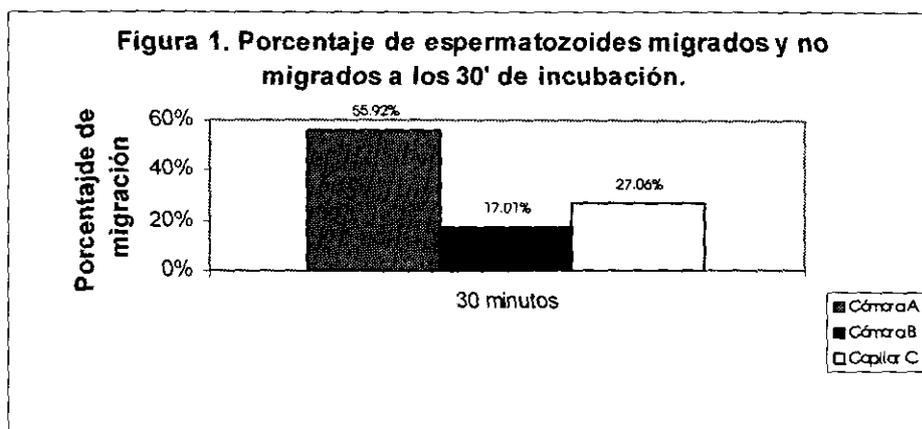
mayor o igual en las cámaras con medio control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

En el cuadro 1, se muestran los datos del porcentaje de espermatozoides migrados hacia las cámaras con líquido folicular o hacia el medio o control negativo, y de los no migrados que permanecieron en el capilar. La figura 1 muestra estos porcentajes después de 30 minutos de incubación de las cámaras, y para un total de 5 ensayos. Existió diferencia significativa ($p < 0.01$) en el porcentaje de espermatozoides migrados hacia las cámaras con líquido folicular crudo de yegua ($55.92 \pm 14.67\%$, Media \pm DE) y las cámaras con medio control ($17.01 \pm 17.48\%$). La barra blanca representa el porcentaje de espermatozoides que no migraron ($27.06 \pm 16.12\%$).

Cuadro 1. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados en base al tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis.

Núm. Ensayos	T. incubación	Cámara A	Cámara B	Capilar C
21	15 minutos	48.93 a	9.4 b	41.67 a
22	20 minutos	45.84 a	8.3 b	45.86 a
7	25 minutos	43.24 a	6.33 b	50.43 a
5	30 minutos	55.92 a	17.01 b	27.06 c

Literales diferentes entre columnas y entre renglones (abc), representan diferencias estadísticas significativas $p < 0.01$



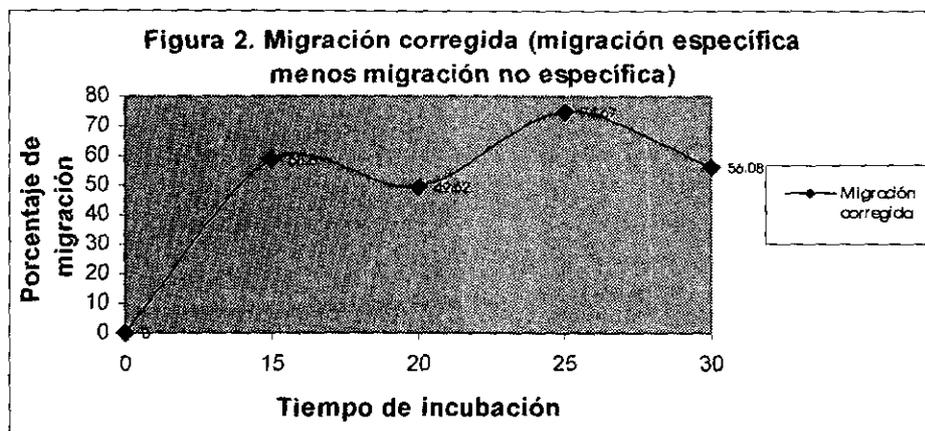
El cuadro 2 presenta los resultados de migración específica hacia el líquido experimental y la migración no específica hacia el medio o control negativo. Se observa que siempre fue mayor el porcentaje de espermatozoides migrados hacia el líquido folicular que hacia el medio control con diferencias significativas ($p < 0.01$). Presentándose una mayor migración a los 25 minutos (87.33%), pero que no fue diferente significativamente ($p > 0.01$) de los 15 y 30 minutos de incubación de las cámaras (74.54 y 78.04% respectivamente). El menor porcentaje fue para un tiempo de incubación de 20 minutos (65.72%), que fue diferente significativamente de los anteriores ($p < 0.01$).

Cuadro 2. Porcentajes de migración específica y no específica en base al tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis.

Tiempo de incubación	Cámara A	Cámara B
15 minutos	74.54 a	15.94 c
20 minutos	65.72 b	16.10 c
25 minutos	87.33 a	12.66 c
30 minutos	78.04 a	21.96 c

Literales diferentes entre columnas y entre renglones (abc), representan diferencias estadísticas significativas $p < 0.01$

En la figura 2, se señala la migración corregida (migración específica menos migración no específica) en relación al tiempo de incubación. Como puede observarse en esta figura, se alcanza un plateau después de 15 minutos de incubación.



4.1.4. DISCUSION.

Estos experimentos fueron llevados a cabo con medio HTF-HSA el cual después de repetidas pruebas, se encontró que era aceptable para mantener la movilidad de los espermatozoides en el estudio de la migración dirigida. De hecho, la movilidad de los espermatozoides de los dos sementales utilizados para este experimento in vitro fue similar a la reportada en una publicación previa por Malmgren et al. (1994).

La estandarización de los métodos para el estudio de la quimiotaxis en el líquido folicular de yegua dio lugar a resultados similares a los encontrados por Villanueva et al. (1992) en términos del número de células que responden al quimioatrayente. Aproximadamente el 60% de las células aplicadas a los tubos capilares migran desde su origen hacia las cámaras y cerca de un 88% lo hace hacia la cámara con líquido folicular. Es interesante notar que en estos ensayos se utilizaron muestras de semen de equino, que no fueron sujetas a procedimientos de selección de espermatozoides móviles o capacitados tales como el Swim up (Berger et al. 1985), o las técnicas de columnas de fibra de vidrio o Sephadex (Casey et al. 1991), lo cual demuestra que todos los espermatozoides del eyaculado de los sementales tienen el potencial para responder a las señales químicas derivadas del líquido folicular. Esto difiere un poco de lo informado por Cohen-Dayag et al. (1994), quienes establecieron que en el humano la habilidad de los espermatozoides para responder al quimioatrayente es adquirida gradualmente, y que solo los espermatozoides capacitados son capaces de responder a él.

Sin embargo en este experimento, una proporción de los espermatozoides aplicados a los ensayos de quimiotaxis no migró del capilar, lo cual podría significar que a pesar de que todos los espermatozoides tengan un potencial para responder al quimioatrayente, existan ciertos eventos que deban ocurrir estrictamente en el aparato genital de la hembra, que impliquen la capacitación de

los mismos (Parrish et al. 1989), y que sí sean necesarios para que un mayor número de espermatozoides expresen su capacidad de respuesta al quimioatrayente, como señalan Villanueva et al. (1990). Pero aquí también cabe mencionar que al no haberse seleccionado a los espermatozoides móviles ni capacitados, es probable que se introdujeran espermatozoides inmóviles o muertos en los ensayos, y de ahí los relativamente elevados porcentajes de espermatozoides que no migraron.

Respecto a los siete ensayos en los que no hubo migración porque el número total de células aplicadas permaneció en el capilar, es probable que dado que las cámaras de quimiotaxis fueron diseñadas en el laboratorio y que no se encontraban perfectamente selladas, se formaran burbujas de aire dentro del tubo capilar, lo cual formó una barrera para la migración.

Los resultados de migración específica y no específica concuerdan con lo encontrado por Ralt et al (1994), quienes trabajando con líquido folicular humano, revelaron un cambio direccional frecuente de algunos espermatozoides hacia el líquido, mientras que unos pocos lo hacían hacia la celda control que contenía medio BWW, durante un período de incubación de las cámaras de 30 minutos. También encontraron que el tiempo en el que mantuvieron incubando los espermatozoides antes de introducirlos en los ensayos de quimiotaxis, influía en la concentración de estas células en las cámaras experimentales, de manera que a mayor tiempo de incubación, mayor concentración espermática en los líquidos foliculares evaluados.

En este experimento se observó que a pesar del tiempo de incubación de las cámaras de quimiotaxis, la respuesta migratoria hacia el líquido folicular crudo de yegua, fue la misma para casi todos los tiempos de incubación manejados excepto para un tiempo de 20 minutos.

Mediante estos ensayos fue posible mostrar por primera ocasión que el líquido folicular crudo de yegua ejerce quimioatracción sobre los espermatozoides de caballo independientemente del tiempo en que se incuben las cámaras de quimiotaxis, pero se requiere efectuar más experimentos sobre el líquido folicular equino analizando la molécula o moléculas responsables de los efectos quimiotácticos, y su aplicación en las técnicas de fertilización in vitro de esta especie. Así mismo, el modelo experimental originalmente descrito en un estudio sobre la migración dirigida en humanos, puede también ser utilizado para investigar la presencia de quimioatrayentes específicos en el líquido folicular equino.

4.2. EXPERIMENTO 2

Efectos de la desnaturalización, hidrólisis por tripsina, extracción lipídica y dializado, sobre las propiedades quimiotácticas del líquido folicular de yegua hacia los espermatozoides de caballo.

4.2.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar algunas propiedades físico-químicas del quimioatrayente del líquido folicular de yegua.

4.2.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la actividad quimiotáctica presente en la fracción de lípidos del líquido folicular.

2. Evaluar la actividad quimiotáctica presente en el líquido folicular desnaturalizado por calor o por tripsina.

3. Evaluar la actividad quimiotáctica presente en el dializado del líquido folicular.

4. Comparar la actividad quimiotáctica de los líquidos tratados, con la actividad quimiotáctica del líquido folicular crudo.

4.2.2. HIPOTESIS.

1. Si el componente quimiotáctico del líquido folicular es de naturaleza esteroide como sucede en los humanos, entonces se esperaría que la actividad quimiotáctica de la fracción lipídica del líquido folicular, fuera similar o superior a la del líquido folicular crudo.

2. De igual modo se esperaría que existiera actividad quimiotáctica en los líquidos desnaturalizados por calor o por tripsina.

3. De ser así, se esperaría que esta actividad fuera inferior a la del líquido folicular crudo o que no existiera, en los líquidos que conservan su fracción proteica (dializado).

4.2.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.

Para determinar la naturaleza química del quimioatrayente presente en el líquido folicular de yegua, en este experimento los líquidos foliculares se sometieron a los siguientes tratamientos:

LFlip. Obtención del extracto lipídico con acetona y cloroformo.

Se tomó una alícuota de 30 ml de líquido folicular crudo que se descongeló en baño María a 37°C.

Siguiendo la metodología descrita por Villanueva et al. (1995), se prepararon 150 ml de una mezcla de cloroformo y acetona en una relación 1:1/v.v. Los 30 ml de líquido folicular se separaron en dos alícuotas de 15 ml cada una, y en ellas se agregó a partes iguales la mezcla anterior. Posteriormente se agitaron en vortex por 5 minutos para luego centrifugarlos a 1500 x g durante 18 minutos a 24°C, con lo cual se formaron dos fracciones de líquido de diferente densidad y color. La primera fracción correspondía a las proteínas y la segunda a los lípidos. Solo se recuperó y utilizó esta última.

Considerando que dicha fracción aún contenía parte de la mezcla de cloroformo y acetona, se alícuotó en tubos de vidrio que se mantuvieron en un horno de extracción a 55°C durante 20 horas con el objeto de que esa mezcla se evaporara dejando libre la fracción lipídica, la cual quedó como residuo en el fondo de los tubos de vidrio. Esta fracción se recuperó agregando al residuo de los tubos medio HTF que contenía dimetil sulfóxido (DMSO) al 0.005%. Este DMSO se utilizó como disolvente de los lípidos. Una vez hecho esto los tubos que ya contenían este extracto o fracción lipídica se guardaron en alícuotas de 4ml a -20°C.

LFtrip. Hidrólisis de proteínas por tripsina.

Se tomó otra alícuota de líquido folicular de 50 ml que se descongeló a 37°C. A ésta, se le agregaron 11.5 µg/ml de tripsina al 1.15% en HTF según la metodología de Villanueva et al. (1995). Posteriormente se mezcló manualmente durante 2 minutos y después se incubó a 37°C por 10 minutos para que ocurriera la reacción enzimática y se desnaturalizaran las proteínas del líquido. La reacción se detuvo agregando al medio 20 mg de EDTA 1 mM en solución salina, mezclándola manualmente para luego incubar la mezcla durante 10 minutos a 37°C. Finalmente se retiró la tripsina haciendo una precipitación de las proteínas con sulfato de amonio al 49% en agitación continua. Los líquidos se centrifugaron a 1500 x g por 20 minutos recuperándose el sobrenadante con la fracción no proteica, en alícuotas de 4 ml que se mantuvieron a - 20°C hasta su uso.

LFcru. Líquido folicular crudo.

Este se obtuvo directamente del pool que había sido centrifugado y tratado con antibióticos, se separó en alícuotas de 4 ml y se mantuvo a - 20°C antes de su utilización en los ensayos de quimiotaxis. Este líquido se manejó como control positivo.

LFdial. Líquido folicular dializado.

Otra alícuota de 50 ml descongelada a 37°C se dializó contra medio HTF para retener y posteriormente evaluar las moléculas proteicas mayores a 12,000 daltons en los ensayos de quimiotaxis, y al mismo tiempo determinar el tamaño de la molécula del supuesto quimioatrayente (Villanueva et al. 1995).

Se utilizaron membranas de celulosa para dializado de proteínas mayores a 12,000 daltons (Sigma D-9402); las cuales se lavaron antes de su uso en solución salina durante 30 minutos, después se lavaron en medio HTF con agua deionizada

en una relación 1:50 (v:v) por 30 minutos y finalmente en HTF con agua deionizada (1:10/v:v) otros 30 minutos.

El dializado se efectuó tomando 250 ml de medio HTF preparado en el laboratorio que se colocaron en un vaso de precipitado. Aparte, se amarró la membrana de dializado lavada por uno de sus extremos con hilo de cáñamo para luego llenarla de líquido folicular, amarrándola después por su otro extremo con el mismo hilo. La membrana así preparada se introdujo en el vaso con HTF y esto se mantuvo en agitación continua a 4°C durante 22 horas. Al cumplirse las dos primeras horas se hizo solamente un recambio del medio HTF y después se continuó la agitación. Posteriormente se detuvo la agitación y se extrajo el líquido dializado de la membrana, mismo que se alícuotó y se congeló para después evaluar la fracción proteica así obtenida en los ensayos de quimiotaxis. El HTF de este recambio no se evaluó en los ensayos de quimiotaxis, sino que fue desechado.

LFcal. Líquido folicular desnaturalizado por calor.

Otra alícuota de 100 ml de líquido folicular se calentó en baño María a 90°C durante 10 minutos. El líquido así calentado formó un precipitado que se separó manualmente de las paredes del tubo y se centrifugó a 4500 x g durante 30 minutos a 19°C. El sobrenadante que contenía la fracción no proteica, se recuperó y se separó en alícuotas de 4 ml que se mantuvieron en congelación a - 20°C (Villanueva et al. 1995).

4.2.2.2. Ensayos de Quimiotaxis.

Se utilizaron 4 eyaculados en total de 4 caballos diferentes, haciendo de 2 a 4 ensayos para cada eyaculado. Asimismo, cada eyaculado se evaluó con los 5 diferentes líquidos foliculares tratados según se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Número de ensayos efectuados por eyaculado en cada tratamiento del experimento 2.

Eyaculado	LFÍip.	LFtrip.	LFcru.	LFdial.	LFcal.	Total ensayos
1	4	4	4	4	3	19
2	4	4	4	3	2	17
3	4	4	4	4	4	20
4	4	4	4	4	4	20
Total	16	16	16	15	13	76

Los capilares de las cámaras de quimiotaxis se saturaron con 130 μ l de ácido hialurónico al 0.05% en HTF; las cámaras A se llenaron con 1 ml de cada líquido folicular tratado y las cámaras B se llenaron con medio HTF-HSA al 7.5%, de acuerdo a la metodología seguida por Villanueva et al. (1992).

Diez microlitros del líquido de los capilares se sustituyeron con otros 10 μ l de muestra, cuya concentración espermática aproximada fue de 400,000 células, y se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se retiraron los líquidos y se colocaron en tubos marcados que fueron centrifugados a 1500 x g durante 8 minutos. Los sobrenadantes se descartaron dejando un remanente de 0.3 ml en los cuales homogeneizar las pastillas y así evaluar 10 μ l en el hemocitómetro.

Al igual que en el primer experimento, para obtener los porcentajes de migración y no migración, se sumaron los espermatozoides que migraron hacia las cámaras experimentales A (que contenían los diferentes líquidos foliculares LFÍip, LFtrip, LFcru, LFdial y LFcal), los que migraron hacia las cámaras o controles negativos B (que contenían medio HTF-HSA), y los espermatozoides que no migraron de los capilares C, esto es: A + B + C.

A partir de este total, se evaluaron los porcentajes de migración como los porcentajes de espermatozoides migrados hacia los líquidos experimentales (A), o

hacia los medios o controles negativos (B), y los porcentajes de no migración como los porcentajes de espermatozoides que no migraron del capilar C.

También se obtuvo la migración total (MT) mediante la fórmula:

$$A + B - C$$

Y a partir de ella, se obtuvo el porcentaje de migración específica hacia las cámaras A y el de migración no específica hacia las cámaras B de acuerdo a las fórmulas:

$$A \times 100\% \div MT \quad \text{y} \quad B \times 100\% \div MT \quad \text{respectivamente.}$$

Los resultados encontrados en los diferentes líquidos se compararon entre sí de tal manera que se determinara si los tratamientos efectuados influían en la respuesta migratoria, evaluando cual o cuales de los líquidos foliculares proporcionaron los mejores resultados en comparación con el líquido folicular crudo que fue el control positivo, y de este modo establecer la naturaleza química del quimioatrayente.

Con el objeto de cumplir con los supuestos de los modelos lineales, los datos fueron transformados a su raíz cuadrada y el análisis fue realizado dentro de cada uno de los lugares de migración A, B o de no migración C. Esto fue debido a que un análisis previo indicó diferentes valores de migración de cada uno de los tratamientos, con porcentajes de 52.87%, 7.05% y 40.07% para las cámaras A y B y para los capilares C respectivamente, mostrando ser diferentes significativamente entre ellos ($p < 0.01$).

El total de la variación dentro de cada uno de los puntos de migración, se evaluó estadísticamente por un análisis de varianza (Steel and Torrie, 1980), mismo que se representó como:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + \delta(i) + L_j + CL_{ij} + E(ij)_k$$

Donde:

Y_{ijk} = k-ésima respuesta aleatoria de migración transformada a la raíz cuadrada asociada al j-ésimo líquido folicular (L_j), al i-ésimo ensayo (C_i), y a la interacción entre ambos (CL_{ij}); μ representa la media poblacional, $\delta(i)$ es el error de restricción debido a la aleatorización NID ($0, \sigma^2\delta$), y $E(ij)_k$ es el error aleatorio NID ($0, \sigma^2$).

4.2.3. RESULTADOS.

La concentración espermática previa al lavado de las muestras de semen fue de $211.5 \pm 136.1 \times 10^6$ espermatozoides/ml, con un coeficiente de variación de 64.3%. La movilidad progresiva fue de $72.25 \pm 7.6\%$ (Media \pm DE). Posterior a los lavados la concentración espermática fue de $42 \pm 2.4 \times 10^6$ espermatozoides/ml mientras que la movilidad progresiva fue de $63 \pm 5.4\%$.

Se efectuó un total de 76 ensayos, de los cuales 6 tuvieron igual número de espermatozoides migrados en A que en B.

En los 70 ensayos restantes (92.1%) la migración hacia los líquidos foliculares fue evidente, encontrándose una diferencia de más del 700% en el porcentaje de espermatozoides migrados hacia los diferentes líquidos foliculares (82.60 a 90.5%) en comparación con el porcentaje de espermatozoides migrados hacia el medio control (9.5 a 13.2%) (Cuadro 5).

Para la evaluación de los resultados de migración y no migración, se determinó el análisis de varianza de la migración de espermatozoides, transformada a la raíz cuadrada para cada una de las cámaras de migración y para los capilares, como se muestra en el cuadro 3 de los cuadrados medios en los anexos.

En el cuadro 4, se presentan los resultados de migración y no migración, observándose en promedio, un mayor porcentaje de espermatozoides migrados hacia las cámaras experimentales que contenían los cinco diferentes líquidos foliculares evaluados (52.87%) seguido del porcentaje de espermatozoides que no migraron del capilar (40.07%) y del porcentaje de espermatozoides que migró hacia las cámaras con medios controles (7.05%), siendo diferentes significativamente ($p < 0.01$).

En el mismo cuadro, se comparan los resultados de migración hacia las cámaras experimentales (A), en las que se observó una mayor migración para el líquido folicular desnaturalizado por calor (LFcal), por tripsina (LFtrip), y el líquido folicular crudo (LFcru.), siendo intermedio el resultado de la fracción de lípidos (LFlíp), y el de menor migración el líquido folicular dializado (LFdial), con diferencias significativas ($p < 0.05$). Con respecto a la cámara B todos los líquidos foliculares mostraron el mismo nivel de migración sin ser diferentes significativamente ($p > 0.05$) con unos valores extremos de 5.07% y 10.52% para los líquidos foliculares crudo (LFcru) y dializado (LFdial) respectivamente. Finalmente en los capilares C se observó un menor porcentaje de espermatozoides no migrados en los líquidos desnaturalizados por tripsina (LFtrip) y por calor (LFcal), con respecto a los demás líquidos, siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 2.

Tratamientos del LF	Cámara A	Cámara B	Capilar C
LF líp	52.48 a	5.19 a	42.33 a
LF trip	55.69 b	6.37 a	37.93 b
LF cru	54.73 b	5.07 a	40.19 a
LF dial	44.01 c	10.52 a	45.46 a
LF cal	57.46 b	8.08 a	34.45 b
% de migración	52.87 x	7.05 y	40.07 z

Literales diferentes entre columnas (abc) muestran diferencias estadísticas $p < 0.05$

Literales diferentes entre renglones (xyz) muestran diferencias estadísticas $p < 0.01$

En el cuadro 5, se muestran los resultados del porcentaje de migración específica (A) y no específica (B). En el se observa que tanto la fracción de lípidos (LF líp) como los líquidos foliculares desnaturalizado por tripsina y crudo (LF trip y LF cru), tuvieron porcentajes de migración específica hacia A del 90%, siendo ligeramente mayores que los porcentajes de migración específica de los líquidos foliculares dializado y desnaturalizado por calor (LF dial y LF cal), los cuales fueron de 82.68% y 87% respectivamente. Estos porcentajes de migración específica, no fueron diferentes significativamente entre los cinco líquidos experimentales evaluados ($p > 0.01$); pero sí fueron diferentes significativamente a los porcentajes de migración no específica ($p < 0.01$), los cuales fueron de 9 a 10% para los líquidos foliculares LF líp, LF trip y LF cru, y de 17.33 y 13.2% para el LF dial y el LF cal. Es decir que siempre hubo más espermatozoides que migraron hacia los líquidos foliculares, que los que migraron hacia el medio control (HTF-HSA).

Cuadro 5. Porcentajes de migración específica y no específica para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 2.

Tratamientos del LF	Cámara A	Cámara B
LF líp	90.00 a	10.00 b
LF trip	90.00 a	10.00 b
LF cru	90.50 a	9.50 b
LF dial	82.60 a	17.30 b
LF cal	87.00 a	13.20 b

Literales diferentes entre columnas y entre renglones (abc), representan diferencias significativas $p < 0.01$

4.2.4. DISCUSION.

La concentración espermática anterior al lavado de las muestras presentó un coeficiente de variación muy grande (64.3%), debido a que hubo un caballo cuya concentración espermática fue de 96.8×10^6 espermatozoides/ml mientras que para los otros tres fue de 100 a 380×10^6 espermatozoides/ml. Es poco probable que la calidad de los eyaculados hubiera sido afectada por la época en la que se colectó el semen (junio a julio), ya que se conoce que los mejores meses para colectar semen equino son de marzo a junio, porque se obtienen eyaculados de mayor volumen y concentración espermática, y con buenos porcentajes de movilidad. Es más probable que como en este experimento no se determinaron las edades de los sementales, ni tampoco se llevó un registro del número y frecuencia de los eyaculados obtenidos de cada semental; estas diferencias en la concentración espermática fueran debidas a características particulares de los sementales, tales como su edad, ya que los sementales jóvenes tienen eyaculados menos concentrados que los sementales más viejos. También es un factor importante en la calidad del semen, la frecuencia con la que se obtienen los eyaculados en un mismo individuo (Blanchard and Varner, 1996a, 1996b).

La razón por la cual se descartaron 6 ensayos, fue porque hubo ocasiones en las que no fueron aplicados correctamente los líquidos dentro de los capilares ni dentro de las cámaras por fallas en el manejo de las pipetas automáticas, o porque al momento de aplicar la alícuota de semen en los capilares se botaba una gota de líquido del orificio del capilar por la formación de burbujas de aire en su interior.

Los resultados de migración y no migración demuestran que una porción de los espermatozoides aplicados en los capilares no responde a la señal de quimioatracción de los líquidos foliculares, tal vez por el hecho de que se aplican tanto espermatozoides móviles como inmóviles, ya que con los lavados de las muestras de semen no se asegura que se esté seleccionando a los

espermatozoides más capacitados para migrar. Por ello es que el porcentaje de espermatozoides que no migran de los capilares es relativamente alto (40.07%).

Sin embargo, esto no impide que sí ocurra una migración de los espermatozoides hacia los líquidos foliculares en mayor proporción que hacia los medios controles (52.87 vs. 7.05%). Con lo que se demuestra que el líquido folicular de yegua sigue ejerciendo una actividad quimiotáctica sobre los espermatozoides de caballo a pesar de sujetarse a diversos tratamientos.

La intención de este experimento fue la de aproximar la naturaleza química del componente del líquido folicular al cual se deba su actividad quimiotáctica, de modo que de acuerdo con los resultados de migración específica se podría pensar que el quimioatrayente es de naturaleza esteroide, ya que tanto los líquidos que contenían la fracción puramente lipídica (LF_{lip}), como los líquidos sin proteínas (LF_{trip}) tuvieron un comportamiento idéntico al líquido folicular crudo (LF_{cru}) (todos tuvieron un 90% de migración específica hacia A). En los resultados de migración y no migración, también es notable cómo la respuesta quimiotáctica se conserva, de tal manera que los líquidos foliculares que carecen de proteínas (LF_{trip} y LF_{cal}) se comportan en forma similar al líquido folicular crudo (55.69, 57.46 y 54.73% respectivamente), y estos a su vez son similares a los resultados del extracto lipídico (LF_{lip} 52.48%), quedando con la menor respuesta quimiotáctica el líquido que sí conserva sus proteínas (LF_{dial} 44.01%).

Probablemente sería interesante evaluar posteriormente en los ensayos de quimiotaxis, al extracto proteico que también se forma después de tratar los líquidos foliculares con acetona y cloroformo (primer fracción de líquido que se forma en el tubo), y no solo al extracto lipídico (segunda fracción), para de esta manera determinar si la fracción proteica presenta actividad de quimioatracción. Aunque el dializado aquí efectuado, que retuvo a las proteínas mayores a 12,000 daltons, permitió observar que las proteínas del líquido folicular de yegua sí

ejercen quimiotaxis, pero sobre una menor proporción de los espermatozoides aplicados en los ensayos (44.01%), en comparación con los líquidos que mantienen sus fracciones de lípidos o fracciones no proteicas (52.48 a 57.46%). Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Villanueva et al. (1995), quienes dializaron líquido folicular de humano analizando su actividad quimiotáctica sobre los espermatozoides, y encontraron que este líquido no mostraba actividad quimiotáctica alguna.

La razón por la cual en el presente experimento el dializado si ejerció actividad quimiotáctica se desconoce. Al parecer, independientemente de los tratamientos a los que fueron sometidos los líquidos foliculares, la respuesta quimiotáctica siempre fue aparente, existiendo una tendencia a ser mayor la actividad quimiotáctica de los líquidos que poseen sus moléculas lipídicas, que la de los líquidos que poseen sus moléculas proteicas. Sin embargo, es probable que durante el dializado del líquido folicular no solo queden retenidas las proteínas, sino también algún esteroide que se encuentre ligado a ellas y por el que continúe la actividad quimiotáctica, pero esto es algo que deberá probarse en estudios posteriores.

Hasta ahora, los resultados señalan que el quimioatrayente del líquido folicular de yegua no corresponde únicamente a una molécula esteroide, como sucede en el humano (Villanueva et al. 1995), por lo que es probable que se trate de un esteroide con su proteína conjugada.

Posteriormente sería recomendable efectuar experimentos en donde se trabaje nuevamente con líquido folicular dializado pero evaluando tanto al líquido que queda dentro de la membrana de dializado, como al medio contra el que se efectúe el dializado, que en estos experimentos fue el medio HTF. También se hace necesario evaluar líquido folicular libre de esteroides y libre de progesterona

y compararlos con el líquido folicular crudo, para de este modo determinar la naturaleza química del quimioatrayente del líquido folicular.

4.3. EXPERIMENTO 3

Comparación del efecto quimiotáctico del líquido folicular de yegua libre de esteroides (carbón.dextrán y dializado) y del HTF contra el que se dializó vs. líquido folicular crudo, sobre los espermatozoides de caballo.

4.3.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar algunas características fisico-químicas del quimioatrayente del líquido folicular de yegua.

4.3.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1.Evaluar la actividad quimiotáctica presente en el líquido folicular libre de esteroides.

2.Evaluar la actividad quimiotáctica del líquido dializado que retiene la fracción proteica, y del medio HTF contra el que se dializó y que contiene la fracción no proteica.

3.Comparar la actividad quimiotáctica de los líquidos tratados, con la actividad quimiotáctica del líquido folicular crudo.

4.3.2. HIPOTESIS.

1.Si el quimioatrayente del líquido folicular corresponde a un esteroide, entonces la respuesta del líquido folicular libre de esteroides será mínima o nula (líquidos tratados con carbón-dextrán), pero la respuesta del medio HTF con el que se efectuó el dializado será elevada o similar a la del líquido folicular crudo, debido a que el HTF contiene la fracción no proteica.

2.Si por el contrario, el quimioatrayente corresponde a una proteína, entonces tanto la fracción retenida en el dializado como el líquido libre de esteroides, darán una respuesta migratoria elevada o similar a la del líquido folicular crudo, mientras que el HTF no mostrará actividad quimiotáctica.

4.3.2.1. Tratamientos de los líquidos foliculares.

Para poder determinar la naturaleza química del quimioatrayente presente en el líquido folicular de yegua, se efectuaron los siguientes tratamientos:

LFcd. Tratamiento del líquido folicular con la técnica del carbón-dextrán.

Este tratamiento pretende retirar un 99% de los esteroides presentes en este líquido (Ireland, 1983; Zárate, 1996; Hernández, 1997).

A una alícuota de 30 ml de líquido folicular se le añadió carbón vegetal activado (10 mg/ml) más dextrán (0.1 mg/ml) y se agitó durante una hora a 25°C. Para retirar el carbón activado el líquido se centrifugó a 1500 x g durante 30 minutos a - 4°C, decantando el sobrenadante en un tubo. Este proceso de centrifugación y decantación se repitió 6 veces y se filtró en papel filtro del número 1 para clarificarlo. Posterior a la sexta centrifugación se consideró que el líquido folicular estaba libre de esteroides. Para evitar su contaminación se le agregaron antibióticos (100 UI/ml de penicilina G y 50 UI/ml de sulfato de estreptomicina) y se mantuvo a una temperatura de - 20°C antes de su uso en los ensayos (Zárate, 1996; Hernández et al. 1997).

A estos líquidos no se les hizo ninguna evaluación posterior para determinar sus concentraciones de esteroides, ya que previamente se ha demostrado que la metodología empleada remueve alrededor del 99% de los esteroides presentes en el líquido folicular equino (Ireland, 1983; Hernández et al. 1997).

LFdial. Tratamiento del líquido folicular mediante dializado.

Al igual que en el experimento anterior, primeramente se lavaron las membranas de celulosa en solución salina durante 30 minutos, seguidamente en HTF en agua deionizada (1:50/v:v) durante 30 minutos y finalmente en HTF en agua deionizada (1:10/v:v) otros 30 minutos.

Una alícuota de 30 ml de líquido folicular crudo se dializó contra 250 ml de medio HTF a 4°C durante 24 horas en agitación continua. En este experimento se hicieron dos recambios del medio HTF contra el que se efectuó el dializado (uno cada dos horas), a diferencia del experimento anterior en el que se hizo un solo recambio de este medio. Al término del dializado, se recuperó tanto la fracción proteica del líquido folicular que había quedado retenida en la membrana de dializado, como el medio HTF del primer recambio, y se alicuotaron para congelarlos a - 20°C hasta su uso. El HTF del segundo recambio se desechó.

LFcru. Líquido folicular crudo.

Este se obtuvo del pool que había sido previamente centrifugado y tratado con antibióticos, se separó en alícuotas y se mantuvo en congelación antes de ser incluido en los ensayos de quimiotaxis.

HTF del dializado.

Aquí se evaluó el medio HTF del primer recambio con el que se dializó el líquido folicular. Este se alicuotó y se mantuvo en congelación hasta su uso.

4.3.2.2. Ensayos de Quimiotaxis.

Debido a que este experimento se llevó a cabo durante el inicio de invierno (noviembre 1997), época en que la mayoría de las yeguas se encuentran en anestro, aún cuando se hicieron visitas frecuentes al rancho de equinos para recelar a las yeguas, solamente pudo obtenerse un eyaculado de un solo caballo para los ensayos de quimiotaxis.

Con base en los diferentes tratamientos de los líquidos foliculares, se procedió al preparado de las cámaras de quimiotaxis, dejando 5 cámaras para el líquido folicular tratado con carbón-dextrán, 5 cámaras para el líquido folicular

dializado, 5 cámaras para el líquido folicular crudo, y 4 cámaras para el HTF del dializado.

Se designaron con letras A las cámaras experimentales que contenían los diferentes líquidos tratados, con letras B las cámaras control negativo (HTF-HSA al 7.5%) y con letras C los capilares con ácido hialurónico al 0.05% en HTF.

Se saturaron los capilares de las cámaras con 130 μ l de ácido hialurónico, las cámaras A con 1 ml de cada líquido tratado y las cámaras B con 1 ml de medio control negativo.

Posteriormente se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente para que se formara un gradiente de los líquidos, después de lo cual 10 μ l de los líquidos de los capilares se sustituyeron con otros 10 μ l de la muestra de semen lavado cuya concentración espermática era de aproximadamente 500,000 células.

Las cámaras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para después retirar los líquidos de cámaras y capilares, los cuales se centrifugaron a 1500 x g por 8 minutos, descartando sus sobrenadantes con remanentes de 0.3 ml en los cuales se resuspendieron las pastillas y así se evaluaron 10 μ l en el hemocitómetro.

Nuevamente, de cada cámara y sus compartimentos (A, B y C) se obtuvo el número de espermatozoides, estos se sumaron y en base a ello se evaluó la respuesta migratoria como el porcentaje de migración hacia A o hacia B, y el porcentaje de no migración a partir de los espermatozoides que no migraron de sus capilares C.

De los espermatozoides que sí migraron se obtuvo el porcentaje de migración específica hacia A y el porcentaje de migración no específica hacia B, a partir de la migración total (MT) basada en la siguiente fórmula: $A + B - C$

Los resultados encontrados en los diferentes líquidos se compararon entre sí, para determinar si los tratamientos efectuados en ellos tenían alguna influencia en la respuesta migratoria y así conocer cuales líquidos ejercieron mayor quimioatracción sobre los espermatozoides de caballo. De este modo se espera poder establecer la naturaleza química del agente quimiotáctico del líquido folicular de yegua.

Cabe aclarar que los resultados aquí presentados son preliminares, debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño para sustentar los resultados de quimiotaxis. Se requiere de un mayor número de eyaculados para poder establecer la respuesta quimiotáctica adecuadamente.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (Steel and Torrie, 1980) cuyo modelo fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + \delta(i) + L_j + CL_{ij} + E(ij)_k$$

Donde:

Y_{ijk} = k-ésima respuesta aleatoria de migración transformada a la raíz cuadrada asociada al j-ésimo líquido experimental (L_j), al i-ésimo ensayo (C_i), y a la interacción entre ambos (CL_{ij}); μ representa la media poblacional, $\delta(i)$ es el error de restricción debido a la aleatorización NID ($0, \sigma^2 \delta$), y $E(ij)_k$ es el error aleatorio NID ($0, \sigma^2$).

4.3.3. RESULTADOS.

La concentración espermática anterior al lavado de las muestras de semen fue de 34×10^6 espermatozoides/ml y la movilidad progresiva de 85%. Posterior a

los lavados la concentración espermática fue de 53×10^6 espermatozoides/ml mientras que la movilidad progresiva se incrementó a 90%.

Como se observa, la concentración espermática se aproximó a 500,000 células por 10 μ l de muestra aplicada a cada capilar de las cámaras de quimiotaxis. Sin embargo continuaron presentándose fallas en la aplicación de la alícuota de semen en los capilares, pues en dos de las cámaras se perdió parte de ella, de modo que hubo ensayos que se hicieron con concentraciones espermáticas de alrededor de 210,000 células. Aún así estos datos no se descartaron de la evaluación de los resultados.

Como una evaluación adicional a este experimento, se efectuó un radioinmunoanálisis al líquido folicular crudo, para determinar su concentración de progesterona (P4) (Villanueva et al. 1995). Encontrándose una concentración de P4 de una alícuota de 100 μ l de líquido folicular crudo, de 41.95 ng/ml. Estos niveles de P4 son similares a los encontrados por Gentry et al. (1996) quienes determinaron niveles de 50 ng/ml en folículos preovulatorios de 5 a 6 cm de diámetro, pero quedan por debajo de los resultados encontrados por Bergfelt y Ginther (1986), quienes determinaron niveles de P4 de 86.1 ng/ml en un pool de líquido folicular de yeguas Pony, aunque no especifican el tamaño de los folículos.

Respuesta migratoria.

En el cuadro 6, se muestran los porcentajes de espermatozoides que migraron hacia los 5 diferentes líquidos tratados así como los porcentajes de espermatozoides migrados en las cámaras B y los no migrados del capilar C.

Cuadro 6. Porcentaje de espermatozoides migrados y no migrados para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 3.

Tratamientos del LF	Cámara A	Cámara B	Capilar C
LF cd	42.00 abcd	23.30 ef	35.00 bcde
LF dial	45.00 abcd	30.00 def	25.00 ef
LF cru	47.70 abc	32.40 bcdef	20.00 ef
HTF	53.70 a	30.50 bcdef	15.70 f

Literales diferentes entre columnas y entre renglones (abcdef), representan diferencias significativas $p < 0.05$

Con respecto al porcentaje de espermatozoides migrados hacia los líquidos experimentales, el tratamiento que mostró un porcentaje más elevado fue el medio HTF contra el que se había dializado el líquido folicular de yegua (53.7%) pero no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) a los líquidos foliculares crudo (47.7%), dializado (45%) ni al líquido folicular libre de esteroides (42%).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides migrados hacia los medios controles (cámaras B), el tratamiento que mostró un relativamente menor porcentaje fue el líquido folicular sin esteroides (23.3%) y el que mostró un mayor porcentaje fue el líquido folicular crudo (32.4%) sin ser diferentes significativamente ($p > 0.05$).

De los espermatozoides que no migraron de los capilares, el mayor porcentaje fue para el líquido folicular sin esteroides (35%), y el menor porcentaje fue para el medio HTF contra el que se dializó (15.7%) ($p < 0.05$).

Considerando solamente a los espermatozoides que sí migraron, en el cuadro 7 se presentan los resultados de migración específica y no específica; encontrándose un mayor porcentaje de migración específica en el líquido folicular libre de esteroides (66%) y en el HTF contra el que se dializó (64%), pero sin ser diferentes significativamente ($p > 0.05$) al líquido folicular dializado (61%) ni al líquido folicular crudo (60%), es decir que todos se comportaron de manera similar.

El porcentaje de migración no específica (B) fue similar para los líquidos foliculares crudo (40%) y dializado (39%) y ligeramente menor para el HTF contra el que se dializó (36%), y para el líquido folicular sin esteroides (34%), sin existir diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$).

Sin embargo, para todos los tratamientos los porcentajes de espermatozoides migrados siempre fueron mayores para las cámaras A que para las cámaras B (Cuadro 7) ($p<0.05$). Cabe mencionar que el tratamiento que tuvo un mejor comportamiento de migración fue el HTF contra el que se dializó, ya que en los líquidos sin esteroides y dializado, hubo una cámara en cada uno en donde se encontró un mayor porcentaje de espermatozoides en el medio control negativo, que en el medio experimental.

Cuadro 7. Porcentajes de migración específica y no específica para cada tratamiento del líquido folicular del experimento 3.

Tratamientos del LF	Cámara A	Cámara B
LF cd	66.10 a	34.00 b
LF dial	61.04 a	39.00 b
LF cru	60.03 a	40.00 b
HTF	64.00 a	36.10 b

Literales diferentes entre columnas y entre renglones(ab), representan diferencias significativas $p<0.05$

4.3.4. DISCUSION.

En este experimento la concentración espermática previa al lavado de las muestras fue muy baja en comparación con la encontrada en el experimento anterior (34×10^6 espermatozoides/ml vs. $211.5 \pm 136.1 \times 10^6$ espermatozoides/ml) respectivamente, pero la movilidad progresiva fue mejor (85% vs. $72.25 \pm 7.6\%$) respectivamente (Media \pm DE).

Los resultados de migración específica hacia los líquidos experimentales quedaron muy por debajo de los encontrados en el informe anterior (60.03 a 66.1% vs. 82.6 a 90.5% respectivamente), y por lo tanto los porcentajes de

migración no específica, fueron mayores para los medios o controles negativos (34 a 40% vs. 9.5 a 17.3% respectivamente).

Lo anterior puede deberse a muchas razones, como por ejemplo al hecho de que en este estudio solamente se evaluó a un semental y por consiguiente el tamaño de la muestra fue inadecuado, o bien que la calidad de los líquidos foliculares fuera menor, todo ello debido a que este experimento se efectuó fuera de la época reproductiva de los equinos. También es probable que la respuesta encontrada se deba al tipo de tratamientos aplicados a los líquidos foliculares.

Por otra parte, el líquido folicular que se trató con carbón-dextrán para retirarle el 99% de sus esteroides, mostró un bajo porcentaje de espermatozoides migrados en A (42%) comparado con los demás líquidos foliculares ($\geq 45\%$), aunque su migración específica fue mayor a la de los demás líquidos (66.10%). Se desconoce la razón por la cual este líquido sin esteroides sigue dando una respuesta tan similar al líquido que no contiene proteínas (HTF).

Los tratamientos del líquido folicular dializado y del HTF contra el que se dializó, permitieron evaluar la respuesta de la fracción proteica vs. la fracción no proteica del líquido folicular; en donde se encontró que el HTF obtuvo el mayor porcentaje de espermatozoides migrados en A (53.7%) comparado con los otros líquidos foliculares (<48%). Mientras que el líquido folicular dializado tuvo una respuesta similar a la del líquido folicular crudo (45 y 47.7% respectivamente). Es decir que aún cuando todos los líquidos experimentales mostraron un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides, la mayor respuesta fue para el medio que contenía la fracción no proteica (HTF).

Según los resultados del experimento efectuado anteriormente (experimento 2 de esta tesis), también los líquidos foliculares con su fracción de lípidos mostraron el mayor porcentaje de migración (52.4 a 57.4%) comparados con su

fracción proteica (44.01%), siendo los resultados de ese experimento muy similares a los del HTF y a los del dializado encontrados aquí (53.7% vs. 45%) respectivamente.

La razón por la cual los líquidos foliculares dializados y los líquidos libres de esteroides siguen mostrando actividad quimiotáctica todavía no se conoce, probablemente sucedió que el dializado efectuado, pese al doble recambio de HTF, todavía siguió conservando esteroides. De manera que la hormona implicada en la respuesta quimiotáctica permaneció unida a las proteínas y así pudo ejercer su actividad, pero es necesario efectuar ensayos que sustenten esto, de manera que el dializado sea sometido a un mayor número de recambios de HTF (mínimo 6), y así sean separados al máximo los componentes proteicos de los componentes no proteicos del líquido folicular.

También es probable que dentro del total de componentes que conforman al líquido folicular exista algún otro con propiedades quimiotácticas que no necesariamente pertenezca a un lípido ni a una proteína, ya que como señalan Biggs et al. (1993) y Eissa (1996) el líquido folicular contiene una variedad de componentes químicos tanto proteicos como de naturaleza esteroide, además de carbohidratos, enzimas y minerales.

Tan solo dentro del total de proteínas que componen a este líquido, Andersen et al. (1976) lograron distinguir 40 proteínas individuales en el líquido folicular bovino cuya naturaleza química era muy similar a la del suero. Ellos explican que el antro folicular es accesible a casi cualquier proteína presente en la circulación, manteniendo un equilibrio constante entre el líquido folicular y el plasma. Los autores mencionan que la concentración de proteína total del líquido folicular es de 60 a 84 mg/ml para aquellos folículos de 15 a 20 mm de diámetro y que sus principales proteínas son prealbúmina, albúmina, globulinas, glicoproteína III, lipoproteínas, macroglobulinas e inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM).

Por su parte Wise (1987) y Lee et al (1992), señalan que las proteínas presentes en el líquido folicular no solamente son de origen sérico sino que también son producidas por las células del cumulus que rodean al folículo.

En especies animales como el porcino, se ha visto que el líquido folicular de cerda estimula la respiración de los espermatozoides in vitro y que un dializado de éste disminuye dicho efecto, no así la desnaturalización por calor del líquido folicular (Lee et al. 1992). Estos autores han encontrado que en el líquido folicular de esta especie existen proteínas del tipo de las glicoproteínas con peso molecular de 52,000, con una secuencia aminoácido N-terminal muy similar a la de la Antitrombina III del humano, equino y bovino, las cuales estimulan la movilidad de los espermatozoides in vitro.

En un estudio posterior Lee et al. (1994) evaluaron la Antitrombina III como estimuladora de la movilidad y la quimiotaxis de los espermatozoides de cerdo. Purificaron esta proteína del líquido folicular mediante cromatografía y después agregaron diferentes concentraciones de la misma al semen lavado, incubándolo para así evaluar el porcentaje de movilidad de los espermatozoides. Por otro lado, utilizaron cámaras de quimiotaxis las cuales poseían una cámara superior y otra inferior separadas por una membrana de filtro de policarbonato. A la cámara inferior la saturaron con medio PBS y a la superior con espermatozoides mezclados con diferentes concentraciones de la Antitrombina III y las dejaron incubar. El ensayo experimental se efectuó saturando la cámara inferior con PBS que contenía diversas concentraciones de la proteína y la cámara superior con una suspensión de 3×10^6 espermatozoides/ml, dejando un tiempo de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. Con este experimento encontraron que la Antitrombina III estimulaba la movilidad espermática y que además poseía un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides.

Otros experimentos efectuados en humanos han llevado a la conclusión de que los agentes quimiotácticos son de naturaleza esteroide (Villanueva et al. 1995).

Así, se observa que el líquido folicular posee diversas sustancias que funcionan como quimioatrayentes de espermatozoides y que en unas especies son de naturaleza proteica mientras que en otra son de naturaleza esteroide.

En este experimento, hasta donde ha sido posible vislumbrar, el quimioatrayente puede estar comprendido entre ambas sustancias con una mayor tendencia a tratarse de un esteroide o bien un complejo lipoproteico, en donde quizás el esteroide esté unido a una proteína y de esta manera pueda ejercer su actividad quimiotáctica.

Se recomienda entonces efectuar tratamientos al líquido folicular, descartando mediante el uso de anticuerpos, hormonas esteroides tales como la P4 y E2, y determinando la concentración de las mismas por métodos como el radioinmunoanálisis (RIA) o el ELISA (Silván et al, 1993). Para que posteriormente los líquidos foliculares libres de estas hormonas se sometan a los ensayos de quimiotaxis y de este modo evaluar su actividad sobre los espermatozoides de caballo. También se hace necesario ampliar el tamaño de la muestra para posteriores ensayos de quimiotaxis.

Otras opciones serían tratar al líquido folicular para su desnaturalización por calor o por tripsina y a estos mismos líquidos someterlos después a un dializado, evaluando nuevamente tanto al medio contra el que se dialice como al líquido folicular, y al mismo tiempo efectuar un mayor número de recambios del medio contra el que se dialice. O si se prefiere, agregar diferentes hormonas esteroides tales como progesterona, estradiol o testosterona en el medio HTF, a las concentraciones recomendadas por Villanueva et al. (1995) y por Sánchez (1998),

para evaluarlas en los ensayos de quimiotaxis y determinar si influyen en la respuesta migratoria de los espermatozoides de caballo.

5. DISCUSION GENERAL

En muchas especies invertebradas, la comunicación química entre el ovocito y el espermatozoide parece ser esencial para la supervivencia. En especies marinas, en las que la fertilización ocurre extracorpóreamente, tanto el espermatozoide como el ovocito son liberados directamente en el mar, y el espermatozoide debe encontrar al ovocito por medio de una migración dirigida hacia un potente estímulo (Ward and Kopf 1993).

En los mamíferos, se sabe que durante la ovulación, el líquido folicular es liberado con el ovocito y fluye dentro del aparato reproductor de la hembra interviniendo de manera importante en los procesos de fertilización (Lee et al. 1994), y en el caso de los gametos masculinos, algunos estudios in vitro han demostrado que este líquido folicular también estimula la movilidad de los espermatozoides, los capacita e induce su reacción acrosomal mejorando las tasas de penetración del ovocito, y de igual manera los atrae hacia el mediante su actividad quimiotáctica (Lee et al. 1994).

Con respecto a los ovocitos, solamente aquellos que son maduros son conducidos dentro del oviducto junto con el líquido folicular durante la ruptura de los folículos en los ovarios de los mamíferos, y por ello resulta fácil comprender que sea precisamente el líquido folicular el que ejerza sus efectos sobre la movilidad, quimiotaxis, capacitación y reacción acrosomal de los espermatozoides que se encuentran en la cercanía del ovocito durante los diferentes estados fisiológicos de los procesos de fertilización (Lee et al. 1994).

La comunicación entre gametos en las especies mamíferas, parece ser menos importante que en las especies invertebradas, debido a que el espermatozoide depositado en el aparato reproductor femenino no se enfrenta a condiciones tan hostiles para encontrar al ovocito. Sin embargo, se ha demostrado que en humanos, equinos, bovinos, ovinos, porcinos, lepóridos y hámsters la

mayor parte de los espermatozoides eyaculados permanecen en un estado de movilidad reducida en el istmo del oviducto hasta que ocurre la ovulación (Ward and Kopf, 1993; Harper, 1994; Troedsson et al. 1998). En yeguas la concepción puede ocurrir aunque la monta se realice hasta 5 días antes de la ovulación (Buckhardt 1949). Esto sugiere que en los mamíferos las señales químicas presentes en el líquido folicular pueden servir para activar a los espermatozoides almacenados en el oviducto y para dirigir su migración hacia el ovocito, una vez ocurrida la ovulación.

En los animales domésticos no ha sido completamente determinada la composición química del líquido folicular, sin embargo Funahashi y Day (1993) detectaron que los esteroides del líquido folicular de cerda favorecían la movilidad y habilidad de fertilización de los espermatozoides. Desafortunadamente no existe información previa en relación con efectos similares producidos por el líquido folicular de yegua sobre los espermatozoides de caballo, tan solo se han determinado algunos de sus componentes como son el estradiol y la progesterona (Bergfelt and Ginther, 1986). Los usos que se le ha dado a este líquido han sido principalmente para regular la secreción de la hormona foliculo estimulante (FSH) por la hipófisis (De Jong and Sharpe 1976; Ireland et al. 1983; Henderson et al. 1986).

Por lo que la naturaleza molecular de los supuestos quimioatrayentes del líquido folicular de yegua debe ser estudiada con más detalle, ya que en ciertas especies marinas se han aislado clones de ADNc que codifican para péptidos involucrados en la atracción y activación de los espermatozoides, mientras que en otras especies se ha identificado a algunas hormonas esteroides como potentes quimioatrayentes. En los estudios de Villanueva et al. (1995), se demostró que la progesterona exhibe un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides humanos in vitro.

En el presente trabajo, todos los resultados encontrados sugieren la existencia de una respuesta migratoria de los espermatozoides ante el estímulo quimiotáctico del líquido folicular de yegua, y de ciertas sustancias presentes en él, esto es que esta respuesta no solamente ocurre en el ser humano (Villanueva et al. 1990; 1992) sino que también tiene lugar en los equinos (Navarro et al. 1998).

Además, los resultados del primer experimento efectuado demuestran que la respuesta quimiotáctica es probablemente igual para el total de espermatozoides aplicados en los ensayos independientemente de los tiempos en los que se dejen incubando las cámaras de quimiotaxis.

Las razones por las cuales en los tres experimentos efectuados siempre hubo un relativamente elevado porcentaje de espermatozoides que no manifestaba una respuesta migratoria, se desconocen, aunque es probable que se deba a que no se hizo una selección de los espermatozoides capacitados antes de aplicarlos en los ensayos de quimiotaxis, o que ciertos procesos de capacitación de los espermatozoides in vitro deban ocurrir necesariamente en medios de cultivo que se asemejen a los líquidos presentes en el oviducto (Lippes and Wagh, 1989; Parrish et al. 1989; Villanueva et al. 1990).

Sin embargo, cabe mencionar que en estos experimentos se mantuvo a los espermatozoides en medios de cultivo cuyo contenido de sales era similar al de los medios fisiológicos. Tal es el caso del HTF que precisamente lleva ese nombre debido a que su contenido es similar al del fluido tubal humano y se sabe que mantiene intacta la membrana acrosomal. Además su pH y osmolaridad son similares a las del líquido folicular (pH 7.3, osmolaridad 295-302 mOsm) mismas que a su vez son similares a las del plasma sanguíneo (Burgoyne et al, 1979; David et al. 1973; Shagli et al. 1972).

Por otro lado, es probable que pese a la utilización del HTF hubiera espermatozoides con reacción acrosomal prematura a la hora de efectuar los ensayos, ya que como señalan Lippes y Wagh (1989) los espermatozoides requieren de una glicoproteína oviductal encargada de estabilizar su membrana acrosomal.

Con respecto al ácido hialurónico que se utilizó en los experimentos para mantener la capilaridad de los tubos capilares, se conoce que es un carbohidrato capacitante de espermatozoides (Villanueva et al. 1992) que en forma natural se encuentra conformando el cemento que une a las células del cumulus oophorus del ovocito, conjuntamente con algunas proteínas, de modo que al reaccionar con la enzima hialuronidasa del espermatozoide facilita que éste penetre el cumulus y se una directamente a la zona pelúcida dando lugar a la fertilización (Harper, 1994). Es probable que entre más denso sea este ácido menor sea la migración de espermatozoides, pero precisamente se trabajó en una proporción que se ha visto no afecta negativamente la migración de los espermatozoides (0.05%) y que es todavía menor a la utilizada por Villanueva et al. (1992, 1995) quienes lo manejaron al 0.5%. Además de que está comprobado que este ácido no presenta diferencias significativas con el moco cervical, en cuanto al porcentaje de movilidad y velocidad curvilínea de los espermatozoides (Villanueva et al. 1992) y que el hialuronato de sodio es un sintético que se utiliza como sustituto del moco cervical en pruebas de penetración de los espermatozoides in vitro (Harper, 1994).

También es probable que la albúmina sérica humana tenga un efecto de capacitación de espermatozoides, como sucede en el caso de la BSA (Parent et al. 1997), y que esto pudiera estar influyendo en su desplazamiento.

Pero de cualquier manera, siempre hubo una respuesta migratoria de los espermatozoides hacia el líquido folicular en mayor proporción que hacia el medio control negativo.

Ahora bien, con respecto al por qué una pequeña proporción de los espermatozoides que migran lo hace hacia el medio control (HTF-HSA al 7.5%), tal vez quede explicado con los resultados de Cohen-Dayag et al (1994) quienes encontraron un comportamiento similar en sus experimentos de quimiotaxis, atribuyéndolo a que la respuesta migratoria de los espermatozoides es secuencial, es decir que algunos espermatozoides van adquiriendo su capacidad para migrar mientras que otros la van perdiendo, de esta forma se aseguraría que solo los espermatozoides más aptos puedan alcanzar al quimioatrayente. O bien se deba a que sí exista una relación lineal entre el número de células aplicadas a los ensayos y la tasa de migración, de tal manera que la habilidad para responder a estas señales de quimioatracción sea una característica común a la mayoría de los espermatozoides y que si algunos no responden, sea porque los efectos de quimioatracción del líquido folicular sean cortos porque estén presentes ciertos mecanismos de transducción similares a los de otros quimioatrayentes (Villanueva et al. 1992).

En el experimento 2 se observó que el líquido folicular desnaturalizado por calor era tan buen quimioatrayente como en su estado crudo. Esto puede deberse a que dentro de las proteínas que componen al líquido folicular, se encuentra la albúmina la cual es captadora de esteroides como la P4 y dado que al desnaturalizar el líquido folicular se está quitando esta proteína, probablemente quede P4 en forma libre con lo cual se incrementen sus niveles en el líquido folicular y por ello sea mejor la respuesta en este líquido. Esto haría suponer que el agente quimioatrayente del líquido folicular corresponde a un esteroide, sin embargo, considerando que no se determinó el nivel de esta hormona u otras hormonas esteroides en el líquido desnaturalizado, no es posible asegurar esto.

De igual manera, el líquido folicular libre de proteínas por acción enzimática, tuvo un alto porcentaje de espermatozoides migrados que fue mayor al de la fracción lipídica, mientras que la fracción proteica por dializado obtuvo el menor

porcentaje. La respuesta encontrada en este experimento fue muy similar a la encontrada por Villanueva et al (1995), quienes hicieron una caracterización bioquímica parcial del factor quimioatrayente con los mismos tratamientos aplicados aquí y descubrieron que el número de células migradas permanecía sin cambios después de tratar los líquidos foliculares con tripsina o calor, pero en su experimento el dializado abolió completamente esta migración mientras que el extracto lipídico funcionaba igual al líquido folicular crudo.

Por último el experimento 3 pese a presentar resultados preliminares, sigue mostrando que los líquidos que mantienen su fracción esteroide o no proteica, funcionan mejor como quimioatrayentes que aquellos que permanecen con su fracción proteica.

Dichos trabajos revelaron que el compuesto muestra unas características fisicoquímicas correspondientes a los lípidos, como son su resistencia a la acción del calor o de enzimas proteolíticas como la tripsina, su bajo peso molecular, su hidrofobismo, y su solubilidad en solventes como el cloroformo y la acetona (Bearden y Fuquay, 1982; Murray et al. 1988), lo cual coincide con los trabajos efectuados por Ralt et al (1994) y los efectuados por Villanueva et al (1995).

Con todo lo anterior puede decirse que al igual que en los humanos, en los equinos existe un quimioatrayente del líquido folicular cuya naturaleza química parece aproximarse más a un esteroide que a una proteína, pero con la diferencia de que al mismo tiempo este esteroide pueda estar ligado a una proteína de unión necesaria para que efectúe eficazmente su actividad quimiotáctica.

6. CONCLUSIONES

Los trabajos anteriores encaminados primeramente a la determinación de la existencia de actividad quimiotáctica del líquido folicular de yegua sobre los espermatozoides de caballo y en segundo lugar a la caracterización del quimioatrayente, han permitido demostrar que al igual que en otras especies inferiores y superiores, el equino también muestra mecanismos de quimioatracción *in vitro* que probablemente sea válido extrapolar a lo que sucede a nivel de gametos masculino y femenino *in vivo*, en donde ambas células se comunican antes de la fertilización para asegurar su encuentro y así favorecer la ocurrencia de la fertilización.

Esta idea permite concluir que en ese proceso de comunicación participan ciertos elementos presentes en el líquido folicular, que son activadores de la movilidad de los espermatozoides y que al mismo tiempo les provocan un cambio en la dirección en que viajan para acercarlos a un gradiente de los elementos.

También es pertinente señalar que estos componentes del líquido folicular pueden estar actuando sobre los espermatozoides, incrementando sus concentraciones de AMPc y calcio, y de este modo favorecer su respiración, movilidad y reacción acrosomal.

Por lo tanto, los componentes del líquido folicular o el líquido folicular en sí mismo, pueden tener una utilidad potencial como agentes que incrementen la fertilidad en sistemas *in vitro*, en la medida en que como señalan Henderson et al (1986), incrementen las tasas de fertilidad o las prevengan. También podría evaluarse la inhibición del efecto quimioatrayente de estos compuestos con sustancias que podrían ser potencialmente inhibidoras de la fertilización.

Sería interesante que en estudios posteriores, se evaluara minuciosamente a cada uno de los componentes que conforman al líquido folicular, para caracterizar

a la sustancia implícita en esta función de quimioatracción, aunque todo parece señalar que se trata de una lipoproteína. Se hace necesario buscar métodos de determinación de esteroides en el líquido folicular como pueden ser el RIA o el ELISA; además de evaluar en los ensayos de quimiotaxis a los elementos esteroideos tales como la P4, E2 y testosterona, para deducir si este efecto es exclusivo de la P4 como lo es en humanos.

Igualmente sería válido dializar nuevamente a los líquidos foliculares evaluando tanto a la fracción dializada como al medio contra el que se dialice en los ensayos de quimiotaxis, efectuando un mayor número de recambios, y posteriormente desnaturalizarlos para ver qué sucede. O evaluar el medio HTF con concentraciones conocidas de progesterona, estradiol o testosterona, para determinar si esta hormona es quimioatrayente de espermatozoides en equinos y a qué concentraciones la provocaría, tomando como referencia que en humanos, las concentraciones de P4 a las que ocurre la quimiotaxis van de 3.125 a 25 µg/ml (Sánchez, 1998).

7. BIBLIOGRAFIA GENERAL

Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. A biophasic pattern of Ca uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99: 187-194.

Andersen M, Kroll J, Byskov A, Faber M. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1976, 48: 109-118.

Austin CR. Aproximación de los gametos. Fecundación. Manuales UTHEA No. 359, 1967.

Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL et al. Endocrin and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 1992, 47: 871-883.

Baird DT, Campbell BK, McNeilly AS. Ovine follicular fluid supresses the ovarian secretion of androgens, oestradiol and inhibin. *J. Endocrin.* 1990, 127: 23-32.

Bakst MR, Cecil HC. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 94: 287-293.

Ballesteros LM, Delgado NM, Rosado A, Correa C, Hernández O. Binding of chemotactic peptide to the outer surface and to whole human spermatozoa with different affinity states. *Gamete Res.* 1988, 20: 233-239.

Bearden HJ, Fuquay J. Reproducción Animal Aplicada. México, D.F.: El Manual Moderno, 1982.

Beck KJ, Herschel S, Hungershofer R, Schwinger E. The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1976, 27: 407-412.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1985, 43 (2) 268-272.

Bergfelt DR, Ginther OJ. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mare. *Theriogenology* 1986, 26: 733-747.

Biggs C, Tilton JE, Craigon J, Foxcroft GR, Ashworth CJ, Hunter MG. Comparison of follicular heterogeneity and ovarian characteristics in Meishan and Large-white hybrid pigs. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 97: 263-269.

Blackmore PF, Beebe SJ, Lattanzio FA, Neulen, J. Cell surface binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *Biochem. Biophys. Res.* 1990,

Blackmore PF, Lattanzio FA. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem. Biophys. Res.* 1991, 181 (1): 331-336.

Blanchard T, Varner D. Evaluating breeding soundness in stallions – 1: The basic examination. *Vet. Med.* 1996a, 91 (1): 54-63.

Blanchard T, Varner D. Evaluating breeding soundness in stallions – 2: Semen collection and evaluation. *Vet. Med.* 1996b, 91 (2): 144-155.

Bradley MP, Garbers DL. The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 115: 777-787.

Brown C, La Vigne WE, Padilla SL. Unrupted pregnancy in a heterotopic fallopian tube: Evidence of transperitoneal sperm migration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1987, 156 (1): 88-90.

Bryant SM, Gale JA, Yanagihara DL, Campeau JD, DiZereaga GS. Angiogenic, mitogenic and chemotactic activity of human follicular fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1988, 158: 1207.

Buckhardt J. Sperm survival in the genital tract of the mare. *J. Agric. Sci.* 1949, 39: 201-206.

Burgoyne PS, Boiland RM, Biggers JD, Lechene CP. Elemental composition of rabbit control fluid during preovulatory follicular swelling. *J. Reprod. Fertil.* 1979, 57: 515-523.

Burkman LJ, Overstreet JW, Katz DF. A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *J. Reprod. Fertil.* 1984, 71: 367-376.

Burns PJ, Reasner DS. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 1995, 15: 377-380.

Casey P, Robertson K, Liu J, Botta S, Drobnis E. Column separation of motile spermatozoa from stallion semen. *Proceedings of the 37th Annual Convention of*

the American Association of Equine Practitioners San Francisco, USA; 1991: 203-210.

Castañeda MJ, Becerril AJ, Valencia MJ. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes de la congelación o después de la descongelación sobre la fertilidad, morfología acrosomal y motilidad de los espermatozoides. *Vet. Méx.* 1996, 27 (1): 11-16.

Chan SYW, Tang LCH, Ma H. Stimulation of the zona-free hamster ova penetration efficiency by human spermatozoa after 17beta.estradiol treatment. *Fertil. Steril.* 1983, 39: 80-84.

Cohen-Dayag A, Ralt D, Tur-Kaspa I, Manor M, Makler A, Dor J et al. Secuential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 786-790.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Hormonas y comunicación intercelular en microorganismos. *Biología Celular Molecular*, México, D.F.: De Labor, 1988.

David A, Frenkel G, Kraicer PF. Chemical composition of rabbit follicular fluid. *Fertil. Steril.* 1973, 24: 227-229.

De Jong FH, Sharpe RM. Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature* 1976, 263: 71-72.

De Robertis EDP, De Robertis EMF. El citoesqueleto y la motilidad celular. Microtúbulos y microfilamentos. En: *Biología Celular y Molecular*. 10ª Edición. México, D.F.: El Ateneo, 1981.

Ebert JD. Interacción del huevo y el espermatozoide. Desarrollo, Sistemas que Interactúan en el Desarrollo. México, D.F.:Compañía Editorial Continental, 1965.

Eissa HM. Concentrations of steroids and biochemical constituents in follicular fluid of buffalo cows during different stages of the oestrus cycle. *Brit. Vet. J.* 1996, 152 (5): 573-581.

Funahashi H, Day BN. Effects of follicular fluids at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99 (1): 97-103.

Ganong WF. Líquidos corporales circulantes. Fisiología Médica. 13ª Edición. México, D.F.: El Manual Moderno, 1992.

Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58: 719.

Gentry A, Zareie M, Liptrap M. Fibronectin concentrations correlate with ovarian follicular size and estradiol values in equine follicular fluid. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 45 (1-2): 91-102.

Ginther OJ, Bergfelt DR. Growth of small follicles and concentrations of FSH during equine cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99: 105-111.

Gnessi L, Fabbri A, Silvestroni L, Moretti C, Fraioli F, Pert CB et al. Evidence for the presence of specific receptors for N-Formyl chemotactic peptides on human spermatozoa. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 1986, 63 (4): 841-846.

Harper MJK. Chapter 5. Sperm and egg transport. In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*. Edited by Austin, C.R. and Short, R.V. 2nd Ed., Cambridge University Press, 1982: 102-127.

Harper MJK. Gamete and zygote transport. In: *The Physiology of Reproduction*. Edited by E. Knobil and JD Neill. 2nd Ed. Raven Press. New York, 1994: 123-188.

Harrison RAP, Dott HM, Foster GC. Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J. Reprod. Fertil.* 1978, 52: 65-73.

Henderson KM, McNeilly AS, Swanston IA. Gonadotrophin and steroids concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J. Reprod. Fertil.* 1982, 65: 467-473.

Henderson KM, Prisk MD, Hudson M, Ball K, McNatty KP, Lun S et al. Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 76: 623-635.

Hernández CJ, Murcia MC, Valencia MJ, Rojas MS, Zárate MJ, Zarco QL. Efecto del líquido folicular equino libre de esteroides sobre la secreción de FSH en ovejas en anestro estacional y la presentación del estro inducido con PGF₂α en ovejas ciclando. *Vet. Méx.* 1997, 28 (2): 117-121.

Horne HW, Thibault JP. Sperm migration through the human female reproductive tract. *Fertil. Steril.* 1962, 13 (2): 135-139.

Hinrichs K, Martin MG, Schmidt AL, Friedman PP. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 104: 149-156.

Hunter RHF, Cook B, Poyser NL. Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.* 1983, 14: 225-232.

Hunter RHF, Nicol R. A pre-ovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 77: 599-606.

Ireland JJ, Curato AD, Wilson J. Effect of charcoal treated bovine follicular fluid on secretion of LH and FSH in ovariectomized heifers. *J. Anim. Sci.* 1983, 57: 1512-1516.

Jasko D, Lein D, Foote R. Stallion spermatozoa morphology and its relationship to spermatozoal motility and fertility. *Proceedings of the 37th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 1991: 211-221.

Jawets E, Melnick JL, Adelberg EA. Relaciones huésped-parásito. *Manual de Microbiología Médica*. 9^a Edición. México, D.F.:El Manual Moderno, 1981.

Khatchadourian C, Menezes Y, Gerard M, Thibault C. Catecholamines within the rabbit oviduct at fertilization time. *Hum. Reprod.* 1987, 2:1-5.

Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* 1996, 45: 787-799.

Lee SL, Kao CC, Wei YH. Antithrombin III enhances the motility and chemotaxis of boar sperm. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994, 107^a (2): 277-282.

Lee SL, Kuo YM, Kao CC, Hong C, Wei YH. Purification of a sperm motility stimulator from porcine follicular fluid. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992, 101B (4): 591-594.

Lippes J, Wagh PV. Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertil. Steril.* 1989, 51 (1): 89-94.

Lobo RA, DiZerega GS, Marrs RP. Follicular fluid steroid levels in dysmature and mature follicles from spontaneous and hyperstimulated cycles in normal and anovulatory women. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 1985, 60 (1): 81-87.

Malmgrem L, Op den Kamp B, Wockener A, Boyle M, Colenbrander B. Motility, velocity and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 1994, 29: 469-476.

McLaren A. Fertilization, cleavage and implantation. In: Hafez ESE (ed.) *Reproduction in Farm Animals*, 3rd edn. Philadelphia: Lea and Febiger, 1974.

Monroy A. La interacción entre óvulos y espermatozoides. *Química y Fisiología de la Fertilización*. México, D.F.: El Manual Moderno, 1969.

Moos J, Peknicovac J, Tesarik J. Protein-protein interactions controlling acrosin release and solubilization during the boar sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 1993, 49 (2): 408-415.

Morales P, Llanos M, Gutiérrez G, Kohen P, Vigil P, Vantman D. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is

highly variable and is related to the steroid content. *Hum. Reprod.* 1992, 7: 646-651.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. Undécima Edición. México, D.F. El Manual Moderno, 1988.

Navarro MMC, Valencia MJ, Vázquez PC, Cózar AE, Villanueva DC. Crude mare follicular fluid exerts chemotactic effect on stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1998, 33 (5): 321-324.

Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 160 (2): 828-833.

Parent S, Bousquet D, Brindle Y, Sullivan R. Binding of albumin to bovine spermatozoa affects their relative buoyant density. *Theriogenology* 1997, 48: 1275-1285.

Parrish J, Susko-Parrish J, Handrow R, Sims M, First, N. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 1989, 40: 1020-1025.

Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Sholmo I, Makler A et al. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 774-785.

Rodríguez-Martínez H, Ekstedt E, Ridderstrale Y. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the female genitalia of pigs during the oestrus cycle. *Acta Anat.* 1991, 140: 41-47.

Roser JF, McCue PM, Hoye E. Inhibin activity in the mare and stallion. *Dom. Anim. Endocrin.* 1994, 11 (1): 87-100.

Sánchez MM. Efecto in vitro de la progesterona, la testosterona y el estradiol sobre la movilidad del espermatozoide humano (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Biología Campus Iztacala UNAM, 1998.

Schmid R, Kato H, Squires EL. Effects of progesterone and follicular fluid during oocyte maturation on embryo development following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in horses. *Theriogenology* 1998, 49(1): 259.

Shalgi R, Kraiser PF, Soferman N. Gases and electrolytes of human follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 1972a, 28: 335-340.

Shalgi R, Kraiser PF, Soferman N. Human follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 1972b, 31: 515-516.

Siegel MS, Graczykowski JW. Influence of follicular fluid on the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1991, 55 (6): 1204-1206.

Silván G, Illera JC, Illera M. Development and validation of competitive ELISA to determine follicular fluid progesterone concentrations. *Theriogenology* 1993, 39: 677-689.

Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. London: McGrawHill, 1980.

Subandrio AL, Noakes DE. Neutrophil migration into the uterine lumen of the cow: The influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. *Theriogenology* 1997, 47: 825-835.

Sultan KM, Bedford JM. Two modifiers of sperm transport within the Fallopian tube of the rat. *J. Reprod. Fertil.* 1996, 108: 179-184.

Szlachter N, Weiss G. Distal tubal pregnancy in a patient with a bicornuate uterus and segmental absence of the Fallopian tube. *Fertil. Steril.* 1979, 32 (5): 602-603.

Thomas P, Ignatz G, Ball B, Brinsko S. Effect of coculture with stallion spermatozoa on the novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 1995, 56 (12): 1657-1662.

Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology* 1998, 49: 905-915.

Uhler ML, Leung A, Chang SYW, Wang C. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 1992, 58: 1191-1198.

Villanueva DC, Arias MJ, Bermejo ML, Vadillo OF. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.* 1995, 64 (6): 1183-1188.

Villanueva DC, Arias MJ, Bustos LH, Vadillo OF. Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.* 1992, 58 (2): 392-395.

Villanueva DC, Vadillo OF, Kably AA, Díaz PMA, Karchmer KS. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1990, 54 (6): 1180-1182.

Ward CR, Kopf GS. Molecular events mediating sperm activation (Review). *Develop. Biol.* 1993, 158: 9-34.

Wassarman PM. The biology and biochemistry of fertilization. *Science* 1987, 235: 553-560.

Wise T. Biochemical analysis of bovine follicular fluid. Albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 1987, 64: 1153-1169.

Zárate MJP. Efecto de la aplicación de líquido folicular equino libre de esteroides sobre la función lútea de ovejas en anestro estacional inducidas a ovular con hCG (tesis de maestría) México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M, 1996.

Zhu JJ, Pacey AA, Barrat CLR, Cooke ID. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American version of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum. Reprod.* 1994, 9: 456-462.

8. ANEXOS.

Se anexan los cuadros que muestran los análisis de varianza (ANOVA) o los cuadrados medios de migración de cada líquido folicular de los diferentes experimentos efectuados.

Cuadro 1. ANOVA para los resultados de migración y no migración de cada LF del experimento 1.

OV	GL	SC	CM	Fcalculada	F α
Modelo	12	2205.51	183.79	6.67	0.0001
Caballo	1	508.67	508.67	18.45	0.0001
T. incubación	3	122.69	40.89	1.48	0.2212
Cámara	2	1013.44	506.72	18.38	0.0001
Interacción TC	6	35.69	5.94	0.22	0.9713
Error	152	4189.83	27.56		
Total corregido	164	6395.34			

Cuadro 2. ANOVA para los resultados de migración específica y no específica de cada LF del experimento 1.

OV	GL	SC	CM	Fcalculada	F α
Modelo	8	1057.94	132.24	4.40	0.0001
Caballo	1	994.14	994.14	33.07	0.0001
T. incubación	3	489.55	163.18	5.43	0.0017
Cámara	1	0.00	0.00	0.00	1.0000
Interacción TC	3	0.00	0.00	0.00	1.0000
Error	95	2855.66	30.05		
Total corregido	103	3913.60			

Cuadro 3. Cuadrados medios para los resultados de migración y no migración de cada LF del experimento 2.

OV	GL	Cámara A	Cámara B	Capilar C
Caballo	3	11.84	3.84	21.44
Error de restriccc.	0	0	0	0
Líquido folicular	4	3.54**	0.74	1.69*
Interacción CL	12	1.76**	0.54	3.23**
Error	50	0.61	0.96	0.50

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

Cuadro 4. Cuadrados medios para la migración y no migración, y para la migración específica y no específica de cada LF del experimento 3.

OV	GL	Migra y no migra	GL	M.esp. y no esp.
Tratamiento LF	4	0.00021	4	0.00000001
Cámara	2	0.24731	1	0.79420161
Interacción LFC	8	0.08140	4	0.00701819
Error	57	0.02108	38	0.03470380