

01669

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Respuesta Quimiotáctica de los Espermatozoides hacia el
Líquido Folicular en Bovinos**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCIÓN ANIMAL: REPRODUCCIÓN**

PRESENTA

MVZ. ALMA YOLANDA GÓMEZ HENAO

DIRECTORES DE TESIS

TUTOR: DMV. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ

M. EN C. CARLOS ARTURO VILLANUEVA DÍAZ

DR. JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS



MÉXICO, DF. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

DECLARACIÓN

TESIS

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Postgrado 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.

MVZ. ALMA YOLANDA GÓMEZ HENAO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alma Yolanda Gómez Henao

FECHA: 25-Oct-2004

FIRMA: Alma Yolanda Gómez Henao

COMITÉ TUTORIAL

DR. JOEL HERNÁNDEZ CERÓN

DR. CARLOS ESQUIVEL LACROIX

DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

DEDICATORIA

A ti Padre Celestial, a tu Hijo Jesucristo; por tu amor, para que pudiese ser capaz de planear, llevar a cabo esta última investigación, después de muchas dificultades económicas y emocionales; permitiéndome los lugares (entidades gubernamentales), los materiales, a las personas que me dieron voluntariamente de tiempo, talentos y dinero.

A mis padres Rosalba y Ricaurte Antonio (Q.E.P.D.), a mis hermanos: Helmer Antonio, Rosalba, Gloria Lucero, Ricaurte Edison, Carlos Julio, Víctor Hugo, Maribel, Sandra Marina, Angélica María, a sus esposos, esposas, hijas e hijos.

AGRADECIMIENTOS

A la FMVZ-UNAM y a la División de estudios de Postgrado, por esta oportunidad, por su colaboración y apoyo.

Al Dr. Javier Valencia Méndez, Director de CEPIPSA, por el tiempo que me dedicó, por su enseñanza como maestro, tutor y por su inteligente apoyo para concluir este trabajo.

Al Dr. José Manuel Berruecos Villalobos, Profesor Emérito de la FMVZ-UNAM, por todo su tiempo dedicado a la interpretación estadística y corrección de esta tesis.

Al Dr. Carlos Arturo Villanueva Díaz, Subdirector de Investigación INPER, quien me concedió la idea del proyecto y diligenció mi permanencia en el INPER; a la Dra. Mirna Echevarría, coordinadora del Dpto. de Andrología quien aprobó mi permanencia en dicho laboratorio; a la Q.F.I. María de los Ángeles Díaz Pérez responsable del laboratorio, persona que me enseñó, me guió y facilitó todo lo concerniente al Laboratorio; a la Q.F.B. Gloria Adriana Flores Reyes por apoyarme en el aprendizaje y manejo dentro del laboratorio, a Celia Martínez Melchor como Ingeniero de Laboratorio por apoyarme en perfeccionamiento de las cámaras. A la Bióloga Eva Vega Hernández por su inducción inicial; al Dr. Fernando Guerra, coordinador de Virología por permitirme el área de microscopios de su laboratorio para tomar diapositivas. A todo el personal del INPER con quienes se relacionó este experimento, por su amistad y apoyo incondicional.

Al rastro de Temamatla y al personal del área de bovinos, así como a los Veterinarios Drs. José Francisco Mendoza Huerta y Sergio Mendoza por su colaboración y apoyo.

Al comité tutorial por sus importantes aportaciones para la aprobación de este trabajo.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias, por su gentileza y diligencia administrativa.

Al Dr. Pedro Cano Ricardo y Julio, por preparar los toros de CEPIPSA, para tomar las muestras.

A Carlos Villegas MVZ, por contribución.

A José Luis Amador, Cecilia y Gabriela Sánchez Téllez por su apoyo.

A la Estaca Contreras y al Barrio Cuicuilco de La Iglesia de Jesucristo de los Santos de los Últimos Días por darme su apoyo incondicional en momentos difíciles.

A Conrada Flores, Araceli y Dianita, María Lourdes Espinosa y Blanca Villamour por su apoyo y amistad.

Al Instituto Federal de Defensoría Pública, al Licenciado José Luís Hernández Martínez.

A la Licenciada María Eugenia Casas Gallardo por su afecto y amistad.

A María Eugenia Domínguez Casas por su apoyo y confianza.

A todos aquellos buenos ciudadanos Mexicanos quienes me brindaron su afecto y apoyo, en éste gran país México.

CONTENIDO

	Portada.	I
	Declaración.	II
	Comité tutorial.	III
	Dedicatorias.	IV
	Agradecimiento.	V
	Tabla de Contenido.	VI
	Lista de Figuras.	VIII
	Lista de Cuadros.	IX
	Resumen.	XI
	Summary.	XII
I.	Introducción.	1
	Antecedentes.	4
	Justificación.	9
	Objetivo General.	10
	Hipótesis.	11
II.	Revisión de Literatura.	12
	Invertebrados:	12
	Atrayentes espermáticos.	12
	Papel fisiológico.	12
	Mecanismos moleculares.	12
	Quimiotaxis en mamíferos:	15
	Técnicas de medición de la quimiotaxis.	15
	Factores que evidencian la ocurrencia de quimiotaxis.	18
	Atrayentes.	18
	Mecanismos moleculares de la espermoquimiotaxis.	19
	Papel fisiológico de la quimiotaxis.	20
	Localización de la quimiotaxis <i>in vivo</i> .	21
III.	Material y Métodos.	23
	Localización.	23
	Número de animales.	23
	Colección de líquido folicular bovino.	23
	Preparación del líquido folicular bovino.	24
	Colección de semen.	24
	Evaluación de semen.	24
	Elaboración de las cámaras de quimiotaxis.	25
	Partes de la cámara de quimiotaxis.	27

	Estandarización de un método.	28
	Experimentos previos.	28
	Ensayos de quimiotaxis.	36
	Metodología estadística.	38
	Porcentaje de migración.	38
	Análisis estadístico.	38
IV.	Resultados.	40
	Porcentaje de migración.	40
	Promedios y desviaciones estándar.	42
	Análisis de varianza para los efectos de toro y muestra.	49
	Correlaciones.	52
V.	Discusión.	56
VI.	Conclusiones.	60
VII.	Literatura citada.	61
VIII.	Anexos.	68
	Anexo 1. Evaluación del semen.	68
	Anexo 2. Composición del HTF; preparación del HTF con ácido hialurónico y del HTF-BSA 7.5%.	70
	Anexo 3. Graduación de la motilidad.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado.	14
Figura 2. Diferentes aparatos.	17
Figura 3. Cámara de quimiotaxis.	26
Figura 4. Partes de la cámara de quimiotaxis.	27
Figura 5. Porcentajes de espermatozoides migrados.	41
Figura 6. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 1.	43
Figura 7. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 2.	44
Figura 8. Promedios de las diferentes variables para la muestra uno del toro 3.	45
Figura 9. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 4.	46
Figura 10. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 5.	47
Figura 11. Promedios para las variables de las muestras de los 5 toros.	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al líquido folicular bovino crudo y sin filtrar.	28
Cuadro 2. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al líquido folicular bovino crudo y sin filtrar.	29
Cuadro 3. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al líquido folicular bovino crudo y sin filtrar.	29
Cuadro 4. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al líquido folicular bovino crudo y sin filtrar.	29
Cuadro 5. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al líquido folicular bovino crudo y sin filtrar.	30
Cuadro 6. Porcentaje de migración total, promedio y desviación estándar de cada uno de los cuadros 1-5.	30
Cuadro 7 Respuesta quimiotáctica de espermatozoides de toro hacia el líquido folicular bovino desnaturalizado, promedio y desviación estándar.	31
Cuadro 8. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro hacia el líquido folicular bovino sin desnaturalizar.	32
Cuadro 9. Quimiotaxis del líquido folicular bovino filtrado y diluido en 25%, 50% y 75%, sobre los espermatozoides humanos.	33
Cuadro 10. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides del toro al líquido folicular bovino filtrado y diluido, en diferentes porcentajes al 25%, 50% y 75%.	34
Cuadro 11. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro al líquido folicular bovino, sin filtrar.	35
Cuadro 12. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular filtrado en bovinos.	36
Cuadro 13. Porcentaje de migración para cada una de las variables en estudio, por cada toro.	40
Cuadro 14. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra en el toro 1.	42
Cuadro 15. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra en el toro 2.	44
Cuadro 16. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra en el toro 3.	45
Cuadro 17. Promedio y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra en el toro 4.	46
Cuadro 18. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra en el toro 5.	47
Cuadro 19. Significancia de las clases y de la interacción, así como el valor R^2 para cada una de las variables, de acuerdo al modelo.	49
Cuadro 20. Significado de los efectos con los modelos reducidos.	50
Cuadro 21. Efecto de la muestra en cada toro, para las variables en estudio.	51

Cuadro 22. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 1.	52
Cuadro 23. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 2.	52
Cuadro 24. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 3.	53
Cuadro 25. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 4.	53
Cuadro 26. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 5.	54
Cuadro 27. Las correlaciones generales entre las variables, usando todos los toros.	55

RESUMEN

GÓMEZ HENAO, ALMA YOLANDA. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular en bovinos. (Bajo la dirección del M. V. Z., D.M.V. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ M. C., M en C. CARLOS VILLANUEVA DÍAZ Y DR .JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS).

La quimiotaxis, definida como la respuesta de células móviles a un gradiente de estímulos químicos ha sido reconocida desde hace más de un siglo, tanto en el reino vegetal como animal. El objetivo de este estudio fue el de verificar la existencia de quimiotaxis de los espermatozoides hacia el líquido folicular en bovinos (LFB). Se obtuvieron 13 eyaculados de 5 toros diferentes, con los que se realizaron 260 ensayos. El LFB se colectó por punción de folículos de diámetro mayor a 0.8mm. La migración de espermatozoides se evaluó en una cámara doble, unidas por un microcapilar, que tenía un orificio central. Estas cámaras se llenaron al mismo tiempo, en una cámara (A) se colocó 1.0 ml de LFB crudo y la otra cámara (B) se llenó con 1.0 ml de HTF-BSA 7.5% (testigo) y el microcapilar (C) se llenó con medio HTF y ácido hialurónico al 0.05%. Se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y luego por el orificio central del capilar, se extrajeron 10µl de líquido, siendo reemplazados por 10µl de semen diluido conteniendo 0.6×10^6 espermatozoides. Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente por 25 minutos, los contenidos de las cámaras y de los tubos capilares se aspiraron y se centrifugaron. Los sedimentos se resuspendieron en 150µl de medio HTF-HSA al 7.5% y se realizó el conteo de espermatozoides. Se encontró que el 50.7% de los espermatozoides migraron hacia el LFB, el 13.8% migró hacia el testigo y el 35.3% permaneció en el capilar. Del total de los espermatozoides que migraron, el 80% lo hizo hacia el LFB y el 19.9% hacia el testigo. El efecto toro fue altamente significativo ($P < 0.01$) en todas las variables. También existió efecto de la muestra ($P < 0.05$) excepto para las variables porcentaje de espermatozoides en A y en C. El alto porcentaje de migración de espermatozoides que migraron hacia LFB demuestra que el líquido folicular ejerce un efecto quimiotáctico hacia los espermatozoides en el bovino.

Palabras clave: Espermatozoide, bovino, líquido folicular, quimiotaxis.

S U M M A R Y

GÓMEZ HENAO, ALMA YOLANDA. Chemotactic response of spermatozoon toward follicular fluid in bovine. (Direction M. V. Z., D.M.V. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ M. C., M en C. CARLOS VILLANUEVA DÍAZ and Dr. JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS).

Chemotaxis, defined as a response of motile cells to the gradient of a chemical stimulus, has been recognized since last century in vegetable and animals. The aim of this study was to verify the existence of chemotaxis of the sperm toward follicular fluid in bovines (BFF), 260 test were perform from thirteen ejaculates obtained from 5 different bulls. The BFF was obtained by puncture of the ovaries, from follicles greater than 0.8mm diameter. Sperm migration was evaluated in a double chamber, communicated with a micro capillary (C), this capillary had a central hole. The chambers were filled at the same time. One of them (A) was filled with 1 ml of crude BFF, and the other (B) with HTF-BSA 7.5% medium (negative control). The micro capillary was filled with 1 ml of HTF medium diluted with 0.05% hialuronic acid. They were incubated for 10 min at room temperature. After that, 10 μ l of fluid was removed from the micro capillary and replace with 10 μ l of diluted sperm containing 0.6×10^6 cells. The chambers were incubated for 25 min at room temperature. Afterwards the content of the chambers and capillary were aspirated and centrifuged. The pellet was mixed in 150 μ l of HTF-BSA 7.5 medium and the sperm count was carried out. It was found that 50.7% of the sperm cells migrated toward the chamber that contained BFF, and only 13.8% to the control chamber, whereas 35.3% remained in the capillary. From the total of migrated sperm cells, 80% traveled toward the BFF and only 19.9% to the control fluid ($P > 0.01$). A significant bull effect ($P < 0.01$) was found in all variables studied. There was also a significant sample effect ($P < 0.05$), except for the percentage of sperm cells in A and C. The higher migration of sperm cells toward the BFF demonstrated that this fluid exerts a chemotactic effect on the bovine sperm.

Key words: bovine, chemotaxis, follicular fluid, spermatozoon.

I. Introducción

Un punto de controversia en la fertilización en los mamíferos, es si existe comunicación del espermatozoide con el óvulo en el aparato reproductor femenino antes del contacto entre ellos o si el contacto entre los gametos es coincidental o por colisión (Eisenbach y Ralt, 1992; Ward y Kopf, 1993; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999; Wassarman *et al.*, 2001).

La quimiotaxis es un mecanismo común de comunicación celular presente en la naturaleza, que se define como la respuesta de células móviles a un gradiente de estímulos químicos, resultando en la modulación de la dirección en que viajan. También puede considerarse como la aproximación a un atrayente o batirse en retirada por la presencia de un quimiorepelente (Ralt *et al.*, 1994; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999; Fabro *et al.*, 2002; Revelli *et al.*, 2002). En el caso de los gametos se considera como movimiento dirigido de células espermáticas a un aumento de gradiente de quimioatrayente secretada desde el óvulo o sus células circundantes (Eisenbach y Ralt, 1992; Eisenbach, 1999a; Sun *et al.*, 2003). En otras palabras, la quimiotaxis es la migración dirigida de las células en respuesta a un gradiente químico (Gnessi *et al.*, 1985; Gnessi *et al.*, 1986).

Es importante recordar que para que ocurra el fenómeno de quimiotaxis, es preciso que exista un gradiente de concentración del quimioatrayente y posteriormente un cambio en la dirección en la que se mueve el espermatozoide; estas dos observaciones permiten distinguir entre quimiotaxis (Ralt *et al.*, 1991) y otras causas potentes de acumulación espermática, como la quimiocinesis y el atrapamiento (Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999). La quimiocinesis es un cambio en la velocidad del desplazamiento de la célula, gobernada por concentración de estímulos. La quimiocinesis es independiente de la dirección de gradientes químicos (Ralt *et al.*, 1994; Isobe *et al.*, 2002). El atrapamiento es la acumulación de células con cierta localización, como resultado de un efecto negativo de un estímulo sobre la motilidad o de efectos mecánicos como la absorción a un capilar (Eisenbach, 1999a).

La quimiotaxis ha sido reportada en helechos por Pfeffer, (1884) y en varios *Philos*, y comprobada en diferentes especies del reino vegetal y animal; estos mecanismos han sido mostrados en moléculas que demuestran propiedades quimiotácticas (Monroy, 1969; Garbers, 1989; Villanueva *et al.*, 1990; Ward y Kopf, 1993; Cook *et al.*, 1994; Vacquier, 1998; Darszon *et al.*, 2001).

La quimiotaxis espermática ha sido probada en las especies marinas con fertilización externa. En mamíferos, la quimiotaxis ha sido bien establecida *in vitro* y correlacionada con la fertilización (Villanueva *et al.*, 1992; Ralf *et al.*, 1991; Navarro, 1998; Fabro *et al.*, 2002).

Un considerable número de autores han demostrado la presencia de quimiotaxis en los mamíferos: conejo, hombre, cerdo, equino; ratón (Dickman, 1963; Villanueva *et al.*, 1990; Siegel y Graczykowski, 1991; Navarro *et al.*, 1998; Navarro, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Fabro *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003). También se ha utilizado el fenómeno de la quimiotaxis para investigar ciertos estados patológicos, en diferentes especies mamíferos, especialmente en lo relacionado con leucocitos, neutrófilos y macrófagos (Cutler, 1974; Zigmond y Hirsch, 1973; Zigmond, 1978; Watson *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 1994; Politis *et al.*, 1996).

La quimiotaxis podría estar actuando a diferentes niveles de interacción entre los gametos como por ejemplo: el reconocimiento celular específico de especie, las interacciones del espermatozoide y del óvulo antes de que se establezca cualquier contacto entre los dos gametos, la atracción del espermatozoide por el óvulo, el transporte selectivo de espermatozoides por quimiotaxis y quimiocinesis, la activación específica de la movilidad espermática, la adhesión específica de las células espermáticas hacia el óvulo, la inducción a la reacción acrosomal, la interacción después de que se ha establecido el contacto físico, la penetración del espermatozoide al ovocito por estructuras asociadas, la membrana de reconocimiento, la activación del óvulo y la fusión de membranas entre el espermatozoide y el óvulo (Monroy, 1969; Wassarman, 1987; Garbers, 1989; Ward y Kopf, 1993; Vacquier, 1998; Wassarman *et al.*, 2001).

Un medio de cultivo es un importante factor que actúa como estimulante y procede como un mecanismo sensorial para el espermatozoide.

Dadas las características químicas y fisiológicas del fluido tubal humano¹ (HTF), se propuso este medio HTF como testigo en este estudio; el cual contiene normalmente los componentes del fluido folicular durante la fase ovulatoria (Cai y Marik, 1990), se han formulado medios de cultivo basados en la composición del fluido tubal, permitiendo a los óvulos de oveja y vaca ser cultivados desde 1 a 8 células hasta el estadio de mórula y blastocisto, dando como resultado una alta sobrevivencia embrionaria después de haber sido transferido los óvulos cultivados a recipientes animales (Tervit *et al.*, 1972). Basado en estos conceptos Quinn *et al.*, (1985) reportaron el uso del HTF en humanos ya que mejoró significativamente el desarrollo de blastocistos y también aumentó significativamente el porcentaje de preñeces, elevando al triple el número de preñeces cuyos gametos han sido fertilizados y cultivados en HTF (30% de 60 transferencias).

Desde hace varios años se ha utilizado el fluido folicular como un medio de cultivo y como quimioatrayente, en diversas investigaciones (Tesarik, 1985; Suárez *et al.*, 1986; Herriot *et al.*, 1986; Yee Cummings, 1988; Villanueva *et al.*, 1990; Siegel y Graczykowski,

¹ (HTF, medio de cultivo a base de fluido tubal humano/Irving Scientific, Santa Ana, CA, USA).

1991; Wadson *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1999; Isobe *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003;) esto se hace con el objeto de mejorar la fertilización. Por ejemplo se midió la acción quimiotáctica de granulocitos que migraron a través de una membrana de 3.0 μ m hacia el líquido folicular humano que fue significativo para ciclos conceptuales, comparados con aquellos en los que no ocurrió la concepción (Herriot *et al.*, 1986).

El espermatozoide humano tratado con fluido folicular humano incrementa la reacción acrosomal, mejorando el enlace y la penetración a la zona pelúcida del óvulo del hámster (Suárez *et al.*, 1986; Yee y Cummings, 1988). Esta estimulación puede ocurrir por factores presentes en el mencionado fluido folicular. La incidencia de la reacción acrosomal es significativamente mayor al ser incubados los espermatozoides con fluido folicular después de 15 horas, comparada con la respuesta de preincubación a las 5 horas; mientras que el ionóforo A23187 no produce ninguna diferencia significativa de la reacción acrosomal entre 5 y 15 horas (Tesarik, 1985).

El fluido folicular porcino de folículos preovulatorios (diámetro mayor a 0.5 mm) en diluciones de 25% y 50% aumenta el índice de penetración de espermatozoides humanos en ovocitos de Hámster, comparado con las diluciones de 25% y 50% de folículos menores a 3 mm de diámetro y de los testigos. Esto demuestra que es posible que algunos factores presentes sean inherentes al fluido folicular y que no son específicos de la especie (Siegel y Graczykowski, 1991). También se propone la posibilidad de que los espermatozoides sean quimiotácticamente selectivos solamente en ciertos estados fisiológicos del fluido folicular o del moco cervical, ya que *in vivo* este último ejerce un papel importante en el proceso de capacitación (Lambert *et al.*, 1985). Tal sería el caso de la capacitación [estado en el cual el espermatozoide posee el potencial para sufrir la reacción acrosomal (RA)] y de la RA [(liberación de enzimas proteolíticas que habilitan al espermatozoide para penetrar a través de las capas del óvulo para fertilizarlo), (Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Darszon *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001)].

Villanueva *et al.*, (1990) presentaron la primera evidencia experimental de quimiotaxis en humanos *in vitro*, en el cual se comparó la respuesta quimiotáctica del fluido folicular maduro (líquido folicular proveniente de folículos con óvulos maduros) y no maduros. El 75% de los espermatozoides migraron hacia los pozos que contenían el líquido folicular, pero solamente el proveniente de folículos maduros.

Isobe *et al.*, (2002) demostró el efecto quimiotáctico de un quimiocin del líquido folicular, regulador en asociación normal T expresado y secretado (RANTES).

Sun *et al.*, (2003) observaron que los espermatozoides de humano y conejo mostraron respuesta quimiotáctica para factores del líquido folicular de conejo y bovino.

En reportes *in vitro*, se ha demostrado la quimiotaxis espermática por factores foliculares, correlacionando este fenómeno con la habilidad de fertilizar el huevo, lo

que podría tener una potente implicación clínica en el tratamiento de la infertilidad (Ralt *et al.*, 1991).

A n t e c e d e n t e s

Pfeffer (1884) encontró que la quimiotaxis es un fenómeno que ocurre normalmente en la fertilización en los helechos, señalando al ácido α -málico presente en el prótalo, como la sustancia responsable de este efecto sobre los gametos masculinos del helecho, demostrando que el espermatozoide de diferentes plantas migra quimiotácticamente hacia el arquegonio.

Algunos trabajos han identificado los factores que modulan los movimientos quimiotácticos de los espermatozoides en especies invertebradas marinas, en las que la fertilización es extracorpórea y el gameto femenino se desova en la marea o en el fondo del mar en un medio hostil, como ocurre en los equinodermos (erizo de mar, estrella de mar, etc.).

Lillie, (1913), postula la teoría de que el óvulo no fertilizado secreta continuamente una sustancia activa denominada "fertilizina" (concebida como una molécula bipolar, en la que uno de los polos constituye el grupo ovófilo y el otro polo el grupo espermófilo). Esta sustancia aglutina y estimula los espermatozoides en el agua ovular (agua de mar donde la hembra deposita sus óvulos) y en la capa gelatinosa del óvulo disuelta en el agua de mar. La fertilizina deja de secretarse en el momento de la fertilización y entonces los sitios receptores localizados en las superficies de los espermatozoides reaccionan y se unen a los grupos espermófilos de las moléculas de fertilizina localizadas en la superficie del óvulo. Como resultado, cada grupo espermófilo se une a una molécula de antifertilizina (sustancia que se supone existe dentro del óvulo) previniendo así la polispermia.

Se ha encontrado en los erizos de mar (*Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Anthodidraris crassispina* y la estrella de mar *Japonese*), con la distribución de la capa gelatinosa de los óvulos en agua de mar-HEPES y a diferentes pH, que la respiración y motilidad espermática se reducen a pH bajos; la respiración espermática aumenta a mayor densidad espermática, pero una molécula presente en la capa gelatinosa de los óvulos del erizo de mar puede activar el espermatozoide y preservar su actividad en el agua de mar durante su paso a través del medio ambiente ácido de la capa gelatinosa y alcanzar el ovocito. El pH óptimo para la activación espermática causada por el agua ovular fue del rango de pH de 6.5 a 7.4 (Ohtake, 1976a).

Ohtake, (1976b) encontró una sustancia espermioactivadora (SAS) en el *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Pseudocentrotus depressus* la cual ha sido purificada parcialmente con un peso molar de 630 KDa soluble en alcohol, lábil en una dilución alcalina o en una solución ácida y no volátil, para los erizos de mar.

Susuki *et al.*, (1981) purificó y aisló la estructura de dos péptidos (H1 y H2) a partir de la gelatina del erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus*, de 30 y 50 n moles respectivamente y sus secuencias son H1 (Gly-Phe-Asp-Leu-Thr-Gly-Gly-Gly-Val), H2 (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly), estos péptidos H1 y H2 estimulan la respiración espermiática.

En la *Arbacia Punctulata* se aisló y se identificó de la capa gelatinosa del óvulo un péptido activador de la respiración espermiática, al que se denominó (*Resact*) y que consta de 14 aminoácidos, (Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu-NH₂). Este péptido incrementa la respiración y la motilidad espermiática y eleva las concentraciones del monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) del espermatozoide en 5 segundos; mientras que el monensin y el NH₄Cl lo hacen entre 2-5 minutos (Suzuki *et al.*, 1984).

También se aisló un péptido activador de los espermatozoides (*Speract*) de la capa gelatinosa del óvulo de *Strogylocentrotus Purpuratus* o *Hemicentrotus pulcherrimus*. Para esto se requirieron 5000 hembras de erizo de mar, de las que se obtuvo 1Kg de huevos y de ellos se aislaron 9 mg del péptido. *Speract* es un potente estimulador de la respiración de los espermatozoides del erizo de mar produciendo elevación del AMP_c (Hansbrough y Garbers, 1981). El *Speract* ha sido secuenciado y sintetizado (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly), conteniendo residuos de Lys y Arg y un terminal modificado NH₂; también se encontraron algunos análogos pero no son tan potentes como el *Speract* nativo (Garbers *et al.*, 1982).

Los dos péptidos más estudiados son el *Speract* y el *Resact*. En este último no se detectó reacción cruzada con los espermatozoides de otra especie, pero *Speract* sí presentó reacción cruzada con los espermatozoides del erizo de mar *Lytechinus pictus* (Ohtake, 1976b; Susuki *et al.*, 1981; Suzuki *et al.*, 1984)

Ward *et al.*, (1985) presentaron la primera evidencia de que *Resact* es potente quimioatrayente para las células espermiáticas de *Asbacia Punctulata*, presentando absoluta dependencia de Ca²⁺ externo alrededor del agua ovular, lo que puede ser significativo para entender estos mecanismos quimiotáticos.

Estudios previos reportan la presencia de un factor activador y atrayente del espermatozoide (SAAF), el cual es liberado por los ovocitos en el agua ovular de *Ascidian*, *Ciona savignyi*. Esta activación depende o es inducida por el aumento de AMP_c causada por la afluencia de Ca²⁺, a través de canales de Ca tipo-T; el Ca²⁺ extracelular sólo media la espermo-quimiotaxis, por lo que la activación y la atracción son fenómenos separados (Yoshida *et al.*, 1994).

En otros trabajos se ha encontrado que el péptido sintético N-formylmethionyl es quimiotático para los leucocitos polimorfonucleares (para los neutrófilos de exudado

de conejo y para macrófagos de exudado peritoneal del cuye). Los neutrófilos y los macrófagos responden en forma similar, lo que sugiere la presencia de receptores similares para estos compuestos en estas células. El N-formylmethionine, otro péptido, presenta muy baja quimiotaxis para los neutrófilos intraperitoneal de conejo y ninguna para los macrófagos (Schiffmann *et al.*, 1975). También los péptidos F-Met-Leu-Phe y F-Met-Met-Met inducen la migración de neutrófilos de exudado intraperitoneal del cuye, lo que se relaciona con la habilidad de inducir la secreción de enzimas lisosomales y B-glucoronidasa cuando los neutrófilos son resuspendidos en 10µg/ml de cytochalasin B (Showell *et al.*, 1976). Además el líquido folicular de yegua actuó significativamente, como quimiotáctico para neutrófilos, efecto que se redujo al calor y por tripsinización y se redujo significativamente por diálisis (Wadson *et al.*, 1991).

Posteriormente se reportó la habilidad de un péptido sintético de la familia del N-Formyl-metionil-leucil-fenilalanina (N-F Met-Leu-Phe), como un quimioatrayente potente y específico capaz de interactuar con receptores en la superficie de las células espermáticas del semen de toro (Iqbal *et al.*, 1980).

Gnessi *et al.*, (1985) compararon la actividad quimiotáctica de 9 péptidos de la familia N-Formyl para los espermatozoides humanos, reafirmando una alta respuesta espermototáctica de la secuencia F-Met-Leu-Phe-Phe y F-Met-Leu-Phe. La más baja actividad fue para Met-Phe-Met, demostrando la necesidad de la presencia del N-terminal del grupo formyl; además se encontró que a mayor concentración de gradientes, mayor es el número de células migratorias y cuando el antagonista Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe estuvo presente, fue capaz de reducir la respuesta de los diferentes péptidos (Gnessi *et al.*, 1985). En posterior observación, se calculó en 60,000 el número de sitios de enlace-receptor por cada célula espermática (Gnessi *et al.*, 1986).

En otras observaciones: Dickman (1963) presentó alguna evidencia de la existencia de quimiotaxis en los mamíferos *in vivo*. Diez a doce horas antes del apareamiento se transfirieron óvulos de rata y de coneja (4 huevos de rata tienen aproximadamente el área de la superficie de un óvulo de coneja) hacia los oviductos izquierdos de las conejas, a las que 24 horas antes del apareamiento se le había removido el ovario izquierdo. Siete a once horas después de la transferencia se recuperaron los oviductos y se halló que más espermatozoides se hallaban adheridos a los óvulos de coneja que a los óvulos de rata, aunque ambos óvulos tenían igual oportunidad de colisión con los espermatozoides de conejo. La preponderancia de los espermatozoides en los ovocitos de coneja indican una influencia quimiotáctica sobre los espermatozoides de conejo y Fabro *et al.*, (2002) observó *in vitro* respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de conejo para factores del líquido folicular.

Un mecanismo complejo en los mamíferos (mujer, vaca, cerda, oveja, coneja) es la migración de los espermatozoides a través del aparato genital de la hembra hacia la región del ámpula del oviducto, donde los espermatozoides encuentran al óvulo y lo

fertilizan. Previo a esto, una considerable fracción de los espermatozoides eyaculados se almacena en el istmo del oviducto en un estado de movilidad reducida hasta que ocurre la ovulación. En ese momento los espermatozoides recuperan su movilidad alcanzando el sitio del ámpula en pocos minutos (Overstreet y Cooper, 1975; Flechon y Hunter, 1981; Lambert *et al.*, 1985; Wassarman, 1987; Ward y Kopf, 1993; Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994; Hafez, 1996, Vacquier, 1998; Wassarman *et al.*, 2001).

La evidencia de la comunicación entre el óvulo y el espermatozoide en mamíferos, mediada por señales químicas, depende de una substancia presente solamente en el líquido folicular crudo de folículos maduros (Villanueva *et al.*, 1990). Otros autores han corroborado este hallazgo (Siegel y Graczykowski, 1991; Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994; Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Villanueva-Díaz *et al.*, 1995; Fabro *et al.*, 2002).

Ralt *et al.*, (1991; 1994) también investigaron la quimiotaxis con líquido folicular humano pero diluido, llegando a las mismas conclusiones.

Se han evaluado nuevos modelos para el estudio de la quimiotaxis (Villanueva-Díaz *et al.*, 1992; Makler *et al.*, 1992). Estos modelos son un esfuerzo experimental por imitar las condiciones fisiológicas inherentes al encuentro entre las dos células germinales.

Utilizando el mismo procedimiento de Villanueva *et al.*, (1992), recientemente se pudo comprobar una respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular crudo en el equino (Navarro, 1998; Navarro *et al.*, 1998).

Los hallazgos encaminados a la identificación de los factores que modulan la quimiotaxis en los espermatozoides humanos, demuestran la presencia de un compuesto en el líquido folicular de folículos maduros. Se ha propuesto que dicho factor es un compuesto proteico resistente a la tripsina, de bajo peso molecular (≤ 1000 Da), dializable, resistente a altas temperaturas (100°C) y pH bajos (3.5) y que conserva su actividad quimiotáctica en la fracción lipídica aún después del tratamiento térmico o con enzimas proteolíticas (Fetterolf *et al.*, 1994; Vadillo *et al.*, 1994; Villanueva *et al.*, 1995).

Un posible candidato es la progesterona, ya que esta molécula es capaz de actuar como quimiotáctico para el espermatozoide humano en concentraciones que corresponden a las encontradas en el líquido folicular de la etapa pos-ruptura del folículo. Esto permite postular que la progesterona pueda ser el factor quimiotáctico contenido en el líquido folicular que sirve como señal fisiológica permitiendo el encuentro entre el óvulo y el espermatozoide. El fraccionamiento de la señal quimiotáctica contenida en el líquido folicular al ser sometida a diferentes procedimientos, revela que el compuesto activo manifiesta propiedades fisicoquímicas que coinciden con la naturaleza molecular de este esteroide (Vadillo *et al.*, 1994; Villanueva *et al.*, 1995). Por otra parte Vázquez (1997) indica que la progesterona adicionada a medios de cultivo del espermatozoide de cerdo, no lavado y no

preincubado, puede contribuir a inducir la reacción acrosomal y a preservar la viabilidad de los espermatozoides. Así, el estudio efectuado por Wijayagunawardane *et al.*, (1998), indica que la progesterona se halla en mayor concentración en el oviducto ipsilateral al cuerpo lúteo, además concluye que la progesterona (P₄), el estradiol (E₂) y la oxitocina (OT) ovárica y la prostaglandina (PGE₂) y ET-I oviductal, pueden controlar sinérgicamente las contracciones del oviducto, para un óptimo transporte embrionario. Estos resultados proveen otra evidencia de una liberación local de esteroides ováricos en la parte adyacente del aparato reproductivo y que pueden influir en la quimiotaxis.

Otra observación consideró a la progesterona como un débil quimioatrayente del líquido folicular, propuso que la acumulación espermática en presencia de progesterona es debida principalmente al atrapamiento por hiperactividad de la motilidad espermática. La eliminación de la progesterona del líquido folicular, no disminuyó la quimiotaxis del líquido folicular hacia los espermatozoides de humano (Jaiswal *et al.*, 1999).

Otro compuesto presente en el líquido folicular es el quimiocina regulador en la activación normal T expresado y secretado (RANTES), se postuló como espermoquimiotáctico, se demostró que el ARNm para receptores RANTES (CCR-1 y CCR-5) estuvieron presentes en el espermatozoide de humano (Isobe *et al.*, 2002).

En otras especies domésticas no se ha definido aún la participación de mecanismos similares en el fenómeno reproductivo. Sin embargo, la probabilidad de que esto ocurra en bovinos es alta, si se considera que la quimiotaxis descansa en mecanismos similares a los reportados en el humano, por lo que en este trabajo se pretende probar si el líquido folicular crudo de bovino ejerce quimiotaxis sobre los espermatozoides en fresco de la misma especie.

Los bovinos son parte integral de la ganadería en todo el mundo, pues proveen a la población diferentes productos para su alimentación. Determinar la existencia de un fenómeno de quimiotaxis entre el óvulo y el espermatozoide en esta especie sería de gran importancia para mejorar la fertilización *in vitro* con el fin de obtener grandes cantidades de embriones o bien para resolver algunos problemas de infertilidad, como es el caso de hembras en las que el transporte espermático se encuentra alterado.

Además, en el presente estudio se pretenden modificar las cámaras de quimiotaxis para evitar los problemas observados con los modelos previamente utilizados, como son la nivelación de las cámaras, el escape de líquidos en la unión con el capilar y la falla en la precisión en la colocación y extracción de los diferentes líquidos. Esto permitió estandarizar un método para el estudio de la quimiotaxis en bovino, para determinar si el líquido folicular bovino ejerce quimiotaxis sobre los espermatozoides de la misma especie.

Justificación

El estudio de la quimiotaxis en las especies de fertilización interna constituye una herramienta de gran importancia para evaluar algunos aspectos reproductivos que interactúan en la fertilidad.

Existe muy poca información acerca de los mecanismos de quimiotaxis en los mamíferos, específicamente en los animales domésticos.

La ocurrencia de la quimiotaxis en los mamíferos de fertilización interna es de gran importancia en la actualidad, ya que abre las puertas a nuevos estudios sobre el encuentro de los gametos *in vivo* e *in vitro*, siendo además un aporte para la investigación de la quimiotaxis en diferentes especies, en especial considerando que dicha atracción está relacionada con la fertilización. Esto puede servir para estudiar casos de esterilidad de origen no conocido.

La quimiotaxis puede servir como herramienta para los casos en los cuales el transporte espermático se encuentra alterado como son aquellos casos en los que las hembras son sometidas a tratamientos hormonales, como la superovulación y la sincronización del celo, o bien en la inseminación con semen congelado por vía cervical en el ovino, en donde se ha encontrado que pocos espermatozoides alcanzan el sitio de la fertilización.

También sería importante cuando se insemina con una cantidad reducida de espermatozoides, como en el caso de la aplicación del semen sexado.

Objetivo General

Determinar si el líquido folicular bovino ejerce quimiotaxis sobre los espermatozoides de la misma especie.

Objetivos Específicos

- Estandarizar el método para el estudio de la quimiotaxis para el espermatozoide del bovino.
- Analizar la migración específica de espermatozoides de bovino hacia el líquido folicular de la misma especie, en un sistema *in vitro*.

Hipótesis

El porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras con líquido folicular, excede al porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras con líquido testigo, después de incubarlas por 25 minutos a temperatura ambiente.

- Los espermatozoides de bovino responden al efecto quimiotáctico del líquido folicular bovino en el sistema *in vitro* propuesto.

II. Revisión de Literatura

Desde hace más de un siglo se han llevado a cabo diferentes estudios a fin de esclarecer la existencia de la quimiotaxis en el reino vegetal y animal. En lo referente al reino animal, en algunas especies (invertebrados y vertebrados) se ha establecido la presencia de dicho fenómeno.

Invertebrados

La quimiotaxis ha sido establecida y aceptada desde mediados de 1960 en invertebrados marinos como los equinodermos (erizos de mar, estrella de mar), en los que la fertilización es externa. (Eisenbach, 1999a,b).

Atrayentes espermáticos

En algunos invertebrados se han purificado e identificado algunas sustancias quimioatrayentes para los espermatozoides, que han sido aisladas de los corales duros y blandos. Estas sustancias parecen ser lípidos y se designan como compuestos 1,2 y 3. En el cangrejo herradura *Limulus polyphemus*, se purificó parcialmente un factor iniciador de la motilidad espermática (SMI) necesario para la RA (Ward y Kopf 1993). En *Ciona savignyi* el SAAF (Yoshida *et al.*, 1994). En *ascidian* fue purificado y caracterizado un esteroide sulfatado 3, 4, 7, 26 tetrahydroxy colestane bisulfato-3, 26 (, Yoshida *et al.*, 2002) y en erizos de mar sustancias como SAS (Ohtake, 1976b) y los péptidos como H1, H2 (Susuki *et al.*, 1981), Resact (Susuki *et al.*, 1984), Speract (Hansbrough y Garbers, 1981) que estimulan la respiración y la motilidad (Ward *et al.*, 1985; Eisenbach, 1999a).

Papel fisiológico

El papel fisiológico de la espermoquimiotaxis es atraer tantos espermatozoides como sea posible hacia el óvulo (Eisenbach, 1999a). La interacción de diferentes componentes de la capa gelatinosa de algunos invertebrados provoca respuestas fisiológicas en el espermatozoide como la estimulación de la motilidad, de la respiración, quimiotaxis y RA, que podría representar el mecanismo por el cual la función espermática es regulada *in situ*, presentando cambios en la conducta de desplazamiento (Ward y Kopf, 1993, Cook *et al.*, 1994).

Mecanismos moleculares

Muy poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares que operan en la quimiotaxis. En algunos erizos de mar, *hydroides* y en la especie *ascidian*, se conoce que la espermoquimiotaxis requiere de Ca^{2+} (Ward *et al.*, 1985; Yoshida *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1994). Posiblemente por esto, las concentraciones del Ca^{2+} intracelular en espermatozoides de erizos de mar, puede ser modulada por los péptidos de actividad espermática como el Resact y el Speract.

Si ambos péptidos afectan las concentraciones de Ca^{2+} , se propone que quizás los péptidos activadores de espermatozoides en general usen mecanismos similares para controlar las concentraciones intracelulares del Ca^{2+} y por lo tanto, controlen la conducta de desplazamiento espermático en la quimiotaxis (Cook *et al.*, 1994, Darszon *et al.*, 2001).

Por lo anterior Cook *et al.*, (1994), proponen un modelo de mecanismo molecular de quimiotaxis espermática para erizos de mar (Fig. 1); en este modelo, el aumento de la concentración del quimioatractivo activa al receptor, provoca la activación de la guanilato ciclasa (Gcase). Como consecuencia hay un incremento en monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), causando la apertura de los canales de potasio (K^+), se presenta una hiperpolarización y se bloquea la entrada de Ca^{2+} , resultando un decremento del Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+} in). Esto permite al espermatozoide un desplazamiento natatorio lineal hacia el atrayente o el origen de atracción. Inversamente, cuando decrecen las fuentes del atrayente, el Gcase se desactiva y el cGMP se reduce, por lo que se cierran los canales de K^+ y en la membrana potencial se activa el intercambio de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ y se incrementa el pH intracelular (pH in). Al mismo tiempo, se activa la adenilato ciclasa (Acase) y se incrementan las concentraciones de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) lo que a su vez sensibiliza los canales de Ca^{2+} , activándolos. El resultado es un incremento transitorio en las concentraciones del Ca^{2+} intracelular, lo que ocasiona asimetría flagelar y reorientación de los espermatozoides hasta que ellos son dirigidos hacia el óvulo, esto puede ocurrir repetidamente.

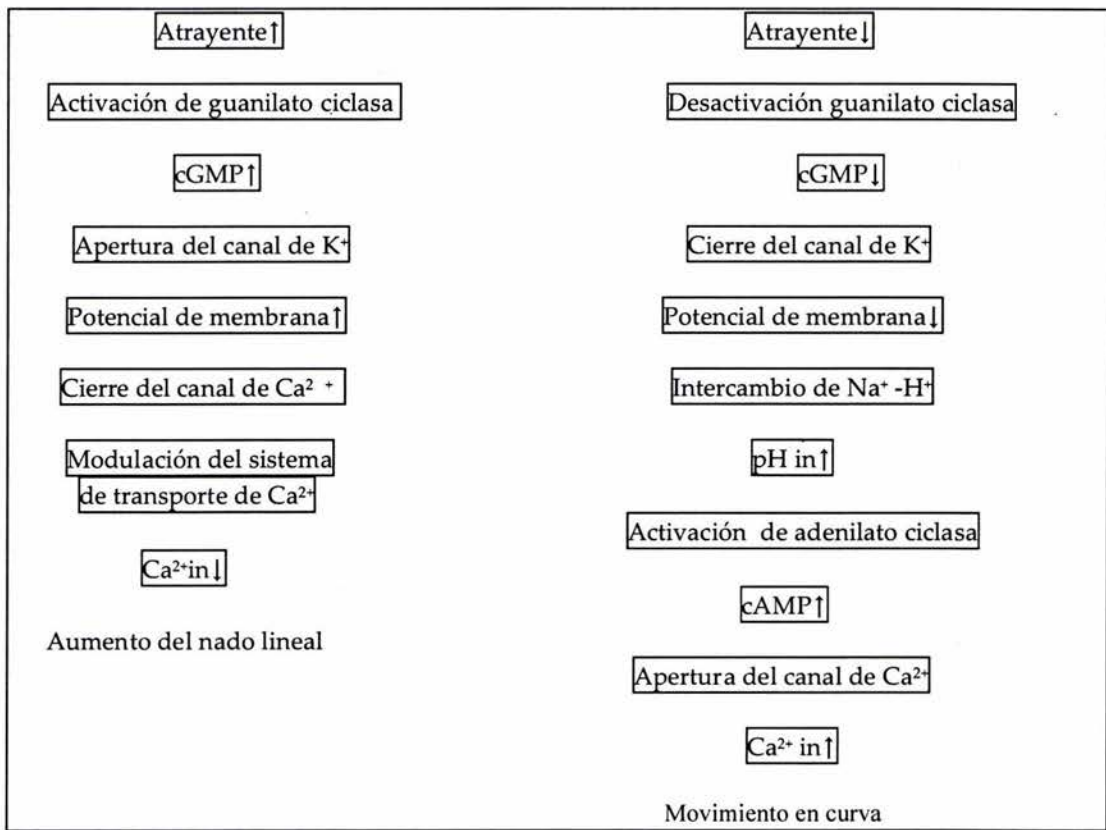


Figura 1. Esquema simplificado de un modelo propuesto por Cook *et al.*, (1994), para quimiotaxis en erizos de mar, las flechas en los cuadros indican aumento o decremento respectivamente (Eisenbach, 1999a).

La Quimiotaxis en mamíferos

En los mamíferos la existencia de quimiotaxis ha sido muy debatida y difícil de aceptar. Las razones que se han expuesto son: 1. En mamíferos un gran número de espermatozoides son eyaculados directamente dentro del aparato reproductor femenino, donde muchos espermatozoides pueden alcanzar el óvulo por casualidad, evitando así la necesidad de quimiotaxis. 2. La dificultad de las técnicas para estudiar expermotaxis en mamíferos, lo cual impide la comprobación de evidencias concluyentes (Eisenbach, 1999 a,b). Sin embargo un número de observaciones efectuadas *in vitro* en diferentes especies (humanos, ratones, conejos, equinos), aumenta la posibilidad de que el líquido folicular contenga factores quimiotácticos y la quimiotaxis pueda estar involucrada en la fertilización (Eisenbach y Ralf, 1992; Hunter, 1993; Villanueva *et al.*, 1990; Ralt *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991; Vadillo *et al.*, 1994; Villanueva *et al.*, 1995; Navarro, 1998; Oliveira *et al.*, 1999, Fabro *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003).

Técnicas de medición de la quimiotaxis

Se han diseñado diferentes formas para medir la quimiotaxis:

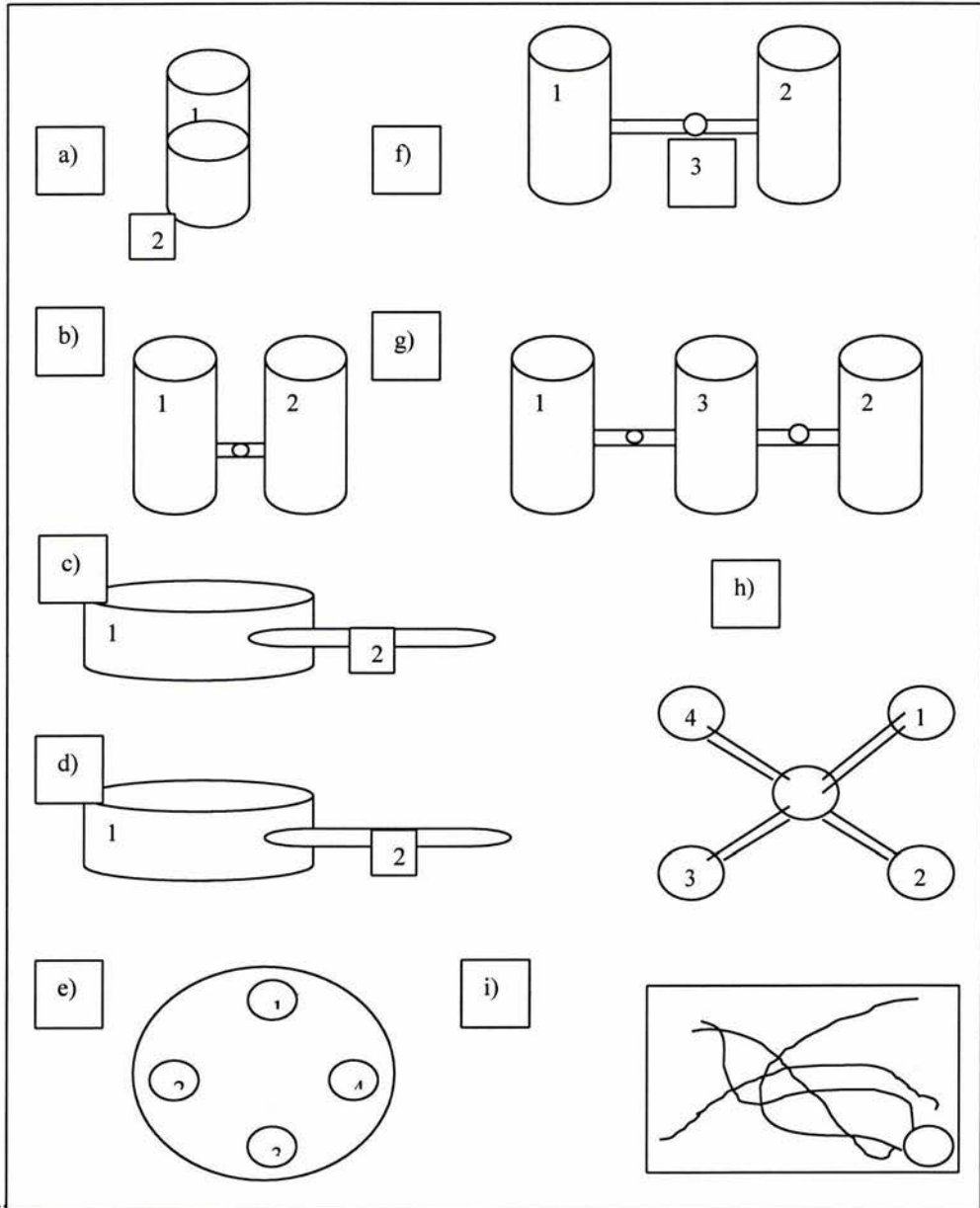
A.- Gradientes ascendentes del atrayente: en este tipo de medición existen dos reservorios uno contiene los espermatozoides y el otro contiene el atrayente; cada reservorio es separado por una membrana delgada de policarbonato o por un tubo (Fig. 2a y 2b), también otras cámaras están compuestas por un capilar que contiene el atrayente y es sumergido en el pozo que contiene el reservorio de espermatozoides (Fig. 2c), en estos los gradientes son establecidos por difusión; la desventaja de esta técnica es que no se distingue entre quimiotaxis y una causa de acumulación. (Schiffman *et al.*, 1975; Iqbal *et al.*, 1980; Gnessi 1885,1986; Ralt *et al.*, 1991 ; Zamir *et al.*, 1993).

B.- Gradientes descendentes: (Fig. 2d), es la técnica de capilar invertido en donde los espermatozoides son suspendidos en la substancia que contiene el atrayente y colocada esta dilución en el pozo, en el capilar se deposita el reservorio atrayente o el control (testigo). En este tipo de medición cuando el capilar contiene el control el espermatozoide siente gradientes descendentes y cuando el capilar contiene atrayente no se perciben los gradientes del todo (Zamir *et al.*, 1993; Ralt *et al.*, 1994; Isobe *et al.*, 2002); este tipo de análisis se distingue entre quimiotaxis, quimicinesis y atrapamiento.

C.- Análisis selectivo: en el cual los espermatozoides eligen entre los dos pozos o cámaras, unidos por un capilar (Fig. 2f), un pozo contiene el atrayente y el otro contiene el testigo. En el capilar que los une se colocan los espermatozoides a través de un orificio central (Villanueva *et al.*, 1992; Navarro, 1998; Navarro *et al.*, 1998; Isobe *et al.*, 2002). Otras cámaras o pozos designados a hacer mediciones macroscópicas de dos,

tres o cinco pozos conectados a un tubo o ranura (Fig. 2g, 2h) este tipo de medición distinguen entre quimiotaxis y quimioquinesis, pero no distingue el atrapamiento. También una cámara sellada para mediciones microscópicas (Fig. 2e), en esta cámara un pozo contiene el líquido testigo, otro el atrayente y las otras dos contienen espermatozoides, también existe la cámara de Zigmond descrita por Oliveira *et al.*, (1999) y Fabro *et al.*, (2002), (Zigmond y Hirsch, 1973; Zigmond, 1978; Makler *et al.*, 1992; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1994; Jaiswal *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 1999; Fabro *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003).

D: Análisis de rastreo. Este puede hacerse manualmente en microscopio en un portaobjetos o por uso de análisis de sistema computarizado, haciendo el rastreo de espermatozoides, en su desplazamiento hacia el quimioatrayente o retiro de un quimiorepelente (Fig. 2i), (Ralt *et al.*, 1991; Cohen-Dayag *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1999).



a)	d)	g)
1. atrayente	1. atrayente y espermatozoides	1. atrayente
2. espermatozoides	2. atrayente	2. atrayente o testigo
b)	e)	3. espermatozoides
1. espermatozoides.	1. espermatozoides	h)
2. atrayente	2. testigo	1. atrayente I
c)	3. espermatozoides	2. atrayente II
1. espermatozoides	4. testigo	3. atrayente III
2. testigo	f)	4. atrayente IV
	1. atrayente	5. espermatozoides
	2. testigo	i)
	3. espermatozoides	Análisis de rastreo

Figura 2. Diferentes aparatos utilizados para el estudio de quimiotaxis (Eisenbach, 1999).

Factores que evidencian la ocurrencia de quimiotaxis

Hansen *et al.*, (1991) encontraron un 5% de líquido folicular presente en el oviducto de cerdas jóvenes, examinadas a las 42 y 46 horas después de haber sido inyectadas con hCG, la presencia del líquido folicular va decreciendo conforme pasan más horas. Al examinar los espermatozoides presentes en el ampulla, en el istmo y en los cuernos del útero, el mayor porcentaje de espermatozoides con RA fue en el ampulla, considerándose que esta respuesta es debida a alguna influencia, producto de la ovulación.

Los espermatozoides usualmente en el istmo, se hallan en un medio de alto contenido mucoso y en un lumen angosto, lo cual impide su desplazamiento hacia adelante y frecuentemente, la cabeza del espermatozoide está adherida al epitelio del oviducto; es ahí donde tienen contacto con carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos (Suárez, 1998). Al ocurrir la ovulación algunos espermatozoides recuperan su alta motilidad y la distancia entre el istmo y el ampulla la recorren en minutos (Hunter, 1993).

Solamente los espermatozoides capacitados poseen el potencial de sufrir la RA y son los espermatozoides que están en el epitelio y que son liberados desde el sitio de almacenamiento (Lefebvre y Suárez, 1996). Este hallazgo permite proponer que podría existir una señal para la liberación que actúa en el espermatozoide capacitado o en el oviducto o que ocurre con la ovulación. Sin embargo, el hecho de que múltiples espermatozoides no arriben juntos a un solo ovocito, sugiere que cada espermatozoide es guiado por un solo ovocito y que hay un mecanismo que informa que el óvulo ha sido activado por el espermatozoide y previene el arribo de otros espermatozoides al menos por corto tiempo (Hunter, 1993; Eisembach, 1999b).

Atrayentes

Se ha afirmado que el líquido folicular contiene un factor atrayente que responde a un péptido resistente al calor (Villanueva *et al.*, 1995; Ralf *et al.*, 1994). Otros atrayentes que han sido estudiados son la progesterona, el péptido atrial natriurético (ANP), la heparina, la epinefrina, la adrenalina, la oxitocina, la calcitonina, la acetilcolina, RANTES (Zamir *et al.*, 1993; Vadillo *et al.*, 1994; Eisenbach, 1999a; Isobe *et al.*, 2002).

Progesterona: Villanueva *et al.*, (1995), demostraron que al someter el líquido folicular a diálisis se disminuyó el efecto quimiotáctico; que el tratamiento del fluido folicular al calor o a la tripsina no afectó la quimiotaxis y que el extracto lipídico del fluido folicular causó quimiotaxis (Fetterolf *et al.*, 1994). Además, estos autores preincubaron espermatozoides humanos con un receptor antagonista para progesterona y eliminaron

la quimiotaxis. Con base en estas observaciones Villanueva *et al.*, (1995), sugirieron que la progesterona es el atrayente del fluido folicular.

Otros hallazgos reportaron que la remoción de la progesterona del fluido folicular no elimina el efecto quimiotáctico, pero sí elimina la habilidad para causar hiperactivación espermática (Jaiswal *et al.*, 1999).

Péptido Atrial Natriurético (ANP): es una hormona secretada en gran abundancia en la porción atrial del corazón y en una gran variedad de células del organismo mamífero (Brenner *et al.*, 1990). Ejerce muchas acciones a través de la activación de la guanilato ciclasa; el ANP es un atrayente fisiológico de los espermatozoides humanos en la técnica de gradientes ascendientes y descendientes (Zamir *et al.*, 1993) y la actividad de la guanilato ciclasa afecta la motilidad espermática, capacitación, RA, estimula el metabolismo espermático y promueve la interacción del óvulo-espermatozoide; influyendo en la fertilización (Revelli *et al.*, 2002).

Quimiocin Regulador en Activación Normal T Expresado y Secretado (RANTES): existe en los fluidos del aparato genital por ejemplo en el fluido folicular, plasma seminal y fluido uterino, pocos estudios existen sobre el efecto del quimiocin sobre los espermatozoides. Isobe *et al.*, (2002) concluyó que *in vitro*, RANTES es uno de los quimioatrayentes del fluido folicular.

De los otros compuestos mencionados, no se ha podido distinguir entre quimiotaxis y ciertos procesos de acumulación, ya que su quimioactividad ha sido cuestionada (Eisenbach, 1999b).

Péptidos de la familia N-formyl-Met-Leu-Phe, se han reportado como quimioatrayentes para neutrófilos y macrófagos (Schiffmann *et al.*, 1975), y más tarde se determinó que estos péptidos actúan como quimioatrayentes para espermatozoides de toro y de humano (Iqbal *et al.*, 1980; Gnessi *et al.*, 1985).

Además Makler *et al.*, (1995) estudió un número de sustancias para encontrar estímulos quimiotácticos para los espermatozoides (moco cervical, fluido del útero, fluido folicular, suspensión de células del cúmulo y ovario humano) también probó el clorhidrato ácido, el hidróxido de sodio, el etanol y el glutaraldehído y no encontró ninguna respuesta para estas sustancias.

M e c a n i s m o s m o l e c u l a r e s d e l a q u i m i o t a x i s

En los mamíferos no se ha clarificado el mecanismo que lleva a cabo este fenómeno, pero asumiendo universalidad entre las especies, puede ser similar al propuesto por Cook *et al.*, (1994), (Fig. 1.), en el cual se indica que es mediado por la guanilato ciclasa. Se halló que el ANP es un activo quimiotáctico y se sugirió que puede afectar

directamente la guanilato ciclasa *in vitro* y ser fisiológicamente un atrayente (Zamir *et al.*, 1993). Guanilato ciclasa ubica enzimas que catalizan la conversión de GMP para cGMP, la guanilato ciclasa afecta la motilidad espermática, la capacitación y la RA, estimulando el metabolismo espermático y promoviendo la interacción del espermatozoide con el ovocito; también una cantidad excesiva de la guanilato ciclasa podría tener efecto antireproductivo (Revelli *et al.*, 2002).

Se sostiene que sólo una fracción de espermatozoides es sensible a la quimiotaxis (Cohen-Dayag *et al.*, 1994). De la misma manera, en caninos se conoce que una población limitada de espermatozoides es teñida por anticuerpos contra receptores olfatorios del testículo (TOR) de la misma especie. Estos receptores olfatorios se localizaron en la mitad de la pieza de la cola de espermatozoides maduros, una región rica en mitocondrias (Kenakin *et al.*, 1992; Walensky *et al.*, 1995); además TOR de rata y ratón han sido detectados en espermatozoides maduros, evolutivamente estas sustancias determinan fenotipos que están involucradas en la competencia entre machos y en la elección de la pareja para aparearse de la hembra; alternativamente TOR podría mediar la quimiotaxis espermática. En rata dos familias de quimio receptores espermáticos (SCR) olfatorios fueron identificados, en el espermátide redondo del testículo (SCRD y SCRG), (Walensky *et al.*, 1998; Branscomb *et al.*, 2000). Pero también podrían tener funciones no olfatorias internas en los testículos, por ejemplo: los receptores olfatorios (OR) podrían participar en la fase migratoria de las células germinales primordiales en su ciclo de vida (Goto *et al.*, 2001).

También se ha demostrado que un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, produce una asimetría en el bateo flagelar del espermatozoide. En los espermatozoides de mamíferos existen dos tipos de canales de Ca^{2+} y es probable que en mamíferos, el Ca^{2+} intracelular medie la respuesta quimiotáctica dependiendo del canal que opere (Eisenbach, 1999b; Darszon *et al.*, 2001).

Papel fisiológico de la quimiotaxis

El papel que juega la quimiotaxis *in vivo* ha sido difícil de comprobar y una pregunta en la biología de la reproducción es si la fertilización es alcanzada por colisión al azar entre el espermatozoide y el óvulo o si los gametos se comunican entre sí previo a su unión, por medio de señales bioquímicas que puedan permitir la selección de gametos óptimos para la fertilización (Ward y Kopf, 1993; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999). Pero existe un buen número de evidencias que indican que los productos de la ovulación son esenciales para el transporte espermático en el oviducto. Por ejemplo el ámpula correspondiente al ovario conteniendo al folículo o folículos ovulados presenta un número significativamente mayor de espermatozoides; en el oviducto se encontraron menos de 250 espermatozoides (rango, 80 – 1400), (Williams *et al.*, 1993).

Las evidencias sugieren que la contracción del oviducto mueve líquidos desde el istmo al ámpula (Battalia y Yanagimachi, 1979) y la asociación de sensibilidad

quimiotáctica con el estado capacitado del espermatozoide, aumenta la posibilidad de que *in vivo* el papel quimiotáctico no sea ejercido en muchos espermatozoides, sino en una población selectiva (Eisenbach, 1999b).

Del total de la población espermática, sólo una fracción de espermatozoides (2-12%) en humanos (Cohen-Dayag *et al.*, 1994); 10% en ratones (Oliveira *et al.*, 1999) responden quimiotácticamente al líquido folicular. En adición a esto también se ha encontrado que la respuesta quimiotáctica es temporal, ya que existe un continuo reemplazo de espermatozoides dentro de la población (Cohen-Dayag *et al.*, 1994). Además se ha asociado esta respuesta con el porcentaje de espermatozoides capacitados de la población, aumentándose la posibilidad de espermio quimiotaxis *in vivo* al incrementarse el porcentaje de espermatozoides capacitados (Eisenbach y Ralf, 1992; Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Fabro *et al.*, 2002).

El fluido folicular contiene secreciones del ovocito y de sus células circundantes cuya composición y función ha sido objeto de numerosas investigaciones *in vitro*, en el humano y en algunas otras especies mamíferas (equinos, bovinos, ratones y conejos). En humanos, el líquido folicular ha sido tomado de folículos de mujeres en programas de fertilización *in vitro* y en los equinos y bovinos, de ovarios obtenidos en el rastro.

No todos los fluidos foliculares causan acumulación espermática, pues parece ser que sólo aquellos fluidos foliculares de ovocitos que puedan ser fertilizados muestran esta capacidad (Ralt *et al.*, 1991; Villanueva *et al.*, 1990; Navarro, 1998). Además Fabro *et al.*, (2002) en sus estudios concluyó que los espermatozoides de conejo responden quimiotácticamente a factores foliculares y adquieren esta sensibilidad como parte del proceso de capacitación.

Localización de quimiotaxis *in vivo*

La coordinación y el momento en que ocurre la quimiotaxis *in vivo* no se conoce; la zona pelúcida se considera el sitio fisiológico de la RA en las especies mamíferas junto a un número de candidatos como sustancias inductoras de la RA, asociados con el aparato reproductor femenino, con el folículo y con las propiedades del ovocito. Estos inductores pueden representar procesos de selección para asegurar que solamente el espermatozoide más viable e intacto, con óptimo potencial de fertilización lleve a cabo la exocitosis que se requiere para la penetración de la zona pelúcida; pero existen evidencias de que sólo los espermatozoides capacitados son liberados desde el istmo hacia el ámpula (Lefebvre y Suárez, 1996; Eisenbach y Ralf, 1992; Suárez, 1998) y esto puede ser significativo debido al pequeño número de espermatozoides que son liberados desde el sitio de almacenamiento (Hunter, 1993; Williams *et al.*, 1993). En ese lugar parecen estar atrapados por los pliegues de la mucosa o adheridos al epitelio, de manera que debe existir un mecanismo o una señal que los libere o que ejerza una atracción quimiotáctica. Así mismo la motilidad de los espermatozoides en la región

del istmo del oviducto es menor a la que presentan los que se encuentran en el ámpula (Overstreet y Cooper, 1975), lo que podría indicar la presencia de factores que la estimulen localmente.

Sin embargo, el oviducto presenta movimientos contráctiles que parecen mover al fluido en dirección contraria al transporte del fluido folicular (Battalia y Yanagimachi, 1979). También el transporte espermático depende de los movimientos ciliares (Flechon y Hunter 1981); aquí es poco probable que haya un gradiente químico (Cohen-Dayag *et al.*, 1994), así que la quimiotaxis puede suceder en la proximidad del ovocito, por lo que es probable que el gradiente se produzca dentro de las células del cúmulo.

Las células del cúmulo secretan sustancias *in vitro* que alteran los patrones de los movimientos espermáticos. Bronson y Hamada (1977) notaron que los espermatozoides atraviesan los tubos microcapilares en el entorno de óvulos no fertilizados, moviéndose en patrones erráticos, adhiriendo la cabeza a las paredes del capilar; sin embargo, cuando las células del cúmulo han sido removidas, el espermatozoide tiene una trayectoria lineal; también se halló un atrapamiento selectivo por las células del cúmulo, que podría ser explicada como quimiotaxis.

Así, el proceso de la quimiotaxis puede ser un fenómeno que sólo ocurre en la vecindad al ovocito por atrayentes del mismo ovocito y que el gradiente se establezca en las células del cúmulo ya que solamente espermatozoides capacitados penetran las células del cúmulo (Eisenbach, 1995) o que el ovocito sea el organelo que secrete el atrayente o que ambos fluidos, el folicular y el oviductal sean quimiotácticamente activos.

Otros hallazgos han determinado quimiotaxis para los espermatozoides, por parte del fluido folicular en humanos (Villanueva *et al.*, 1990; Ralf *et al.*, 1991; Villanueva *et al.*, 1992; Jaiswal *et al.*, 1999), en equinos (Navarro *et al.*, 1998; Navarro, 1998) y en ratones (Oliveira *et al.*, 1998).

En el líquido folicular de mamíferos se han investigado dos tipos de quimiotaxis: una es la quimiotaxis en respuesta a un péptido sintético, como es el caso del atrayente para leucocitos (Shiffmann *et al.*, 1975) o factores atrayentes del líquido folicular equino para neutrófilos (Wadson *et al.*, 1991) y otra quimiotaxis hacia sustancias liberadas desde el ovocito de las células a su alrededor, lo cual es de importancia particular para estudios *in vitro*, ya que el espermatozoide sufre cambios fisiológicos secuenciales en el aparato reproductor femenino y es probable que los espermatozoides tengan una respuesta quimiotáctica restringida, para solamente uno de los estados fisiológicos (Eisenbach y Ralf, 1992; Fabro *et al.*, 2002).

III. Material y Métodos

Localización

Este trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Departamento de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología (INPER) de México, ambos en la Ciudad de México, D.F.

Número de animales

Para la colección del semen se utilizaron cinco toros de reconocida fertilidad, tres de ellos (No. 1, 2 y 5) de raza Holstein pertenecientes a CEPIPSA y los otros dos pertenecientes al Centro de Enseñanza e Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina (CEIEPBC) de la FMVZ, UNAM, uno de raza Holstein (No. 3) y el otro toro de raza Jersey (No. 4).

Colección de líquido folicular

El líquido folicular bovino (LFB), se obtuvo de los ovarios de vacas o vaquillas Holstein sacrificadas en el rastro Temamatla, S.A. de C. V., ubicado en el camino a Cuantitla, Estado de México.

Los ovarios seleccionados fueron aquellos que tenían folículos con diámetro mayor a 0.8 mm (Hafez, 1996). Se procedió a la obtención del LFB, empleando el método de aspiración, el que se efectuó con agujas de 21Gx32 mm (G, calibre de la aguja) y jeringas hipodérmicas de 5 ml.

Una vez lavado el ovario con suero fisiológico, se puncionó el folículo con la aguja. La punción y aspiración del LFB, se realizó desde el interior del folículo, impidiendo que la aguja rasgara la pared externa del folículo y se derramara el líquido.

El LFB colectado se depositó en tubos cónicos estériles de 15 ml, obteniendo de cada folículo aproximadamente 1 ml.

El LFB se transportó al Laboratorio del INPER en una caja de unicel (poliuretano), que contenía una gradilla, congelantes y un termómetro a una temperatura inicial de 4°C; el tiempo de transporte fue de aproximadamente 2 horas; al llegar al laboratorio la

temperatura interior de la caja fue de 10°C, mientras que la temperatura ambiente era de 20 - 25°C.

Preparación del líquido folicular bovino

Una vez en el laboratorio y en medio estéril, se observó que el material celular contenido en el LFB se ha sedimentado, se recuperó el líquido sobrenadante con una pipeta estéril de 3 ml, a fin de tener 10 ml en tubos estériles de 15 ml.

Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 1500 x g por 20 minutos; de nuevo, el sobrenadante se recuperó de la misma forma anterior y se eliminó el sedimento; seguidamente, se agregaron 100 UI / ml de penicilina G y 50 UI / ml de sulfato de estreptomina, si bien los filtros de 0.22µm impiden el paso de bacterias o micoplasmas; el LFB se filtró con filtros de 0.45µm para evitar la eliminación de las fracciones que necesitamos. Los frascos se rotularon previamente con la fecha de obtención y se almacenaron a -20 °C, hasta su uso (Villanueva-Díaz *et al.*, 1992).

Colección de semen

Para la colección del semen se usó una vagina artificial tipo Hannover. Se colectaron 3 eyaculados de cada uno de los 4 toros (No 1, 2, 4, 5) y 1 eyaculado del toro número 3, para un total de 13 eyaculados.

Evaluación de semen

Cada eyaculado se recogió en un tubo estéril de 15 ml y se le evaluó el volumen, aspecto, consistencia, pH y motilidad (Anexo 1. Evaluación de semen).

El volumen del eyaculado se midió en el mismo tubo estéril graduado.

Su aspecto fue por simple inspección a temperatura ambiente.

La consistencia se estimó aspirando la muestra con una pipeta estéril y permitiendo la libre caída de gotas, en las que se observó la longitud de filamentos. En una muestra normal se observan gotas pequeñas y bien definidas.

El pH se determinó con papel indicador de pH; distribuyendo una gota de semen sobre el papel y se comparó con los estándares del mismo.

Con un microscopio óptico se examinó la motilidad; se colocó una muestra de semen (10µl) en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.

Al mismo tiempo el medio HTF (Anexo 2. Componentes) y el semen se mantuvieron en baño María a 30°C por 5 minutos; se homogenizó la muestra con una pipeta estéril y se diluyó 1:10 (v:v) en HTF en un tubo estéril; se adicionó primero el semen y luego el HTF; la dilución se mantuvo a 30°C durante su transporte al laboratorio en baño María a 30°C. La duración del transporte fue aproximadamente de 50 a 90 minutos. La temperatura se midió al llegar al laboratorio del INPER, la cual fue de 29 a 32°C.

Después se tomó 1 ml de semen diluido y se le añadió 1 ml de medio HTF-BSA al 7.5% (Anexo 2. Componentes). Ésta concentración final, se ajustó a 60×10^6 células por ml para los ensayos de quimiotaxis.

Una vez en el laboratorio, se hizo un examen seminal de rutina, a una pequeña cantidad de la dilución (10 µl). Con un microscopio óptico se examinó con una magnificación de 400x (Anexo 3. Motilidad total), se estimó el índice de movilidad y el total de movilidad.

Existen varias técnicas de evaluación de la motilidad espermática; en este caso se utilizó el método dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS/92). El campo microscópico es recorrido y la motilidad se clasificó como A, B, C, o D:

- A: motilidad progresiva rápida
- B: motilidad progresiva lenta
- C: motilidad no progresiva
- D: inmóviles.

Se utilizó un contador de laboratorio, se hizo el conteo de espermatozoides, se completó 100 espermatozoides y se obtuvo un porcentaje en cada categoría (A,B,C,D); se repitió la cuenta con otros 100 espermatozoides. Se tuvo en cuenta que los recuentos no difieran en un 10% y se obtuvo el promedio para cada categoría. La suma de A, B, y C correspondió a la motilidad total y la suma de A+B correspondió a índice de motilidad progresiva.

Elaboración de las cámaras de quimiotaxis

Siguiendo los modelos descritos por Villanueva *et al.*, (1992), se modificaron las cámaras y se tomaron capilares transparentes de 13.3 cm de longitud y de 0.5 ml de volumen; se cortaron con un bisturí y se elaboraron capilares de 3 cm de longitud; a estos, se les hizo un orificio central de 1.5 mm de diámetro; de esta manera, los capilares quedaron con una capacidad aproximada de 120 µl.

Se seleccionaron tubos de policarbonato de 2.4 cm de altura, con una base de diámetro de 1.3 cm y un diámetro superior de 1.5 cm. Cuentan con calibración y graduación en relieve (de 0.5 a 1 ml de volumen) y no necesitaron gradilla, ya que tenían base de apoyo.

A estos tubos se les perforó a la altura de 0.5 ml, con un orificio de 1.5 mm que es el diámetro de los tubos capilares. Para la perforación se utilizó un taladro eléctrico y brocas de dos diferentes tamaños: una para el capilar y otra para los tubos.

Posteriormente se procedió a unir dos tubos por cada capilar, los cuales se unieron a presión y sin necesidad de pegamentos. Así se prepararon 50 pares de cámaras, las cuales fueron probadas para que no presentaran escape de líquidos y que se mantuvieran niveladas a 1 ml (Fig. 3).

Las cámaras se lavaron con jabón neutro diluido y se enjuagaron exhaustivamente con agua normal, posteriormente con agua destilada y posteriormente con agua deionizada; se cubrieron con gasas y se dejaron secar a temperatura ambiente.

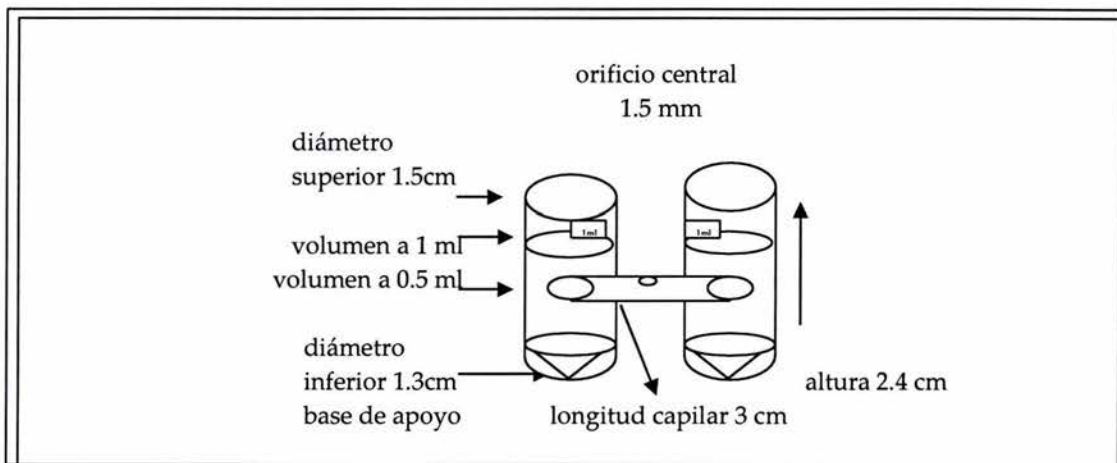


Figura 3. Cámara de Quimiotaxis

Partes de la cámara de quimiotaxis

La cámara de quimiotaxis está compuesta por dos tubos laterales con base de apoyo, unidos a un capilar central, que tiene un orificio central. Estos tubos se designaron como cámara A, si contiene el líquido folicular bovino (líquido a probar, atrayente) y como cámara B, si contiene el HTF-BSA al 7.5%² (líquido testigo) y C, corresponde al capilar, con un orificio central por el que se coloca HTF con ácido hialurónico al 0.05% y se le adicionan los espermatozoides (Fig. 4).

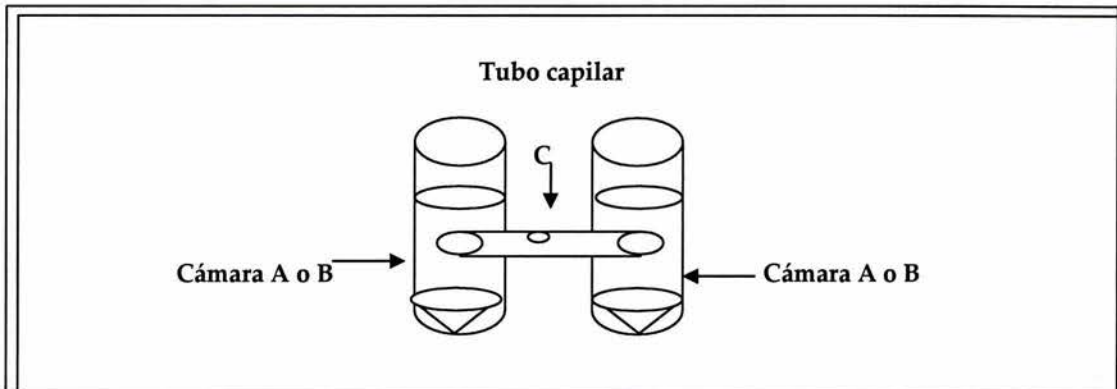


Figura 4. Partes de la cámara de quimiotaxis. Cámara A, contiene líquido folicular (líquido a probar); cámara B, contiene HTF-BSA al 7.5% (líquido testigo); tubo capilar C, contiene HTF y ácido hialurónico al 0.05%.

El conteo de espermatozoide se efectuó como sigue: Para la cámara A, número de espermatozoides que migraron hacia las cámaras que contenían LFB; B, número de espermatozoides migrantes hacia las cámaras con HTF-BSA 7.5% (cámara B); C, número de espermatozoides que quedaron en los tubos capilares que contenían el medio HTF añadido de ácido hialurónico al 0.05%, (punto de origen, capilar C); TOT, la suma de estos valores (A + B + C); se obtuvieron los porcentajes de migración hacia A y hacia B (PA y PB) y el porcentaje de espermatozoides que no migraron, es decir que se quedaron en el tubo capilar, punto de origen (PC). Además se encontró la migración total (MT), suma de A+B; el porcentaje total que migró hacia A (MTPA) y hacia B (MTPB).

² (HTF-BSA al 7.5%, es HTF suplementado con albúmina sérica bovina al 7%).

Estandarización de un método

■ Experimentos previos

Se efectuaron algunos ensayos con semen humano (Cuadro 1 al 5) encontrándose un 73% de espermatozoides que migraron hacia el LFB (Cuadro 6), pero un problema que se presentó fue la aglutinación que en algunas ocasiones impidió la lectura espermática, para observar la disminución o aumento de este problema (la aglutinación) se programó: Hacer tres ensayos para probar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro con LFB desnaturalizado y tres ensayos con la misma muestra sin desnaturalizar, otros tres ensayos con LFB filtrado y en diferentes porcentajes de dilución (75%, 50%, 25%), diluido en HTF-BSA al 7.5%, para espermatozoides de humano y de toro; cinco ensayos con LFB sin filtrar, para espermatozoides de toro y finalmente 9 ensayos con LFB filtrado, para espermatozoides de toro (Cuadros 7 al 12).

Se probó la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar (Cuadro 1 al 5.); en estos ensayos los espermatozoides se lavaron 2 veces y se hizo un *Swim up* (nado hacia la parte superior del medio), estas muestras presentaron baja concentración y baja movilidad ya que se trató de muestras de donadores de baja fertilidad. Por cada experimento se efectuaron 5 a 7 ensayos en humanos.

Cuadro 1. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar.

No	A	B	C	TOT
I	3	1	5	9
II	4	1	1	6
III	1	1	0	2
IV	22	0	0	22
V	6	0	8	14
Total	36	3	14	53

No: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C).

Cuadro 2. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar.

No	A	B	C	TOT
I	1	2	3	6
II	1	1	5	7
II	3	8	23	34
IV	0	1	0	1
V	7	0	9	16
VI	9	0	24	33
Total	21	12	64	97

No.: Número de los ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C).

Cuadro 3. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar.

No	A	B	C	TOT
I	1	0	9	10
II	5	0	6	11
III	3	5	0	8
Total	9	5	15	29

No.: Número ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C).

Cuadro 4. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar.

No	A	B	C	TOT
I	6	1	4	11
II	12	0	3	15
III	6	2	0	8
IV	0	1	2	3
V	3	4	2	9
Total	27	8	11	46

No.: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (Cámaras A, B y C).

Cuadro 5. Respuesta quimiotáctica de espermatozoides humanos al LFB crudo y sin filtrar.

No	A	B	C	TOT
I	11	0	8	19
II	3	2	0	5
III	10	6	2	18
IV	8	4	1	13
V	9	3	4	16
VI	15	8	1	24
VII	7	7	1	15
Total	63	30	17	110

No: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C).

Cuadro 6. Porcentaje de migración total, promedio y desviación estándar de los totales de los cuadros 1 al 5.

No	1	2	3	4	5	Tot	$\bar{x} \pm s$
A	36	21	9	27	63	156	31.2±20.3
B	3	12	5	8	30	58	11.6±10.8
C	14	64	15	11	17	121	24.2±22.3
TOT	53	97	29	46	110	335	67±34.7
PA	67.9	21.6	31	58.6	57.2	46.5	47.3±19.8
PB	5.6	12.3	17.2	17.3	27.2	17.3	15.9±7.9
PC	26.4	65.9	51.7	23.9	15.4	36.1	36.6±21.2
MT	39	33	14	35	93	214	42.8±29.6
MTPA	92.3	63.6	64.2	77.1	67.7	72.8	73±12
MTPB	7.6	36.3	35.7	22.8	32.2	27.1	26.9±12

No: Número de cuadro; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A en diferentes ensayos; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B, de diferentes ensayos; C: Suma de los espermatozoides que no migraron de diferentes ensayos; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; Tot: Total de espermatozoides por cada variable y porcentajes; $\bar{x} \pm s$: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 6 se observó el porcentaje de migración para las cámaras A (PA), fue de un 46.5% y de un 17.3 % para las cámaras B (PB), además del porcentaje total de espermatozoides migrados (MT), 72.8% migró hacia A (MTPA) y 27.1% hacia B (MTPB).

LFB filtrado se tomó y se calentó a temperatura de 60° C por 30 minutos para desnaturalizarlo y se observó la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro, hacia el LFB desnaturalizado (Cuadro 7).

Cuadro 7. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro hacia el LFB desnaturalizado, promedio y desviación estándar.

No	I	II	III	Total	x±s
A	36	21	46	103	34.3±12.5
B	13	6	27	46	15.3±10.6
C	15	13	9	37	12.3±3
TOT	64	40	82	186	62±21
PA	56.2	52.5	56	55.3	54.9±2.1
PB	20.3	15	32.9	24.7	22.7±9.2
PC	23.4	32.5	10.9	19.8	22.3±10.8
MT	49	27	73	149	49.6±23
MTPA	73.4	77.7	63	69.1	71.4±7.5
MTPB	26.5	22.2	36.9	30.8	28.5±7.5

No: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A, del total de migración; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; x±s: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 7 se observó que en los ensayos del líquido folicular bovino desnaturalizado, se mantuvo un mayor porcentaje de migración hacia las cámaras A, con 55.3%; en comparación con lo que ocurrió hacia las cámaras B con 24.7%, además del total de migración (MT), el porcentaje de respuesta quimiotáctica para las cámaras A (MTPA) fue de 69.1% y para las cámaras B (MTPB) fue 30.8%.

Con el mismo eyaculado utilizado en el Cuadro 7, se observó la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro hacia el LFB sin desnaturalizar (Cuadro 8).

Cuadro 8. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro hacia el LFB sin desnaturalizar.

No	I	II	III	Total	x±s
A	23	35	17	75	25±9.1
B	10	4	6	20	6.6±3
C	35	48	50	133	44.3±8.1
TOT	68	87	73	228	76±9.8
PA	33.8	40.2	23.2	32.8	32.4±8.5
PB	14.7	4.5	8.2	8.7	9.1±5.1
PC	51.4	55.1	68.4	58.3	58.3±8.9
MT	33	39	23	95	31.6±8
MTPA	69.6	89.7	73.9	78.9	77.7±10.5
MTPB	30.3	10.2	26	21	22.2±10.5

No: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A, del total de migración; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; x±s: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 8 se observó que en los ensayos con el LFB no desnaturalizado se mantuvo un porcentaje mayor de migración para las cámaras A (PA) con 32.8% y para las cámaras B (PB): 8.7%, además del total migrado (MT), el 78.9% fue para las cámaras A (MTPA) y para las cámaras B (MTPB): 21%.

Diluciones del líquido folicular bovino

Se tomó LFB filtrado y se diluyó al 25%, 50% y 75% en HTF-BSA al 7.5% para probar la quimiotaxis hacia los espermatozoides de humanos de reconocida fertilidad (Cuadro 9).

Cuadro 9. Quimiotaxis del LFB filtrado y diluido en 25%, 50% y 75% sobre los espermatozoides humanos.

Ensayo	25%	50%	75%	x±s
A	50	75	21	48.6±27
B	13	0	0	4.3±7.5
C	250	210	28	162.7±118.3
TOT	313	285	49	215.6±145
PA	15.9	26.3	42.8	28.3±13.5
PB	4.1	0	0	1.3±2.3
PC	79.8	73.6	57.1	70.2±11.7
MT	63	75	21	53±28.3
MTPA	79.3	100	100	93.1±11.9
MTPB	20.6	0	0	6.8±11.9

Ensayo: Concentración del ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; x±s: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 9 se observó el porcentaje para las cámaras A (PA), a dilución del LFB (75%), se presentó un porcentaje de atracción espermática de 42.8%; para una dilución de 50%, el porcentaje de migración fue de 26.3%; para la dilución de 25% el porcentaje de migración fue de 15.9%; además, el total de migración (MT) para las cámaras A, presentó 100% de respuesta quimiotáctica tanto para 75% como para 50% de dilución.

Se diluyó el LFB filtrado en HTF-BSA al 7.5% en concentraciones de 25%, 50% y 75% para observar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro (Cuadro 10).

Cuadro 10. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides del toro al LFB diluido en diferentes porcentajes (25%, 50%, 75%).

Ensayo	25%	50%	75%	x±s
A	16	34	22	24±9.1
B	30	21	8	19.6±11
C	101	64	7	57.3±47.3
TOT	147	119	37	101±57.1
PA	10.8	28.5	59.4	32.9±24.5
PB	20.4	17.6	21.6	19.8±2
PC	68.7	53.7	18.9	47.1±25.5
MT	46	55	30	43.6±12.6
MTPA	34.7	61.8	73.3	56.6±19.7
MTPB	65.2	38.1	26.6	43.3±19.7

Ensayo: Concentración del ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; x±s: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 10 se observó que los espermatozoides de toro presentaron un mayor porcentaje de respuesta quimiotáctica, conforme baja la dilución del LFB en el medio; para PA al 75% la migración espermática es de 59.4%, para PA al 50% la migración es de 28.5%, para PA al 25% la migración es de 10.8% y el porcentaje total de migración (MT), para MTPA es de 73.3% para la dilución del 75%; de 61.8% para la dilución del 50%; de 34.7% para la dilución del 25%.

Se hicieron cinco ensayos con LFB sin filtrar, para observar la respuesta quimiotáctica hacia los espermatozoides de toro (Cuadro 11).

Cuadro 11. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de toro al LFB sin filtrar.

Ensayo	I	II	III	IV	V	Total	$\bar{x} \pm s$
A	7	10	12	6	16	51	10.2±4
B	4	17	10	1	12	44	8.8±6.3
C	52	62	31	5	20	170	34±23.2
TOT	63	89	53	12	48	265	53±27.8
PA	11.1	11.2	22.6	50	33.3	19.2	25.6±16.4
PB	6.3	19.1	18.8	8.3	25	16.6	15.5±7.9
PC	82.5	69.6	58.4	41.6	41.6	64.1	58.8±17.8
MT	11	27	22	7	28	95	19±9.5
MTPA	63.6	37	54.5	85.7	57.1	53.6	59.6±17.5
MTPB	36.3	62.9	45.4	14.2	42.8	46.3	40.3±17.5

Ensayo: Nombre de los ensayos; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrados; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; $\bar{x} \pm s$: Promedio y desviación estándar.

En el Cuadro 11 se observó en la mayoría de los ensayos aglutinación de espermatozoides en las cámaras A y con un porcentaje de atracción (PA) quimiotáctica del 19.2%, en comparación con lo que ocurrió para las cámaras B con un porcentaje (PB) de 16.6%; además del total migrado (MT), el porcentaje para A (MTPA) fue de 53.6% y de 46.3% para B (MTPB).

Filtrado del líquido folicular bovino

Se hicieron 11 ensayos de un eyaculado de toro para observar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de bovino, hacia el LFB filtrado (Cuadro 12).

Cuadro 12. La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular filtrado en bovinos:

No	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Total	x±s
A	14	151	120	60	18	135	300	65	298	1161	129±107.7
B	0	1	0	30	7	300	3	160	0	501	55.6±105.3
C	70	140	72	160	360	16	32	40	127	1017	113±105.5
TOT	84	292	192	250	385	451	335	265	425	2679	297.7±116.7
PA	16.6	51.7	62.5	24	4.6	29.9	89.5	24.5	70.1	43.3	41.5±28.2
PB	0	0.3	0	12	1.8	66.5	0.8	60.3	0	18.7	15.7±27.3
PC	83.3	47.9	37.5	64	93.5	3.5	9.5	15	29.8	37.9	42.7±32.2
MT	14	152	120	90	25	435	303	225	298	1662	184.6±141.4
MTPA	100	99.3	100	66.6	72	31	99	28.8	100	69.8	77.4±29.8
MTPB	0	0.6	0	33.3	28	68.9	0.9	71.1	0	30.1	22.5±29.8

No: Número de ensayo; A: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara A; B: Suma de los espermatozoides que migraron a la cámara B; C: Suma de los espermatozoides que no migraron; TOT: Suma total de espermatozoides migrados y no migrados (cámaras A, B y C); PA: Porcentaje de espermatozoides migrados hacia la cámara A; PB: Porcentaje de los espermatozoides migrados hacia B; PC: Porcentaje de espermatozoides no migrado; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A +B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; Total: totales de cada uno de los ensayos en las diferentes variables; x±s: Promedio y desviación estándar

En el Cuadro 12 se observó menor aglutinación en las cámaras A, comparadas con la aglutinación que se observó en ensayos anteriores. El porcentaje de los espermatozoides bovinos que migraron para las cámaras A (PA) fue de 43.3% y el porcentaje de migración para las cámaras B (PB) fue de 18.7% y del porcentaje total migrado (MT), el 69.8% migró hacia las cámaras A (MTPA) y sólo el 30.1% migró hacia las cámaras B (MTPB).

Después de estas observaciones para estandarizar la metodología para la quimiotaxis, se decidió filtrar el LFB con filtros de 45µm, para evitar la posible eliminación de las fracciones que necesitamos en este trabajo experimental y facilitar el conteo de espermatozoides; debido a la aglutinación presentada en previos experimentos, esta aglutinación se siguió observando pero en menor escala.

Ensayos de quimiotaxis

En los experimentos se utilizaron los medios HTF y HTF-BSA al 7.5%, LFB, ácido hialurónico, semen diluido en HTF, cámaras y demás elementos necesarios, de acuerdo al procedimiento descrito por Villanueva *et al.*, (1992). Todos los materiales y elementos se prepararon con anterioridad y se mantuvieron a temperatura ambiente del

laboratorio 25°C a 30°C. Se hicieron 260 ensayos con 13 eyaculados (20 ensayos por cada eyaculado).

El tubo capilar (C) se llenó con el medio HTF, que contenía ácido hialurónico al 0.05%, a través del orificio central utilizando una micropipeta automática, (Fig. 4.). Después con 2 micropipetas automáticas se procedió a introducir al mismo tiempo 1 ml de LFB filtrado (líquido experimental, atrayente) en la cámara que se llamó (A) y en la otra se depositó el HTF-BSA al 7.5% (líquido testigo), que se reconoció como (B). La elección de cámara A o B se hizo al azar para evitar un posible efecto de cámara.

Se dejaron 10 minutos en reposo, así se formó un gradiente de los líquidos. A continuación por el orificio central de cada capilar con una micropipeta de 10-100 μ l se retiraron 10 μ l de líquido y se reemplazaron con 10 μ l de semen diluido en HTF-BSA al 7.5% con una cantidad total de 0.6×10^6 espermatozoides. Estas cámaras se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación, con dos micropipetas automáticas y en el mismo momento, se aspiraron los líquidos de cada cámara A y B; posteriormente y con otra micropipeta automática, se extrajo el líquido de C; es importante mencionar que para cada aspiración de A, B, o C de todo ensayo se utilizaron puntas independientes. Estos líquidos se vertieron en tubos de 12 x 75 mm, los cuales se centrifugaron a 1500 x g por 20 minutos.

Terminada la centrifugación con una pipeta estéril se eliminó el sobrenadante de cada tubo y el sedimento se resuspendió en 150 μ l de HTF-BSA 7.5%. Estas muestras se almacenaron a 4 °C, hasta su conteo.

Posteriormente y para el conteo de espermatozoides de las cámaras A, B, y del capilar C, se homogenizó la muestra con un Vortex y el conteo de espermatozoides se llevó a cabo por duplicado, en 10 μ l de muestra utilizando un hemocitómetro (esto es, lo correspondiente al cuadro E del hemocitómetro) y un microscopio de doble fase con objetivos de 10x y 40x; primero se observó con el objetivo de 10x y después se contó con el objetivo de 40x.

El número de espermatozoides contados en las cámaras y en los capilares, fue expresado como número total y como porcentaje.

Metodología estadística

La información obtenida de cada una de los ensayos fue incorporada al programa Statistical Analysis System, (SAS Institute Inc. 1990) a fin de poder realizar el análisis estadístico.

Las variables consideradas para cada ensayo fueron: (A, B, C, TOT, PA, PB, PC); A, número de espermatozoides que migraron hacia las cámaras que contenían LFB (cámara A); B, número de espermatozoides migrantes hacia las cámaras con HTF-BSA 7.5% (cámara B); C, número de espermatozoides que quedaron en los tubos capilares que contenían el medio HTF añadido de ácido hialurónico al 0.05%, (punto de origen, capilar C); TOT, la suma de estos valores (A + B + C); se obtuvieron los porcentajes de migración hacia A y hacia B (variables PA y PB respectivamente, total migración), así como el porcentaje de espermatozoides que no migraron, es decir que se quedaron en el tubo capilar, punto de origen o variable PC.

Porcentaje de migración

El porcentaje de migración hacia A (PA), se obtuvo dividiendo A/TOT y el resultado multiplicado por 100.

El porcentaje de migración hacia B (PB), se obtuvo dividiendo B/TOT y el resultado multiplicado por 100.

El porcentaje de no migración, (capilar C) se obtuvo dividiendo C/TOT y el resultado multiplicado por 100.

Además se calculó el total de espermatozoides migrados (MT) que corresponde a la suma de espermatozoides migrados hacia las cámaras A y B ($MT = A+B$).

Se halló el porcentaje total de espermatozoides migrados hacia las cámaras A (MTPA), dividiendo A/MT y multiplicando el resultado por 100.

Se calculó el porcentaje total de espermatozoides migrados hacia las cámaras B (MTPB) y se encontró dividiendo B/MT y multiplicando el resultado por 100.

Análisis estadístico

Utilizando el PROC CORR (Correlación Simple), del programa SAS (SAS Institute Inc. 1990), se obtuvieron las correlaciones simples entre las variables para cada uno de los toros (variables, A, B, C, TOT, MUESTRA, PA, PB, y PC).

Además, se tomó en cuenta el efecto debido al toro o del número de muestras en las variables a estudiar se propuso un modelo de análisis de varianza, utilizando el PROC GLM (Procedimiento General Lineal Model) del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 1990).

El modelo es:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + M_j + (tM)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde

Y_{ijk} es el valor de cada una de las pruebas en las variables A, B, C, TOT, y PA, PB y PC.

μ es la media general

t_i es el efecto del toro i ($i=1,5$)

M_j es el efecto de la muestra j ($j=1,2,3$)

$(tM)_{ij}$ es la interacción entre toro y muestra

ϵ_{ijk} el error aleatorio ($NID \sim 0, \sigma^2$)

A partir de este modelo general, se consideró también el poder hacer modificaciones al modelo de acuerdo a las significancias encontradas en el primer análisis, siguiendo la técnica de eliminación por retroceso descrita por Draper y Smith, (1966).

IV. Resultados

En este estudio se tomaron 13 eyaculados (muestras) de cinco toros y se hicieron 20 ensayos por muestra, para un total 260 ensayos; en los cuales se consideró un testigo positivo doble por cada muestra (trece ensayos con líquido folicular en ambas cámaras) y un testigo negativo doble por cada muestra (trece ensayos con HTF-BSA al 7.5% en ambas cámaras). Sin embargo la aglutinación que ocurrió en los ensayos positivos dobles (13 ensayos) no permitió hacer una lectura espermática; por lo que se determinó anular todos los testigos dobles (26 ensayos), además 10 ensayos se cayeron accidentalmente durante el proceso de experimentación; de esta forma se anularon 36 ensayos. Para el análisis estadístico se consideró un total de 224 ensayos.

Porcentajes de migración

El Cuadro 13 permite observar el total de espermatozoides migrados para cada cámara, los valores de A y B; el total de espermatozoides no migrados o que permanecieron en su punto de origen C; la suma total de la lectura espermática TOT (A+B+C); el porcentaje de migración para cada cámara PA y PB; el porcentaje no migrado PC; el total de migración MT (A+B); el porcentaje total de migración para A, del total migrado (MTPA) y el porcentaje total de migración para B, del total migrado (MTPB).

Cuadro 13. Porcentaje de migración para cada una de las variables en estudio, por cada toro.

No	A	B	C	TOT	PA	PB	PC	MT	MTPA	MTPB
1	3181	443	1874	5498	57.8	8.0	34	3624	87.7	12.2
2	1335	395	904	2634	50.6	14.9	34.3	1730	77.1	22.8
3	610	206	462	1278	47.7	16.1	36.1	816	74.7	25.2
4	3294	950	2902	7146	46.0	13.2	40.6	4244	77.6	22.3
5	1331	439	825	2595	51.2	16.9	31.7	1770	75.1	24.8
Tot	9751	2433	6967	19151	50.9	12.7	36.3	12184	80.0	19.9
x±s	1950.2±1212.2	486.6±276.6	1393.4±992	3830.2±2410.7	50.7±4.5	13.8±3.5	35.3±3.3	2436.8±1435.8	78.5±5.3	21.49±5.3

No: Número designado a cada uno de los toros; A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB, del total de ensayos; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%, del total de ensayos; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, del total de ensayos; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A, del total de ensayos; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B, del total de ensayos; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides no migrados, del total de ensayos; MT: Total de espermatozoides migrados (suma de A + B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado; Tot: Total de los valores de cada variable; x±s: Promedio y desviación estándar.

En Cuadro 13 se observó: la suma total de espermatozoides en las cámaras A 9751, en las cámaras B 2433 espermatozoides y permanecieron en el capilar C 6967 espermatozoides, para un total (TOT) de lectura espermática de 19151; el porcentaje de

migración: para las cámaras A (PA) fue 50.9%, para las cámaras B (PB) fue 12.7% y el porcentaje no migrado (PC) fue 36.3%; la suma de espermatozoides migrados (MT), fue 12184; el porcentaje total de migración espermática para las cámaras A (MTPA) fue 80%, del total de migración y el porcentaje total de migración espermática para las cámaras B (MTPB) fue 19.9%, del total migrado; además de sus promedios y desviaciones estándar.

La Figura 5 muestra los porcentajes de migración para las cámaras A (PA); porcentaje de migración para las cámaras B (PB) y los porcentajes del total migrado (MT), lo migrado para A (MTPA) y para B (MTPB); de 224 ensayos.

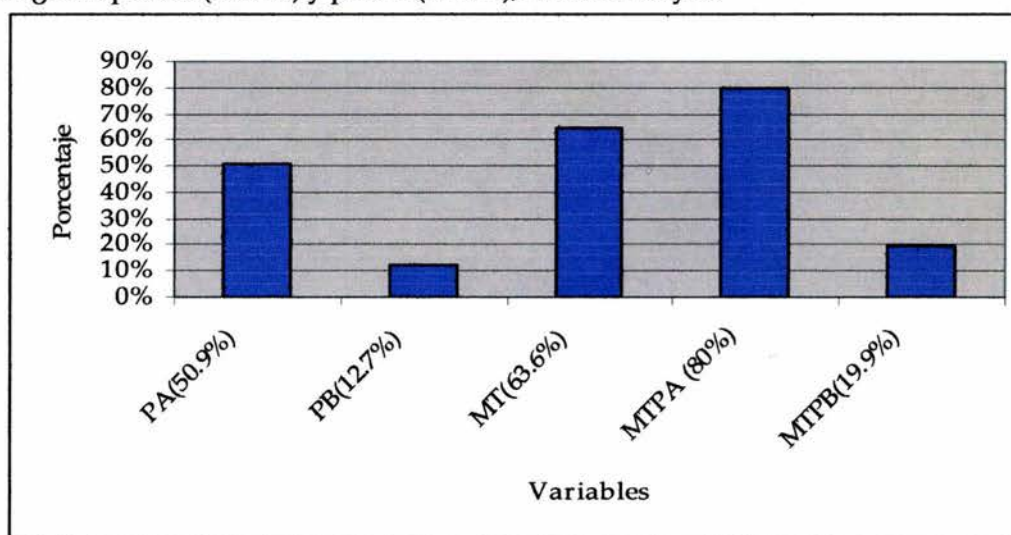


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides migrados. PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A ; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; MT: Total porcentaje de espermatozoides migrados (suma de A+B); MTPA: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia A, del total migrado; MTPB: Total porcentaje de espermatozoides migrados hacia B, del total migrado.

En la Figura 5 se observó un porcentaje de migración de 63.6%, que corresponde al (50.9%) hacia las cámaras A y (12.7%) para las cámaras B; de el porcentaje total de espermatozoides migrados (MT), se presentó una mayor migración para las cámaras A (80%, MTPA) en comparación con lo que ocurre hacia las cámaras B (19.9%, MTPB). Esto demuestra que el porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras A con LFB, excede al porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras B con líquido testigo (HTF-BSA al 7.5%).

Promedios y desviaciones estándar

En los Cuadros 14, 15, 16, 17 y 18 se muestran los promedios y desviaciones estándar de las variables en estudio para cada uno de los toros y en cada una de sus muestras (eyaculados). Además las Figuras 6, 7, 8, 9 y 10 muestran los promedios de las variables en estudio, para cada uno de los toros y en cada una de sus muestras y la Figura 11 muestra los promedios generales de cada una de las muestras de cada toro.

Cuadro 14. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio, de acuerdo a la muestra del toro 1.

Muestra	1.	2.	3.
Variable	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$
A	98.2 ± 45.8	66.4 ± 40.3	12.7 ± 6.6
B	12.9 ± 16.8	10.1 ± 22.3	1.6 ± 2.3
C	80 ± 67.9	19.2 ± 30.4	5.1 ± 6.9
TOT	191.2 ± 85.5	95.7 ± 38	19.5 ± 6.8
PA	52.8 ± 21.2	71.4 ± 30.1	67.2 ± 25.4
PB	8 ± 9.9	8.7 ± 14.8	10.3 ± 15.9
PC	39.1 ± 24	19.8 ± 28	22.3 ± 24.5

A: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de la suma total de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

En el Cuadro 14 se observó que los promedios y las desviaciones estándar son mayores tanto en número como en porcentaje para las variables A y PA en las tres muestras, comparados con los promedios y desviaciones estándar de las variables B y PB del toro 1.

En la Figura 6 se observó diferencia de respuesta entre las distintas muestras para cada una de las variables y los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB del toro 1.

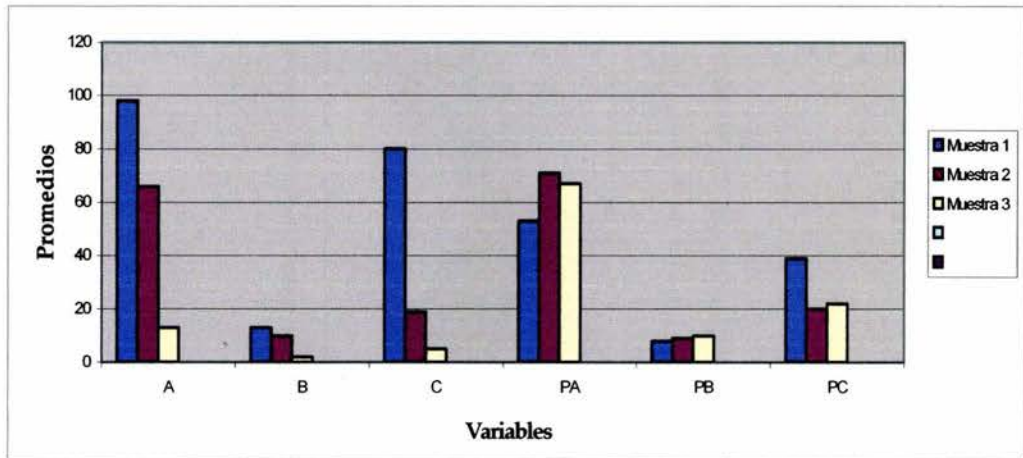


Figura 6. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 1. A: Valor correspondiente al promedio del total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio del total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio del total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A. PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B. PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

Cuadro 15. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio de acuerdo a la muestra del toro 2.

Muestra	1.	2.	3.
Variable	$x \pm s$	$x \pm s$	$X \pm s$
A	17.9 ± 10.6	33.2 ± 18.1	33.2 ± 23.2
B	6.8 ± 9.7	10.9 ± 12.8	6.9 ± 7.3
C	7.4 ± 5	23.3 ± 21.3	26.9 ± 26.9
TOT	32.1 ± 16.2	67.5 ± 26.4	67 ± 26.7
PA	54.9 ± 18.4	53.8 ± 26.8	51.6 ± 28.2
PB	16.7 ± 15.9	15.7 ± 16.3	12.4 ± 12.9
PC	28.2 ± 21.7	30.4 ± 21.4	35.9 ± 26.2

A: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de la suma total de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

En el Cuadro 15 se observó que los promedios y las desviaciones estándar son mayores tanto en número como en porcentaje para las variables A y PA en las tres muestras, comparados con los promedios y desviaciones estándar de las variables B y PB del toro 2.

En la Figura 7 se observó diferencia de respuesta entre las distintas muestras para cada una de las variables y los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB del toro 2.

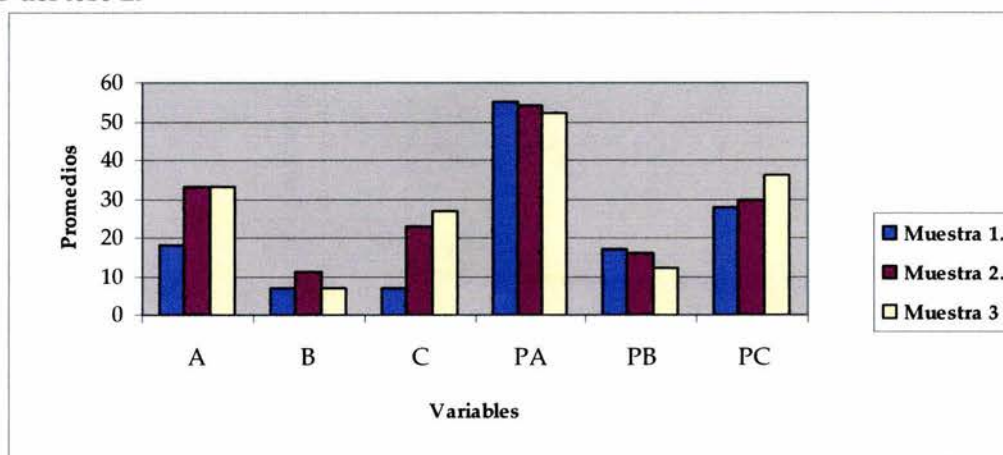


Figura 7. Promedios para las variables de las de las tres muestras del toro 2. A: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A. PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B. PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

Cuadro 16. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio de acuerdo a la muestra del toro 3.

Muestra	1.
Variable	$X \pm s$
A	33.8 ± 18.6
B	11.4 ± 12.8
C	25.6 ± 19
TOT	71 ± 20.8
PA	50.4 ± 28
PB	14.7 ± 13.7
PC	34.8 ± 25.1

A: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de la suma total de espermatozoides de $A + B + C$; PA: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

En el Cuadro 16 se observó que los promedios y las desviaciones estándar son mayores tanto en número como en porcentaje para las variables A y PA en la única muestras, comparados con los promedios y desviaciones estándar de las variables B y PB del toro 3.

En la Figura 8 se observó que los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB del toro 3.

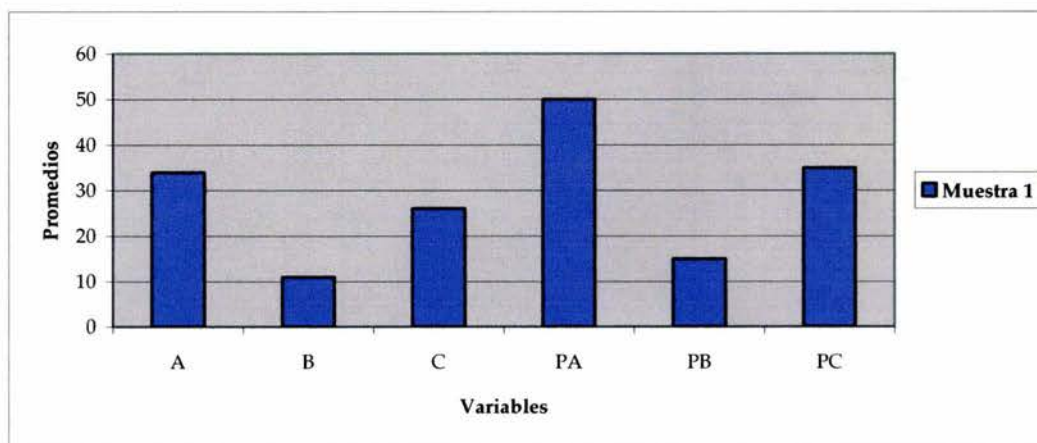


Figura 8. Promedios de las diferentes variables para la muestra 1 del toro 3. A: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A. PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B. PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

Cuadro 17. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio de acuerdo a la muestra del toro 4.

Muestra	1.	2.	3.
Variable	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$
A	50.2 ± 19.1	58.1 ± 51	77.3 ± 73.9
B	9.8 ± 10.6	25.3 ± 26.5	18.1 ± 20.9
C	43.1 ± 35.2	67.5 ± 40	52.9 ± 48.2
TOT	103.2 ± 25.8	151.1 ± 90.2	148.4 ± 109.9
PA	51.9 ± 20.6	36.1 ± 18.5	46.3 ± 23
PB	10.2 ± 11.5	14.4 ± 8	11.5 ± 8
PC	37.7 ± 23.6	49.4 ± 21.3	42 ± 23.7

A: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de la suma total de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

En el Cuadro 17 se observó que los promedios y las desviaciones estándar son mayores tanto en número como en porcentaje para las variables A y PA en las tres muestras, comparados con los promedios y desviaciones estándar de las variables B y PB del toro 4.

En la Figura 9 se observó diferencia de respuesta entre las distintas muestras para cada una de las variables y los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB del toro 4.

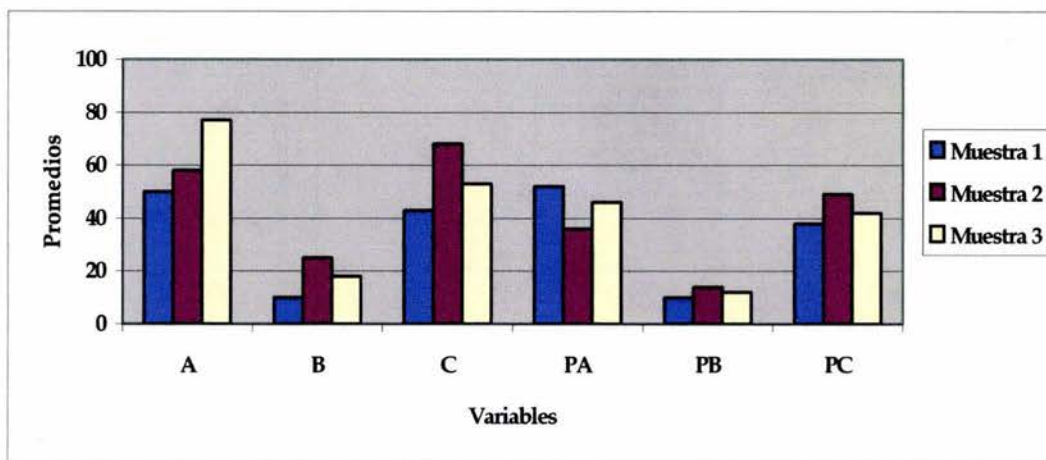


Figura 9. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 4. A: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

Cuadro 18. Promedios y desviaciones estándar para las variables en estudio de acuerdo a la muestra del toro 5.

Muestra	1.	2.	3.
Variable	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$
A	44 ± 18	14.9 ± 9.8	18.2 ± 19.9
B	9 ± 8.1	13 ± 10.1	3.5 ± 3
C	23.3 ± 14.5	13.2 ± 14.3	11.2 ± 4.8
TOT	76.4 ± 33.9	41.2 ± 16.2	33 ± 23.9
PA	59.5 ± 14.3	40.4 ± 27.5	46.1 ± 23
PB	10.8 ± 8.2	30.9 ± 21.1	12.5 ± 8.7
PC	29.5 ± 11.8	28.6 ± 23.7	41.3 ± 20

A: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de los espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar de la suma total de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio y desviación estándar del porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

En el Cuadro 18 se observó que los promedios y las desviaciones estándar son mayores tanto en número como en porcentaje para las variables A y PA en las tres muestras, comparados con los promedios y desviaciones estándar de las variables B y PB del toro 5.

En la Figura 10 se observó diferencia de respuesta entre las distintas muestras para cada una de las variables y los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB del toro 5.

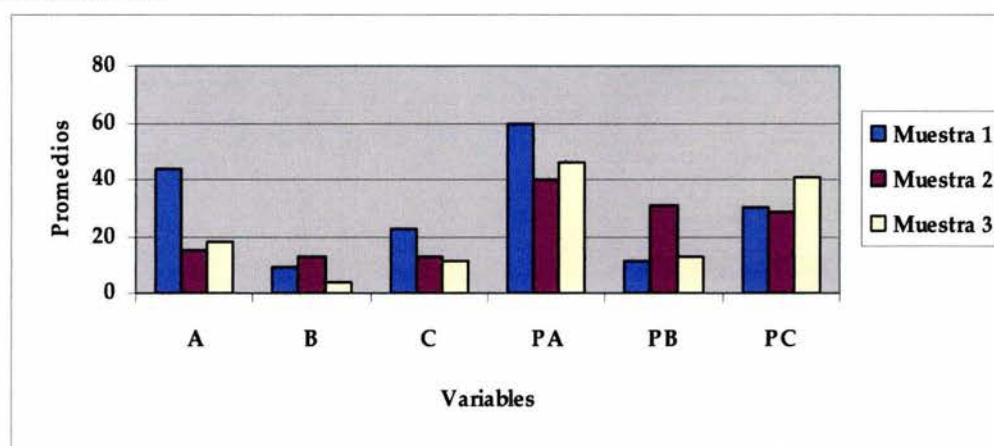


Figura 10. Promedios para las variables de las tres muestras del toro 5. A: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

En la Figura 11 se observó diferencia de respuesta entre las distintas muestras para cada uno de los toros en las variables y los mayores promedios de migración espermática fueron para las variables A y PA, comparados con la respuesta migratoria de las variables B y PB en todos los toros.

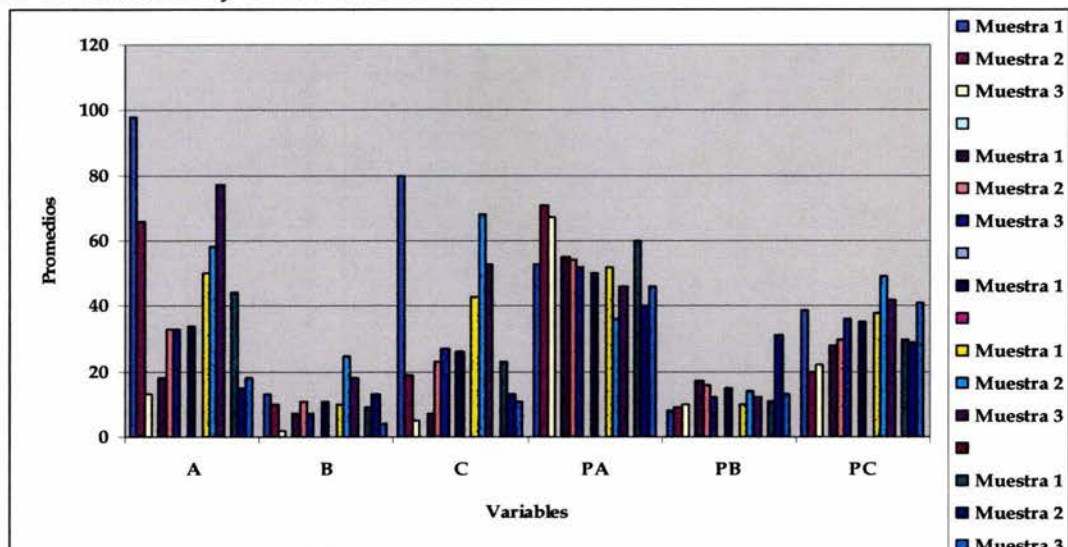


Figura 11. Promedios para las variables de las muestras de los cinco toros. A: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras designadas como A; B: Valor correspondiente a los promedios de espermatozoides que migraron hacia las cámaras B; C: Valor correspondiente al promedio de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; PA: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al promedio del porcentaje de espermatozoides no migrados.

Los cuadros 14 a 18 de promedios y desviaciones estándar, también las figuras 6 a 11 correspondientes a promedios, demuestran que el porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras A (PA) es superior a el porcentaje que migró hacia B (PB).

Análisis de varianza para los efectos de toro y muestra

De acuerdo con el modelo general mostrado en el Material y Métodos se realizó el análisis de varianza utilizando las categorías: Toro y Muestra, para ver su efecto en las variables A, B, C, TOT, PA, PB y PC.

En el Cuadro 19 se encuentra el resultado de este análisis y las interacciones, en donde cada columna específica la clase (toro, muestra) y la interacción (TM) así como el valor del coeficiente de determinación múltiple (R^2). Hay que recordar que este coeficiente expresa en tanto por uno, el porcentaje de la variación que es explicado por el modelo.

Cuadro 19. Significancia de las clases y de la interacción, así como el valor de R^2 para cada una de las variables. De acuerdo al modelo: $Y_{ijk} = \mu + t_i + M_j + (TM)_{ij} + E_{ijk}$

Variable	Toro	Muestra	(TM)	R^2
A	**	*	**	0.38
B	**	*	ns	0.15
C	**	*	**	0.36
TOT	**	**	**	0.50
PA	**	ns	*	0.14
PB	**	*	**	0.16
PC	**	ns	*	0.12

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migro ni hacia A, ni hacia B.

**P<0.01: altamente significativo; *P<0.05: significativo; ns: no significativo.

Como se puede notar en el Cuadro 19, en todas las variables el efecto de toro fue altamente significativo; es decir, los toros se comportaron en forma diferente en cada una de las variables. El efecto de muestra fue significativo salvo en la variable Porcentaje A (PA) y Porcentaje C (PC). Las R^2 fueron mucho más altas con las variables consideradas en forma directa (A, B, C) que cuando se trabajaron en porcentaje (PA, PB, y PC), salvo el caso de B y PB que tuvieron un comportamiento similar. Sin embargo se puede decir que los valores de R^2 en forma general, son bajos.

El Cuadro 20, indica los valores de significancia para las clases en modelos reducidos, a fin de determinar si los valores de R² descienden en forma importante, al suprimir del modelo la interacción y la interacción junto con la muestra. Se puede notar que el efecto de toro es altamente significativo (p<0.01) en los dos modelos, salvo en el modelo II donde PB y PC es sólo significativo (p<0.05).

El efecto muestra en el modelo I no es significativo (ns) para PA y PC y sólo es altamente significativo (p<0.01) para Total, mientras que las demás variables, alcanzan significancia (p<0.05). Sin embargo las reducciones en R² al suprimir la interacción, indica la importancia real de la misma; es decir, las interacciones entre toro y muestra están presentes y hacen que para cada toro y dependiendo de la muestra usada, el tipo de respuesta en cada variable.

Cuadro 20. Significancia de los efectos con modelos reducidos.

Variable	Modelo I			Modelo II	
	CLASE			Toro	R ²
	Toro	Muestra	R ²		
A	**	*	0.19	**	0.16
B	**	*	0.11	**	0.07
C	**	*	0.18	**	0.15
TOT	**	**	0.27	**	0.23
PA	**	ns	0.08	**	0.08
PB	**	*	0.09	*	0.05
PC	**	ns	0.06	*	0.05

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

*I) Modelo: $Y_{ijk} = \mu + t_i + M_j + E_{ijk}$

*II) Modelo: $Y_{ij} = \mu + t_i + E_{ij}$

** p<0.01: altamente significativo; * p<0.05: significativo; ns: no significativo.

Con estos resultados se procedió al análisis, toro por toro, del efecto de la muestra, (Cuadro 21). Esto no fue posible con el toro 3, ya que de él sólo se tenía una muestra. El análisis de este cuadro permite ver el comportamiento distinto de cada toro, en función de la significancia y de la R² para el efecto de muestra, lo cual reafirma el hecho de la presencia de una interacción cuando se analizan los toros en conjunto.

Cuadro 21. Efecto de muestra en cada toro, para las variables en estudio.

Variable	Toro 1		Toro2		Toro4		Toro5	
	M	R ²	M	R ²	M	R ²	M	R ²
A	**	0.50	*	0.15	ns	0.05	**	0.39
B	ns	0.08	ns	0.03	ns	0.09	**	0.22
C	**	0.37	*	0.17	ns	0.06	**	0.17
TOT	**	0.63	**	0.35	ns	0.07	**	0.36
PA	ns	0.09	ns	0.003	ns	0.09	*	0.12
PB	ns	0.004	ns	0.01	ns	0.04	**	0.31
PC	ns	0.11	ns	0.01	ns	0.04	ns	0.09

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

*M= Muestra.

*Modelo= $Y_{ij} = \mu + M_i + E_{ij}$ para cada toro.

** p<0.01= altamente significativo; * p<0.05= significativo; ns = no significativo.

Por ejemplo, mientras que el efecto de muestra fue altamente significativo para A (p<0.01), en los toros 1 y 5, es sólo significativa en el toro 2 (p<0.05) y no significativa en el toro 4 (ns).

En realidad el toro 4 no presentó significancia en ninguna de sus variables al efecto muestra, indicando así cierta homogeneidad en los resultados, sin importar la muestra en los que se midieron.

Con estos resultados se puede concluir que los toros tuvieron un comportamiento significativamente diferente entre sí; que existió un efecto debido a la muestra (eyaculado) y que en algunos toros este efecto se manifestó en forma diferente a otros (interacción).

Además se puede indicar que el efecto de muestra no se apreció cuando se utilizaron porcentajes, salvo el caso de PA o de PB en el toro 5.

Correlaciones

Con la información de cada variable y por cada toro en forma separada se calcularon las correlaciones simples entre todas las variables.

En los Cuadros 22 al 26 ellos se muestra el valor de la correlación y su significancia estadística.

Cuadro 22 Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 1.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	0.13ns	0.37**	0.81**	0.24ns	-0.17ns	-0.15ns
B		-0.006ns	0.26ns	-0.24ns	0.73**	-0.13ns
C			0.82**	-0.58**	-0.21ns	0.69**
TOT				-0.27*	-0.08ns	0.31 *
PA					-0.26ns	-0.87**
PB						-0.25ns

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

N = 53

ns = no significativo ($p > 0.05$); * significativo = ($p < 0.05$); ** altamente significativo = ($p < 0.01$).

Cuadro 23. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 2.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	-0.15 ns	-0.08ns	0.55**	0.63*	-0.31**	-0.45**
B		0.07ns	0.31*	-0.45**	0.89**	-0.1ns
C			0.71**	-0.66**	-0.16ns	0.8**
TOT				-0.23ns	-0.01ns	0.25ns
PA					-0.39**	-0.8**
PB						-0.24ns

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

ns = no significativo ($p > 0.05$); * = significativo ($p < 0.05$); ** = altamente significativo ($p < 0.01$); N = 48

Cuadro 24. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 3.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	-0.26ns	-0.62**	0.17ns	0.83**	-0.35ns	-0.74**
B		0.26ns	0.62**	-0.47*	0.94**	0.02ns
C			0.52 *	-0.87**	0.11ns	0.92**
TOT				-0.34ns	0.37ns	0.18ns
PA					-0.45ns	-0.87**
PB						-0.05ns

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

ns = no significativo ($p > 0.05$); * = significativo ($p < 0.05$); ** = altamente significativo ($p < 0.01$).

N=18

Cuadro 25. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 4.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	0.62**	0.12ns	0.84**	0.53**	0.16ns	-0.56**
B		0.14ns	0.71**	0.07ns	0.74**	-0.37**
C			0.6**	-0.5**	-0.17ns	0.54**
TOT				0.11ns	0.2ns	-0.18ns
PA					-0.05ns	0.91**
PB						-0.36**

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

ns = no significativo ($p > 0.05$); * = significativo ($p < 0.05$); ** = altamente significativo ($p < 0.01$).

N=53

Cuadro 26. Correlaciones entre las variables para los valores obtenidos en el toro 5.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	0.12ns	0.38**	0.85**	0.62**	-0.37**	-0.42**
B		0.33**	0.48**	-0.4**	0.76**	-0.16ns
C			0.75**	-0.3*	-0.15ns	0.48**
TOT				0.18ns	-0.11ns	-0.13ns
PA					-0.56**	-0.72**
PB						-0.18ns

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

ns = no significativo ($p > 0.05$); * = significativo ($p < 0.05$); ** = altamente significativo ($p < 0.01$).

N= 53

Con el toro 3 sólo se estudió un eyaculado, lo cual reduce considerablemente el tamaño de la muestra y los niveles de significancia. Sin embargo se muestran a fin de incluirlos en términos de observar las respuestas diferentes encontradas en los toros.

Algo que es importante notar en los toros 1, 2, 4 y 5 son las correlaciones entre A y TOT ya que son altas, positivas y significativas; lo que indica que el número de espermatozoides que migraron a A, fue considerablemente mayor en la medida que haya más espermatozoides en total.

Sin embargo, esto sólo parece ser un simple efecto numérico pues el porcentaje de A con relación al total, mostró una correlación baja y negativa (toros 1 y 2) o no diferente a cero (toros 3,4 y 5).

Esto ocurrió en forma diferente ligeramente con B; la relación numérica con el total no fue importante en el toro 1 pero sí lo fue, aunque en menor asociación con los otros toros.

Al igual que con PA, los PB no mostraron relación con el total.

Salvo en el toro 4, los números de espermatozoides encontrados en A y en B parecen ser independientes con correlaciones similares a cero. En cambio, con los porcentajes existe una tendencia negativa, (en algunos casos significativa: toros 2 y 4) entre PA y PB. Esto es a mayor porcentaje en A hay menos en B.

Las correlaciones generales usando todos los toros y todas las muestras se encuentran en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Correlaciones generales entre las variables, usando todos los toros.

Variable	B	C	TOT	PA	PB	PC
A	0.35**	0.33**	0.83**	0.39**	-0.19**	-0.29**
B		0.16*	0.5**	-0.23**	0.63**	-0.12ns
C			0.76**	-0.46**	-0.18**	0.6**
TOT				-0.08ns	-0.08ns	0.12ns
PA					-0.37**	-0.84**
PB						-0.2**

A: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con LFB; B: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que migraron hacia las cámaras con HTF-BSA al 7.5%; C: Valor correspondiente al número total de espermatozoides que se quedaron en su punto de origen, C; TOT: Valor que corresponde a la suma de espermatozoides de A + B + C; PA: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia A; PB: Valor correspondiente al porcentaje de migración espermática hacia B; PC: Valor correspondiente al porcentaje de espermatozoides que no migró ni hacia A, ni hacia B.

ns = no significativo ($p > 0.05$); * = significativo ($p < 0.05$); ** = altamente significativo ($p < 0.01$); N=224

El valor de total con A nos dió una correlación de 0.83** mientras que del total (TOT) con B fue de 0.50**. Esto indica que la migración hacia A fue mayor a medida que hubo más espermatozoides en el total (TOT).

Al ver porcentajes, a mayor porcentaje de A, fue menor en B (-0.37**) lo cual confirmó la hipótesis de que al existir mayor porcentaje de A, esto se redujo en B como consecuencia. Los porcentajes actuaron en forma independiente del total y entre mayor porcentaje hubo en A (PA) menor quedó en C (PC), lo cual no ocurrió entre PB y PC.

V. D i s c u s i ó n

Los resultados del presente estudio demostraron que el líquido folicular bovino ejerció un efecto quimiotáctico hacia los espermatozoides bovinos, ya que del total de espermatozoides migrados, el 80% de los mismos tuvieron una migración hacia las cámaras A, en las que se encontraba el líquido folicular bovino comparado con sólo el 19.9% de migración hacia el líquido testigo (Cuadro 13, Figura 5).

Es importante señalar que los ensayos iniciales realizados para la estandarización de la técnica, que se llevaron a cabo con semen humano de poca concentración y baja movilidad y en donde ocurrió migración en 72.8% de los espermatozoides hacia las cámaras A (líquido folicular bovino), indican que el factor quimiotáctico presente en el líquido folicular no es específico de especie y que también actuó en el espermatozoide humano, mostrando como la especificidad de la especie en la interacción entre el ovocito y el espermatozoide podría evolucionar (Vacquier, 1998; Sun *et al.*, 2003).

El porcentaje de migración de espermatozoides de toro para las cámaras A (PA) encontrado (50.7% del total de migración) a los 25 min, fue superior al encontrado por Navarro, (1998) (43.24%) en equinos; también los promedios para las variables A y PA de los 5 toros y en cada muestra son mayores que los promedios de las variables B y PB lo que traduce mayor respuesta quimiotáctica para las cámaras con LFB.

Lo anterior implica que la quimiotaxis no solamente ocurre en humanos, equinos, ratón, conejo (Villanueva *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1999, Fabro *et al.*, 2002) sino también en bovinos, especie en la que no se había reportado este fenómeno (quimiotaxis).

Es notable destacar que en este estudio el efecto toro fue altamente significativo ($p < 0.01$), es decir los toros se comportaron en forma diferente en cada una de las variables; al ser significativo "Es importante" no hay forma de ajustar *a posteriori* la variabilidad obtenida, se reconoce como está y se debe tener en cuenta en los próximos trabajos. Las muestras son significativas ($p < 0.05$) para cada variable, salvo en la variable PA y PC y las R^2 son mucho más altas con las variables consideradas en forma directa (A, B, C) que cuando se trabajaron en porcentajes (PA, PB, PC). Los valores de R^2 en forma general son bajos sin embargo las reducciones en R^2 al suprimir la interacción, indica la importancia real de la misma, es decir las interacciones entre toro y muestra están presentes.

En estos resultados se puede concluir que los toros tienen un comportamiento significativamente diferente entre sí; que existe un efecto debido a la muestra (eyaculado) y en algunos toros este efecto se manifiesta en forma diferente a otros (interacción).

Las correlaciones entre A y TOT para los toros 1, 2, 4 y 5 son altas positivas y significativas; el valor total con A nos dió una correlación de 0.83** mientras que del total con B fue de 0.50**; lo que indica que el número de espermatozoides que migran hacia A, es considerablemente mayor, en la medida que haya más espermatozoides en el Total; en porcentajes, a mayor porcentaje de A, es menor en B (-0.37**) lo cual confirma la hipótesis de que al existir mayor porcentaje de A, esto se reduce en B como consecuencia.

Para determinar el grado de dilución óptima a la que ocurre el mayor porcentaje de migración espermática, en el caso del líquido folicular del bovino se pudo demostrar que a más baja dilución, mayor atracción espermática tanto con espermatozoides de humano como de toro. De acuerdo a ensayos previos en bovinos, la migración total fue de un 73.3%, para un 75% de dilución del líquido folicular bovino y de un 61.8% para un 50% de dilución; de un 34.7% para un 25% de dilución y con espermatozoides humanos la migración total fue de un 100% de respuesta quimiotáctica, para 75% y 50% de dilución de líquido folicular bovino y de un 79.3% para un 25% de dilución. Esto podría tener un significado biológico ya que en el periodo cercano a la ovulación la corriente de fluidos que son provocados por el batir de los cilios del epitelio del oviducto, dirigen al ovocito recién ovulado en dirección al ámpula, llevando consigo una alta cantidad de fluido folicular.

La quimiotaxis podría ser una causa de un mecanismo negativo adicional que impide al espermatozoide alcanzar el sitio de la fertilización; en otras palabras, el espermatozoide capacitado puede ser atraído por el óvulo, mientras el resto de espermatozoides maduros o prematuros son repelidos o desactivados por el mismo u otros factores liberados desde el ovocito o de células a su alrededor.

Realmente se requiere la identificación de los factores quimiotácticos, presentes en líquido folicular (Bradley y Garber, 1983; Ralt *et al.* 1991; Fabro *et al.*, 2002). En este estudio el LFB atrajo alta y significativamente los espermatozoides hacia las cámaras A, pero otra porción fue aglutinada como se comento más adelante.

La identidad del espermatozoide que tiene la habilidad de responder al quimioatrayente *in vitro*, es continuamente cambiante. Se desconoce si la capacitación es prerequisite para la respuesta de quimiotaxis (Cohen-Dayag y Eisenbach, 1994). Para poder dilucidar este punto sería necesario determinar si el espermatozoide está capacitado en el momento de colocarlo en el tubo capilar (C) o incluso, si ya se ha llevado a cabo la reacción acrosomal en los espermatozoides que migran hacia la cámara donde se encuentra el atrayente. En este estudio no se comprobó si los espermatozoides que migraron ya se habían capacitado, lo que podría ser objeto de estudio posterior.

El líquido folicular podría ser entonces la señal quimiotáctica que ocasiona que los espermatozoides que habían permanecido en el reservorio del istmo en estado latente, sean liberados y atraídos en oleadas hacia el sitio de la fertilización.

En los resultados de los diferentes ensayos de este estudio existió una gran variabilidad en la respuesta de las células al efecto toro, a la muestra, o a las diferentes concentraciones de las sustancias quimioatrayentes en el líquido folicular. Esta observación concuerda con los comentarios de Villanueva-Díaz *et al.*, (1990) que dicen que en algunos estudios se ha reportado una gran variabilidad en el número de células migradas hacia los pozos que contienen fluido folicular, no obstante muestran una clara diferencia entre el testigo y el fluido activo. La variabilidad en la respuesta de las células para un quimioatrayente parece ser un fenómeno común en este tipo de análisis. Se cree que la variación resultante podría ser debida a la diferencia en la concentración de sustancias quimiotácticas en el fluido folicular probado; también es posible que ciertos pasos definidos en la capacitación espermática que normalmente ocurren en el aparato reproductor femenino, sean necesarios para que el espermatozoide alcance la máxima expresión de esta capacidad para responder a un quimioatrayente.

La actividad quimiotáctica del líquido folicular bovino parece no disminuir cuando se almacena por largo tiempo en congelación a -20°C (Ralt *et al.*, 1991). Si bien todos los ensayos del experimento se hicieron con líquido folicular bovino fresco, es decir recién colectado, algunos ensayos previos con líquido de 8 semanas de almacenamiento a -20°C , arrojaron 71% de atracción para las cámaras A.

En este estudio se observó que el líquido folicular bovino puede causar aglutinación o atracción de los espermatozoides en la región de la cabeza. Al respecto Gnessi (1986); Walensky *et al.*, (1995); Walensky *et al.*, (1998) y Branscomb *et al.*, (2000) mencionan la presencia de receptores específicos localizados en el espermatozoide. Esta aglutinación ocurre en algunas especies cuando los espermatozoides alcanzan el óvulo, de manera que podría ser parte importante del mecanismo de la fertilización.

En cuanto a la comunicación o atracción de los espermatozoides hacia el óvulo por parte del líquido folicular, surgen algunas preguntas: ¿Cuál es la significancia fisiológica de la atracción espermática hacia el líquido folicular?, ¿Hay una necesidad de tal atracción en las especies con fertilización interna o es sólo un "recuerdo" evolutivo? (Eisenbach y Ralt, 1992; Vacquier, 1998). Todo ello permite proponer que a medida que exista comunicación entre espermatozoide-óvulo, la quimiotaxis sirve para selección de espermatozoides y este estado fisiológico permite una conveniente fertilización.

Algunos autores han encontrado que en la quimiotaxis participa el ión Ca^{2+} y que el cAMP actúa como un inductor secundario, del mismo modo sería el ANP, ya que actúa como activador de la guanilato ciclasa (Hansbrough y Garbers, 1981; Garbers *et al.*,

1982; Ward *et al.*, 1985; Zamir *et al.* 1993; Yoshida *et al.*, 1994), una excesiva cantidad de activadores de guanilato ciclasa podría causar efecto antireproductivo (Revelli *et al.*, 2002); por lo que sería interesante investigar si la adición de estos elementos al líquido folicular bovino aumenta la respuesta en términos de porcentaje de migración. También sería necesario caracterizar y purificar el factor quimioatrayente presente en el líquido folicular.

Del mismo modo y siguiendo los lineamientos presentados en el modelo de Villanueva *et al.* (1992), se creó un modelo que no necesita ser colocado en una gradilla ya que ambas cámaras tienen base de apoyo, que permite un gran equilibrio o nivelación de los líquidos para los gradientes y también para un correcto desplazamiento de los espermatozoides. Los orificios de unión entre el capilar y las cámaras tienen el mismo diámetro del capilar (1,5mm), lo que permite un ajuste perfecto, evitando el derrame de líquidos o la necesidad de utilizar pegamentos. Dichos orificios fueron hechos a 0.5 ml del nivel de cada cámara; el diámetro del orificio central de cada capilar permitió colocar los líquidos con mayor precisión evitando en alto porcentaje la presentación de burbujas.

En este trabajo se reporta un método para observar la quimiotaxis que ejerce el líquido folicular de bovino sobre el espermatozoide de toro. Este bioanálisis es altamente sensitivo, selectivo y reproducible. Esta técnica para los ensayos quimiotácticos *in vitro* permite llevar a cabo un gran número de réplicas o ensayos con una sola muestra (eyaculado).

Una de las críticas al fenómeno de la quimiotaxis se basa en que no se ha demostrado que ocurra *in vivo*, pero si se sabe que los espermatozoides permanecen quiescentes en las células epiteliales del istmo oviductal y que se sueltan y reanudan su movilidad, al ocurrir la ovulación, así que esto hace suponer que la quimiotaxis también ocurre *in vivo* (Darszon *et al.*, 2001).

En el futuro, la quimiotaxis podría ser explotada como una herramienta de diagnóstico para la calidad espermática o infertilidad masculina, o como un procedimiento de selección espermática antes de la fertilización *in vitro*, ya que una falsa o deficiente comunicación (quimiotaxis) entre los gametos, puede ser una causa de infertilidad (Eisenbach y Tur-Kaspa, 1994; Vacquier, 1998; Eisenbach, 1999a,b; Eisenbach y Tur-kaspa, 1999; Jaiswal *et al.*;1999; Oliveira *et al.*, 1999; Branscomb y White, 2000; Goto *et al.*, 2001; Fabro *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2002; Revelli *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003) tanto en bovinos como en otras especies.

Los resultados del presente estudio muestran que el líquido folicular bovino ejerce un efecto quimiotáctico hacia los espermatozoides de la misma especie.

VI. Conclusiones

Las cámaras elaboradas para este estudio son efectivas para un análisis selectivo de quimiotaxis.

El LFB funciona como atrayente para los espermatozoides de su misma especie y para espermatozoides humanos.

Se requieren más estudios por la variación del efecto muestra y las interacciones presentes entre toro y muestra.

En este estudio se concluye que el LFB atrae mayor porcentaje de espermatozoides bovinos que el HTF-BSA al 7.5%, lo cual permite proponer que varios factores originados desde el aparato reproductor de las hembras parecen estar involucrados en la fertilización de otras especies. En los mamíferos la quimiotaxis podría tener un papel muy importante en la fertilización; así mismo defectos en la quimiotaxis, influirían en la infertilidad, por lo que es razonable considerar que en el futuro la quimiotaxis podría ser explotada como una herramienta en el diagnóstico para la calidad espermática y ser usada en mejorar la penetración de ovocitos en fertilización *in vitro*; especialmente antes de *in vitro* con micromanipulador para la inserción intracitoplasmática de un solo espermatozoide (ISSI). También podría ser usada como procedimiento terapéutico de machos infértiles o también para el uso de transferencia de las secreciones del aparato reproductor de las hembras fértiles (fluido folicular) al aparato reproductor de hembras infértiles, a fin de mejorar la fertilidad.

Además, bajo la hipótesis de que el porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras con LFB, excede al porcentaje de espermatozoides que migra hacia las cámaras con líquido testigo HTF-BSA al 7.5%, dichos experimentos permitieron tener la certeza de que el líquido folicular bovino presenta quimiotaxis hacia los espermatozoides de la misma especie.

VII. Literatura citada

1. Battalia, D. E. y Yanagimachi, R., 1979. Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. *J. Reprod. Fertil.* 56: 515 – 520.
2. Bradley, M. P. y Garbers, D. L., 1983. The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochem. Biophys. Commun.* 115: 777 – 787.
3. Branscomb, A., Seger, J. y White, R. L., 2000. Evolution of odorant receptors expressed in mammalian testes. *Gen. Soc. Ame.* 156: 785 - 797.
4. Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E. Y Zeidel, M. L., 1990. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *The Amer. Soc. Phar. Exp. Ther.* (70) 3: 665 - 670.
5. Bronson, R. y Hamada, Y., 1977. Gamete interactions *in vitro*. *Fertil. Steril.* (28) 5: 570 - 576.
6. Cai, X. y Marik, J., 1990. Comparison of the effects on penetration capacity of human spermatozoa between using Ham's F-10 medium and a medium based on the composition of human tubal fluid. *Androl.* 22: 539 – 542.
7. Cai, T-Q., Weston, P.G., Lund, L.A., Brodie, B., Mckenna, D.J. y Wagner, W.C., 1994. Association between neutrophil function and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* 55 (7): 934 -943.
8. Cohen-Dayag, A. y Eisenbach, M., 1994. Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am. Physiol. Soc.* 267 (5): C1167 - C1176.
9. Cohen-Dayag, A., Ralt, D., Tur-Kaspa, I., Manor, M., Makler, A. y Dor, j., 1994. Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50: 786 – 790.
10. Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. y Eisenbach, M., 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 92: 11039 – 11043.
11. Cook, S. P., Brokaw, Ch. J., Muller, Ch. H. y Baccok, D. F., 1994. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Develop. Biol.* (165): 10 – 19.
12. Darszon, A., Beltán, C. Felix, R., Nishigaki, T. y Treviño, CL. L., 2001. Ion Transport in sperm signaling. *Develop. Biol.* 240: 1 - 14.

13. Dickman, Z., 1963. Chemotaxis of rabbit spermatozoa. *J. Exp. Biol.* 40: 1 – 5.
14. Draper, N. R. and Smith, H., 1966. Applied regression analysis. New York: John Wiley & Sons, Inc.
15. Eisenbach, M. y Ralt, D., 1992. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Amer. Physiol. Soc.* 262 (5): C1095 - C1101.
16. Eisenbach, M. y Tur-Kaspa, LL., 1994. Human sperm chemotaxis is not enigmatic anymore. *Fertil Steril* 62 (2): 233 - 235.
17. Eisenbach, M., 1999. Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* 4: 56 – 66.
18. Eisenbach, M., 1999. Mammalian Sperm chemotaxis and Its association with capacitation. *Develop. Genet.* 25: 87 – 94.
19. Eisenbach, M. and Tur-Kaspa, LL., 1999. Do human eggs attract spermatozoa? *BioEssays* 21(3): 203 - 210.
20. Fabro, G., Rovasio, A. R., Civalero, S., Frenkel, A., Roy Caplan, S., Eisenbach, M., Giojalas, L. C., 2002. Chemotaxis of Capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol. Reprod.* 67: 1565 - 1571.
21. Fetterolf, P. M. , Sutherland, Cl. S. , Josephy, P. D. , Casper, R. F. y Tyson J. E., 1994. Preliminary characterization of a factor in human follicular fluid that stimulates human spermatozoa motion. *Human Reprod* 9 (8): 1505 - 1511.
22. Flechon, J.-E. y Hunter, R. H. F., 1981. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pig, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 13: 127 – 139.
23. Garbers, D. L., Watkins, H. D., Hansbrough, J. R., Smith, A. y Misono, K. S., 1982. The amino acid secuencia and chemical synthesis of speract analogues. *J. Biol. Che.* 257: 2734 – 2737.
24. Garbers, D. L., 1989. Molecular basis of fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 719 - 742..
25. Gnessi, L., Ruff, M. R., Fraioli, F. y Pert, C. B., 1985. Demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. *Exp. cell Res.* 161: 219 - 230.
26. Gnessi, L., Fabbri, A., Silvestroni, L., Moretti, Isidori, A., C., Fraioli, F., Pert, C. B. et al., 1986. Evidence for the presence of specific receptors for N-formyl chemotactic peptides on human spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (4): 841 - 846.

27. Goto, T.; Salpekar, A. y Monk, M., 2001. Expression of a testis-specific member of the olfactory receptor gene family in human primordial germ cells. *Mol Hum Reprod* 7: 553 – 558.
28. Hafez, E. S. E., 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6a ed., México, D. F.: Ed Nueva Interamericana M. C. Graw-Hill, pp 108 - 120; 483 - 489.
29. Hansbrough, J. R. y Garbers, D. L., 1981. Speract: purification and characterization of a peptide associated with eggs that activate spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256: 1447 – 1452.
30. Hansen, C., Srikandakumar, A. y Downey B. R., 1991. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Develop.* (30): 148 - 153.
31. Herriot, DM., Warnes GM., Kerin, JF., 1986. Pregnancy-related chemotactic activity of human follicular fluid. *Fertil Steril* 51: 196 –201.
32. Hunter, R. H. F. y Nichol, R., 1986. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and the ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J. Reprod. Fertil.* 77: 599 – 606.
33. Hunter, R. H. F., 1993. Sperm: Egg Ratios and Putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol. Reprod. Develop.* (35): 324 - 327.
34. Iqbal, M., Shivaji, S., Vijayasathy, S. y Balaram, P., 1980. Synthetic peptides as chemoattractants for bull spermatozoa structure activity correlations. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 96 (1): 235 - 242.
35. Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N., Toyoda, N., 2002. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Human Reprod.* 17(6): 1441 - 1446.
36. Jaiswal, B. S., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., Eisenbach, M., 1999. Human sperm chemotaxis: Is progesterone a chemoattractant?. *Biol. Reprod.* 60: 1314 - 1319.
37. Kenakin, T. P., Bond, R. A. y Bonner, T. I., 1992. II Definition of pharmacological receptors. *Amer. Soc. Pharm. Exp. Ther.* (44): 351 – 360.
38. Lambert, H., Overstreet, J. W., Morales, P., Hanson, F. W. y Yanagimachi, R., 1985. Sperm capacitation in the human female reproductive tract. *Fertil steril* 43: 325 – 327.
39. Lefebvre, R. y Suárez, S. S., 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 54: 575 - 582.

40. Lillie, F. R., 1913. Problems of fertilization. Chicago, *University of Chicago Press* p 278.
41. Makler, A., Reichler, A., Stiller, J. y Feigin, P. D., 1992. A new model for investigating in real-time the existence of chemotaxis in human spermatozoa. *Fertil Steril* 57 (5): 1066 - 1074.
42. Makler, A., Stoller, J., Reichler, A., Blumenfeld, Z. y Yoffe, N., 1995. Inability of human sperm to change their orientation in response to external chemical stimuli. *Fertil Steril* 63 (5): 1077 - 1082.
43. Monroy, A., 1969. Interacción entre óvulos y espermatozoides. En Química y Fisiología de la Fertilización. México, D. F., *El Manual Moderno*. pp 1 - 24.
44. Navarro, M. MC. Evaluación de la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de caballo hacia el líquido folicular de yegua y determinación de la naturaleza química del quimioatrayente. Tesis de Doctorado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1998.
45. Navarro, MC. , Valencia, J. , Vásquez, C. , Cozar, E. y Villanueva, C., 1998. Crude mare follicular fluid exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 321 - 324.
46. Ohtake, H., 1976. Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. Effect of pH and egg water on the respiratory rate. *J. Exp. Zool.* 198: 303 - 312.
47. Ohtake, H., 1976. Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. II. Sperm-activating substance obtained from jelly coat of sea-urchin eggs. *J. Exp. Zool.* 198: 313 - 322.
48. Oliveira, R. G., Tomasi, L., Rovasio, R. A. y Giojalas, L. C., 1999. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J. Reprod. Fertil.* 115: 23 - 27.
49. Organización Mundial de la Salud. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 3ª Ed. Cambridge University Press: *Medica Panamericana*, 1992.
50. Overstreet, J. W. y Cooper, G. W., 1975. Reduced sperm motility in the isthmus of the rabbit oviduct. *Nature Lon.* 258: 718 - 719.
51. Pfeffer, W., 1884. Locomotorisch richtungs be we gungen durch chemische. *Bot Inst. Tu bingen* 1: 363 - 481. O también Unters bot inst Tubingen 1 (1884) 364.
52. Politis, I., Hidioglou, N., White, J. H., Gilmore, J. A., Williams, S. N., Scherf, H. y Frigg, M., 1996. Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis, in periparturient dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57 (4): 468 - 471.

53. Quinn, P., Kerin, J. F. y Warnes, G. M., 1985 Improved pregnancy in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.* 44: 493 - 498.
54. Ralt, D., Goldenberg, M., Fetterolf, P., Thompson, D., Dor, J., Mashiach, S. *et al.*, 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2840 - 2844.
55. Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur.kaspa, I., Ben-Shlomo, I., Makler, A. *et al.*, 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.* 50: 774 - 785.
56. Revelli, A., Ghigo, D., Moffa, F., Massobrio, M., y Tur-Kaspa, I., 2002. Guanylate cyclase activity and sperm function. *End.Rev.* 23(4): 484 - 494.
57. SAS Institute Inc. 1990, SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edi., Vol. 2, Cary, NC: SAS Institute Inc.
58. Schiffmann, EB., Corcoran, A., Whal, SM. 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractan for leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1059 - 1062.
59. Showell, H. J., Freer, R. J., Zigmond, S. H., Schiffmann, E. , Aswanikumar, S. , Corcoran, B. y Becker, E. L., J., 1976. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. *Exp Med* 143: 1154 -1169.
60. Siegel, M. S. and Graczykowski, J. W., 1991. Influence of porcine follicular fluid on the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 55 (6): 1204 -1206.
61. Suárez, D. S., Wolf, D. P. y Meizel, S. 1986. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14: 107 - 121.
62. Suárez, S. S., 1998. The oviductal Sperm Reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.* (58): 1105 - 1107.
63. Sun, F., Giojalas, L. C., Rovasio, R. A., Tur-Kaspa, I., Sánchez, R., y Eisenbach, M., 2003. Lack of species-specificity in mammalian sperm chemotaxis. *Develop. Biol.* 255: 423 - 427.
64. Suzuki, N., Nomura, K., Ohatake, H. y Isaka, S., 1981. Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99: 1238 - 1244.

65. Suzuki, N., Shimomura, H., Radany, E. W., Ramarao, C. S., Ward, G. E., Bentley, J. K. y Garbers, D. L., 1984. A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 59: 14874 – 14879.
66. Tesarik, J., 1985. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74: 383 – 388.
67. Tervit, H. R., Whittingham, D. G. y Rowson, L. E. A., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil* 30: 493 – 497.
68. Vadillo, O. F., Villanueva, D. C., Arias, M. J., Bermejo, L. y Bustos, L. H., 1994. Factor quimiotáctico para espermatozoides: una nueva función biológica de la progesterona. *Ginecol. Obstet. México* 62 (5): 127 –130.
69. Vacquier, V. D., 1998. Evolution of gamete recognition proteins. *Science* 281: 1995 – 1999.
70. Vásquez, J. M. , Martínez, E. A. , Matas, C. y Roca, J., 1997. Effect of progesterone on unwashed and nonpreincubated boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Theriogenology* 47 (1): 263.
71. Villanueva-Díaz, C., Vadillo-Ortega, F., Kably-Ambe, A., Díaz-Pérez, M. y Krivitzky, S. K., 1990. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril* 54 (6) : 1180 - 1182.
72. Villanueva-Díaz, C., Arias-Matínez, J., Bustos-López, H. y Vadillo-Ortega, F., 1992. Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil Steril* 58 (2) : 392 - 395.
73. Villanueva-Díaz, C., Arias-Martínez, J., Bermejo-Martínez, L. y Vadillo-Ortega, F., 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil Steril* 64 (6): 1183 - 1188.
74. Walensky, L. D., Roskams, A. J., Lefkowitz, R. J., Snyder, S. H., y Ronnett, G. V., 1995. Odorant receptors and desensitization protein colocalize in mammalian sperm. *Mol. Med.* (1): 130 - 141.
75. Walensky, L. D., Ruat, M., Bakin, R.E., Blackshaw, S., Ronnett, G., y Snyder, S.H., 1998. Two novel odorant receptor families expressed in spermatids undergo 5'-splicing. *J. Biol. Chem.*(17): 9378 – 9387.
76. Ward, G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L. y Vacquier, V. D., 1985. Chemotaxis of *arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* 101: 2324 – 2329.

77. Ward, C. R. y Kopf, G. S., 1993. Molecular events mediating sperm activation. *Develop Biol* 158: 9 -34.
78. Wassarman, P. M., 1987. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235: 553 – 560.
79. Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S., 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell. Biol.* 3: E59-E63.
80. Watson, E.D., Sertich, P. L. y Zanecosky, H. G., 1991. Detection of chemotactic factors in preovulatory follicular fluid from mares. *Am. J. Res*, (52): 1412 – 1215.
81. Wijayagunawardane, M. P. B., Miyamoto, A. , Cerbito, W. A., Acosta, T. J., Takagi, M. y Sato, K., 1998. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin in the cyclic cow. *Theriogenology* 49 (4): 607 - 618.
82. Williams, M. Hills CJ., Scudamore, I., Dunphy, B., Cooke, ID., Barrat, CLR., 1993. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod* 8: 2019 - 2026.
83. Yee, B. y Cummings, L. M., 1988. Modification of the sperm penetration assay using human follicular fluid to minimize false negative results. *Fertil. Steril.* 50: 123 - 128.
84. Yoshida, M., Inaba, K., Ishida, K. y Morisawa, M., 1994. Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but Ca²⁺ alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian, *ciona savignyi*. *Develop. Growth y Differ.* 36 (6): 589 – 595.
85. Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K., Morisawa, M., 2002. A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Pnas. Org.* 99: 14831-14836.
86. Zamir, N., Riven-Kreitman, R., Manor, M., Makler, A., Blumberg, Sh., Ralt, D. y Eisenbach, M., 1993. Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa *in vitro*. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* (197) 1: 116 -122.
87. Zigmond, SH. y Hirsch JG., 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis new methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J. Exp Med* 137: 387.
88. Zigmond, S. H., 1978. In Leukocyte chemotaxis. Raven New York, eds. Gallin, J. I. y Qui, P.G. pp. 87 – 96.0 en *J. Cell Biol.* 77 : 269.

Anexo 1. Evaluación del semen

Toro 1.

Eyaculado	I	II	II
Volumen	6 ml	4.5 ml	5 ml
Aspecto	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)
PH	7	7	7
Consistencia	normal	normal	normal
Motilidad En gota gruesa	excelente turbulencia	buena turbulencia	buena turbulencia

Toro 2.

Eyaculado	I	II	III
Volumen	1.5 ml	7 ml	7 ml
Aspecto	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)
PH	7	7	7
Consistencia	normal	normal	normal
Motilidad En gota gruesa	buena turbulencia	buena turbulencia	buena turbulencia

Toro 3.

Eyaculado	I
Volumen	4 ml
Aspecto	uniforme (blanco ópalo)
PH	7
Consistencia	normal
Motilidad En gota gruesa	buena turbulencia

Toro 4.

Eyaculado	I	II	III
Volumen	2.5 ml	1.5	3 ml
Aspecto	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)	uniforme (blanco ópalo)
PH	7,2	7	7.2
Consistencia	normal	normal	normal
Motilidad En gota gruesa	excelente turbulencia	excelente turbulencia	excelente turbulencia

Toro 5

Eyaculado	I	II	III
Volumen	4.5 ml	4.5	1.5 ml
Aspecto	Gris	ámbar claro	blanco ópalo
PH	6.5	6.5	7
Consistencia	normal	normal	normal
Motilidad en gota gruesa	turbulencia aceptable	Turbulencia aceptable	turbulencia buena

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Anexo 2. Componentes de HTF

■ Composición del HTF (Fluido Tubario Humano)

Reactivo	Molalidad	dl (1x)	PM
Na Cl	0.58g	101.60mM	58.44
K Cl	4.69mM	0.037g	74.50
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 mM	0.0024g	120
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.04 mM	0.022g	112
KH ₂ PO ₄	0.37 mM	0.0054g	136.09
NaHCO ₃	4.0 mM	0.0336g	84.01
HEPES	21.0 mM	0.476g	238.3
Glucosa	2.78 mM	0.0504g	180.09
Piruvato de sodio	0.33 mM	0.0038g	116.0
Lactato de sodio	21.4 mM	0.24g	112.1 e=132
Rojo de fenol	5mg/1	0.0005g	
Albúmina	5mg/1	0.5g	
Lactato de Calcio	0.02g	112.0	
Penicilina	100 UI ml ⁻¹		
Estreptomina SO ₄	50 UI ml ⁻¹		

Debe ajustarse a pH 7.2 ± 7.4 osmolalidad=275 -285 mosm

Preparación del ácido hialurónico

En una balanza analítica se pesaron 0.05g de ácido hialurónico (0.5% Sigma Chemical ST. Louis, MO, USA) y se le añadió HTF, hasta completar 10 ml y se colocó en un agitador por 3 horas. Posteriormente se filtró con filtro de 25µm. Una vez filtrado se guardó en tubos estériles para luego ser rotulados como ácido hialurónico al 0.05% y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Preparado de HTF-BSA al 7.5%

En 100 ml hay albumina al 22% y en 100 ml de HTF hay 0.5% de albumina

Necesito HTF al 7.5% de albúmina sérica bovina (BSA).

Si hay 22% de BSA en 100 ml; en cuantos ml obtendré el 7% de BSA.

Procedí a multiplicar $7 \times 100 = 700$ y este valor lo dividí entre 22 ($700/22$) = 31.8 ml.

Sólo necesité 10 ml, procedí a multiplicar $31.8 \times 10 = 318$ y éste valor lo dividí por 100 ($318/100$) = 3.18.

En una campana de flujo laminar se tomaron 3.18 ml de BSA y se le adicionaron 6.81 de HTF y se obtuvo HTF-BSA al 7.5%; se homogenizó y se filtró con filtro de 25 µm; además se le tomó pH 7.14 y la osmolalidad de 306 mosm, se rotuló y almacenó a -4 °C hasta su uso.

Anexo 3. Graduación de la Motilidad

Graduación de la motilidad:

A: motilidad progresiva.

B: motilidad progresiva lenta.

C: motilidad no progresiva.

D: inmóviles.

Toro 1	No. de células eyaculado:			Índice total (A+B)			Motilidad total (A+B+C)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	28	36	28						
B	52	46	44	80%	82%	72%			
C	10	12	16				90%	94%	88%
D	10	6	12						

Toro 2	No. de células eyaculado:			Índice total (A+B)			Motilidad total (A+B+C)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	20	26	20						
B	50	44	60	70%	70%	80%			
C	14	20	12				84%	90%	92%
D	16	10	8						

Toro 3	No. de células eyaculado:			Índice total (A+B)			Motilidad total (A+B+C) 1		
	1			1					
A	30								
B	50			80%					
C	10						90%		
D	10								

Toro 4	No. de células eyaculado:			Índice total (A+B)			Motilidad total (A+B+C)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	25	30	26						
B	55	50	58	80%	80%	84%			
C	14	12	12				94%	92%	96%
D	6	8	4						

Toro 5	No. de células eyaculado:			Índice total (A+B)			Motilidad total (A+B+C)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	20	14	18						
B	50	46	50	70%	60%	68%			
C	18	26	22				88%	86%	90%
D	12	14	10						