



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES – CUAUTITLÁN

**PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN PRODUCCIÓN DE OVINOS Y
CAPRINOS**

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE
MACHOS CAPRINOS JÓVENES A LA INDUCCIÓN DE LA CAPACITACIÓN Y
REACCIÓN ACROSOMAL, *IN VITRO*, PARA EVALUAR INDIRECTAMENTE SU
FERTILIDAD”**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN PRODUCCIÓN DE OVINOS Y CAPRINOS**

PRESENTA:

ANA RUTH RANGEL ALONSO

ASESORES:

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

MPA. ROSALBA SOTO GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

Gracias al Dr. Alfredo Medrano, por su tiempo, por su apoyo y por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, así como la amistad que me ha brindado.

Gracias a MPA Rosalba Soto González por el apoyo ofrecido en los momentos difíciles de este trabajo, haciendo mi investigación lo menos dificultosa posible y por su amistad brindada.

Gracias al Técnico Académico MC Francisco Rodolfo González Díaz por la capacitación en las técnicas empleadas en el presente trabajo de tesina.

Gracias a Katya Hernández, Nayelhi Serrano y al MC Francisco por haber contribuido en gran medida a la recolección de muestras para que este trabajo se haya realizado.

Gracias a los miembros del jurado: Dr. Arturo Trejo, al Dr. Alfredo Medrano y al Dr. Fernando Osnaya por sus valiosos comentarios para mejorar este escrito.

Gracias a la UNAM por ser parte de ella desde hace mucho tiempo y permitir seguir preparándome en este camino en el cual no tiene fin.

Esta tesina forma parte de los trabajos de la cátedra de investigación “Reproducción y etología animal”, NCONS-19 del PACIVE.

DEDICATORIAS:

Al ser supremo por dejarme pertenecer a un algo, a una historia que he de escribir con cada día de mi vida.

A mis padres Jesús Rangel e Inés Alonso, por seguir apoyándome en cada paso que doy, aunque a veces el camino sea más pesado, mil gracias.

A mis hermanos Isabel y Javier, por el apoyo dado a lo largo de la vida y que juntos venceremos los obstáculos que estén frente a nosotros.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado, con su apoyo (Mayra Oliva, César Garzón, Claudia, Alicia Alcantar, Carmen Márquez, Nebec Meneses)

A mis tías María y Felipa Alonso, por estar cuidándonos y por estar siempre con nosotros.

A Víctor Mora, por ser parte de mi vida, por tu amor y comprensión en las decisiones que tomo en cada paso que doy, te amo.

A mi hijo Santiago Kaled por llegar cuando más te necesitaba, te amo "razón de mi existencia".

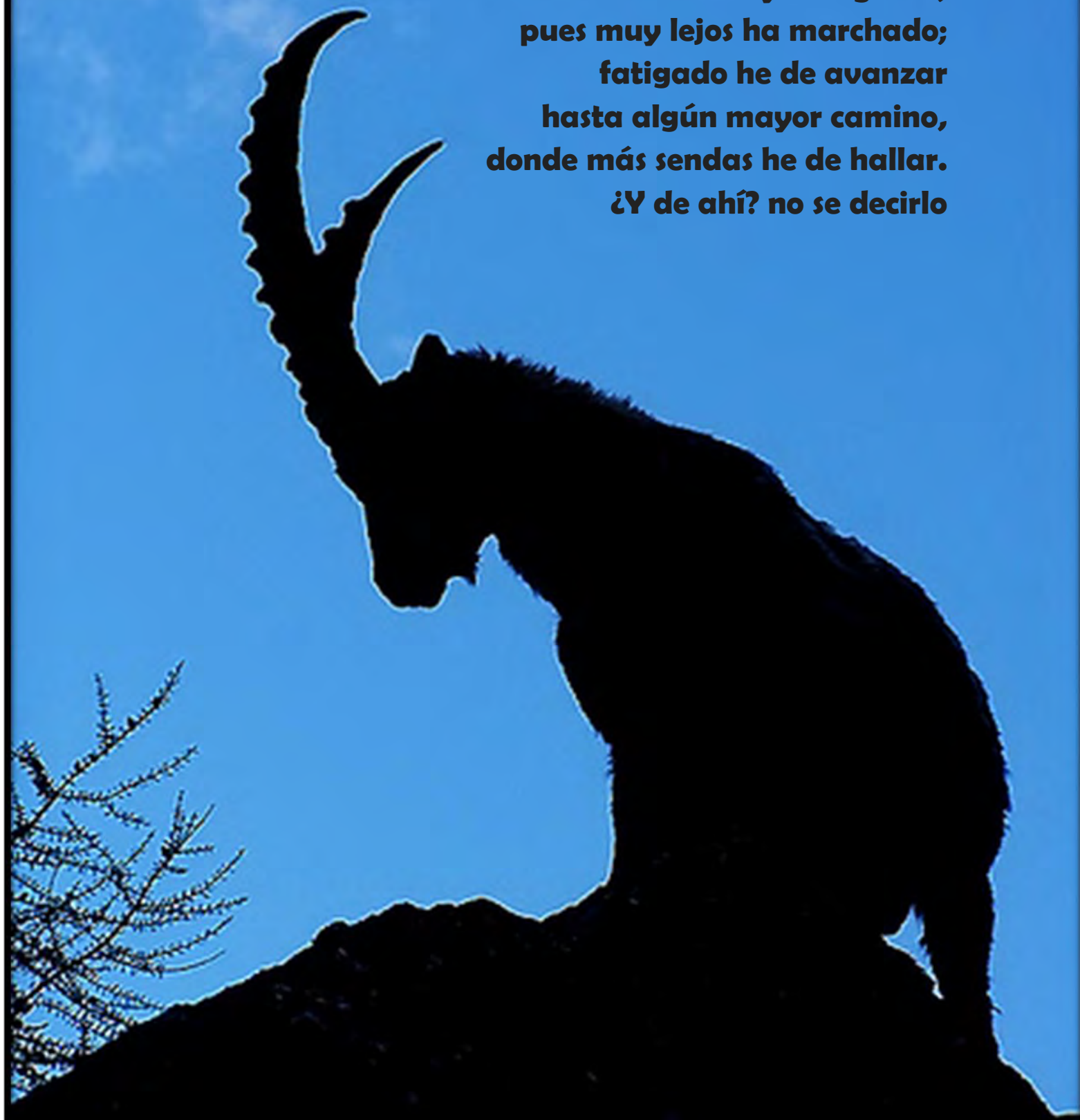
A mis compañeros de la EPOC (Bruno, Luis Miguel, Guadalupe, Carlos, Alfredo)

....."endless rain"

**El Camino sigue y sigue,
de la puerta en que ha empezado.**

**Mi deber hoy es seguirle,
pues muy lejos ha marchado;
fatigado he de avanzar
hasta algún mayor camino,
donde más sendas he de hallar.**

¿Y de ahí? no se decirlo



ÍNDICE	5
Índice de cuadros y figuras	6
1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Revisión de literatura	10
I. Pruebas de conducta sexual	11
II. Morfología del espermatozoide maduro	12
III. Eventos en el espermatozoide	14
IV. Movilidad	14
V. Capacitación espermática	14
VI. Reacción acrosomal	16
VII. Progesterona	17
VIII. Capacitación in Vitro	18
IX. Tinciones para acrosoma	19
4. Objetivos	21
5. Materiales y métodos	22
6. Resultados	30
7. Discusión	37
8. Conclusiones y recomendaciones	40
9. Bibliografía	41

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Valores de las variables de semen fresco de cada macho (Media \pm error estándar).	30
Cuadro 2. Valores de motilidad progresiva (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación con y sin Progesterona (P ₄) de cada macho.	31
Cuadro 3. Valores de acrosomas intactos (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación con y sin Progesterona (P ₄) de cada macho.	33
Cuadro 4. Valores del patrón F (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación sin y con Progesterona, de cada macho.	35
Gráfica 1. Diferencias porcentuales de la motilidad progresiva (Valor a Tiempo 0 – Valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con progesterona.	32
Gráfica 2. Diferencias porcentuales de los acrosomas intactos (valor a Tiempo 0 – valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos, incubados sin y con P ₄ .	34
Gráfica 3. Diferencias porcentuales de los patrones que indican capacitación: B + AR (valor a Tiempo 4 – valor a Tiempo 0) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con Progesterona.	36
Figura 1. Diagrama de flujo del protocolo de trabajo.	28

1. RESUMEN

El impacto del macho sobre la fertilidad y la genética ha hecho que se ponga mayor énfasis en la evaluación de los sementales llevando a cabo investigaciones para evaluar el potencial reproductivo de éstos, siendo la formación de espermatozoides, la capacitación espermática y la fertilización las más importantes. Por esta razón los estudios de fertilidad *in vitro* son muy valiosos, ya que al desarrollar pruebas objetivas nos permitirán estimar la probabilidad de que los espermatozoides sean capaces de fertilizar un ovocito. Este trabajo se llevó a cabo para evaluar indirectamente la capacidad de fertilización *in vitro* de los espermatozoides de 10 machos caprinos jóvenes, por medio de una técnica que induce la capacitación espermática y la reacción acrosomal en espermatozoides de caprino, utilizando un medio especial de cultivo (TALP) adicionando de Progesterona como factor inductor de la reacción acrosomal. La incubación de los espermatozoides caprinos se llevó a cabo en un medio TALP adicionando 2 µg/mL de Progesterona (Grupo Experimental) y otra muestra (Grupo Testigo) sin progesterona, durante 4 horas a una temperatura de 38°C y a una atmósfera de 5% de CO₂, evaluando la motilidad masal, motilidad progresiva, estado de capacitación espermática (por medio de la prueba de CTC) y la integridad del acrosoma (empleando Lectina-PSA). Hubo diferencias significativas (P<0.05) en la motilidad progresiva entre machos, con y sin Progesterona; la incubación con progesterona reveló de forma más clara las diferencias entre machos. En cuanto a la integridad del acrosoma, no hubo diferencias significativas entre machos independientemente de la presencia de Progesterona; los valores de cada macho estuvieron menos dispersos cuando se utilizó la incubación con Progesterona. En relación al estado de capacitación, hubo diferencias significativas (P<0.05) entre algunos machos en la proporción de espermatozoides capacitados (Patrones B+AR) cuando se incubaron sin Progesterona. En conclusión, se detectaron algunas diferencias en la respuesta de los espermatozoides de distintos machos para llevar a cabo los procesos de capacitación espermática y reacción acrosomal *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN

La importancia socio-económica de los pequeños rumiantes es ampliamente reconocida a nivel mundial. La cabra es la especie de ganado doméstico que en años recientes ha tenido el crecimiento más significativo a nivel mundial en cuanto a número de animales, lo que se atribuye principalmente al crecimiento de la población humana en países en desarrollo (Boyazoglu *et al.*, 2005).

Los caprinos son considerados una especie sociable, de temperamento vivaz, caracterizado por una movilidad y excitabilidad marcadas. Desde el nacimiento establece jerarquía; y en su madurez forman rebaños con estructuras jerárquicas muy fuertes y relativamente estables. Sus características de tamaño pequeño, docilidad, rusticidad, hábitos de pastoreo y adaptación, pero principalmente su capacidad de producir leche, carne, piel, fibra y abono entre otros, son las que la hacen de gran importancia para el hombre (Mellado, 1997).

Sin embargo, la atención que reciben los caprinos es muy diferente en países industrializados, comparada con los llamados del “tercer mundo”, siendo el caso de estos últimos en donde ha habido un aumento continuo y rápido en poblaciones y productos de la cabra, especialmente entre los más pobres (Iñiguez, 2004). Este punto de vista es reforzado por la gran resistencia de este animal a condiciones difíciles, como a temperaturas excesivas, alimentación insuficiente, capacidad de caminar largas distancias, el sobrevivir a las sequías, entre otros (Iñiguez, 2004).

Devendra y Burns (1983) señalan que aparte de estas ventajas, los caprinos presentan un alto potencial reproductivo, menor susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas, así como un bajo costo de producción inicial. Siendo que más del 50% de la producción caprina se encuentra en las regiones rurales más marginadas que se especializan en la producción de carne con ganado criollo, las cuales dependen del pastoreo en agostaderos naturales y esquilmos agrícolas, principalmente el maíz (FAO, 2012).

Los sistemas de producción regionales son heterogéneos, con rezagos tecnológicos y de sanidad, y con poca o nula organización e integración. Así pues, la caprinocultura genera anualmente cerca de 43,000 toneladas de carne y más de 160 millones de litros de leche caprina (SAGARPA, 2011), más del 70% es producido en los sistemas extensivos de producción de las zonas áridas y semiáridas y aproximadamente el 25% es producida en los sistema intensivos de producción de leche de cabra (SAGARPA, 2011).

Mellado (1997) ha resaltado el enorme potencial que implica lograr un incremento de la producción de leche por cabra y por hectárea en los hatos de cabras explotadas bajo condiciones extensivas en México, sin que esto implique ningún riesgo de atentar contra la estabilidad de los agostaderos. Una alternativa para lograrlo es la implementación de programas serios de mejoramiento genético en base a las condiciones existentes en nuestros sistemas de explotación y a las condiciones que debe reunir la cabra ideal para dichos sistemas de producción y a la implementación de las tecnologías reproductivas que permitan un mejoramiento genético acelerado (Mellado,1997).

Uno de los puntos más importantes en la producción de cualquier especie, es su reproducción, resulta fácil entender que no solo depende la perpetuación de la especie, sino que además debe representar un beneficio para el productor. Este beneficio se obtendrá solo cuando exista un buen manejo reproductivo que se traduzca en una elevada eficiencia (Arbiza, 1990).

Los machos son el punto de referencia en cuanto a la mejora de una ganadería ya que al aparearse con varias hembras su presión de selección ha de ser mucho mayor que para una hembra. Un macho mal elegido en una ganadería puede llevarla a un retraso selectivo y a un estancamiento en cuanto a los valores productivos y que luego se necesiten varias generaciones para subsanar el error (Arbiza, 1990).

3. REVISIÓN DE LA LITERATURA

El buen funcionamiento reproductivo del rebaño se puede considerar como la suma de las diferentes actitudes tanto del macho como de la hembra para manifestar su capacidad reproductiva (Foote, 2003). Existen diversos factores ambientales y genéticos sobre el macho y la hembra, que se reflejan en las distintas etapas fisiológicas, además el hombre influye para optimizarlas en forma de fertilidad, prolificidad y porcentaje de procreo, traducándose en ganancias para el productor, mejores posibilidades de mejoramiento genético y de reposición del rebaño (Arbiza, 1990). Sin embargo, es importante definir la capacidad sexual y de servicio así como la habilidad del macho para atraer a una hembra, inseminarla y dejarla gestante (Fowler, 1984; Mc Donald, 1991; Hafez, 2000).

El productor está interesado en la manera de manejar los animales y su entorno para conducir a una alta probabilidad de éxito reproductivo, esencial para una producción eficiente. A menudo, se están midiendo valores para poder estimar otros, como la motilidad espermática que tiene una correlación con la fertilidad. En este contexto, se enfrenta la necesidad de obtener estimaciones precisas en ambas variables, con un mínimo de errores, si se quiere establecer una relación verdadera (Foote, 2003). Además, cualquier predicción de la fertilidad deberá incluir un conjunto adicional de los errores ambientales (Oltenacu *et al.*, 1980; Aman, 1989).

La capacidad reproductiva de los animales que son utilizados como sementales en los programas de empadre, puede ser evaluada generalmente por pruebas directas por ejemplo, el número de servicios que realiza un macho para dejar gestante a una hembra, e indirectas como el examen de los genitales externos y las características microscópicas y fisicoquímicas del semen (Nwakalor y Enzinma, 1989; Galina *et al.*, 1990; Laing y Brinley, 1991). Sin embargo, hay elementos que no han sido mencionados, pero que están presentes en el apareamiento y que pueden interferir con la capacidad reproductiva del macho. Por ejemplo, el cortejo, que es una forma de atraer a la hembra y está directamente relacionado con la libido del animal y es

evaluado en relación al tiempo que transcurre desde que el animal está en contacto con la hembra y realiza la primera monta con servicio (Nwakalor y Enzinma, 1989; Mc Donald, 1991).

Considerando que en un programa reproductivo un macho puede servir a 25 hembras y su capacidad de servicio depende de su habilidad para preñarlas, se puede conocer el potencial del macho como semental, antes de ser introducido a los programas de empadre, para facilitar el desarrollo y manejo estratégico de los programas reproductivos del rebaño y mejorar la fertilidad (Mc Donald, 1991; Hafez, 1996).

Para ello se han investigado con las diferentes etapas del ciclo reproductivo como son: la formación de espermatozoides, la capacitación espermática y la fertilización. Algunas técnicas que se han empleado para medir dichas etapas son: el tamaño testicular, biopsia e histología de los testículos, la recolección de semen, la producción total de espermatozoides, la motilidad y morfología espermática y la integridad del ADN espermático (Hahn, 1999; Foote, 2003; Holt, 2009). Las características de los testículos y la producción de un gran número de espermatozoides simplifican la aplicación de una variedad de pruebas asociadas con características genéticas y fenotípicas importantes para mantener una alta fertilidad (Hunter, 1982).

I. PRUEBAS DE CONDUCTA SEXUAL

La conducta sexual ha formado parte de los patrones de evaluación de la actividad sexual y capacidad reproductiva de los machos cabríos (Ott., 1980). Además, es uno de los puntos básicos existentes sobre la caracterización racial y que podría aportar información sobre la rusticidad presente o no en los individuos de una raza determinada. La profundización en el conocimiento especializado de la conducta sexual en los machos cabríos podría proporcionar un mejor aprovechamiento de las condiciones reproductivas según el tipo racial y mejorar así el mantenimiento y gestión de un centro de sementales caprinos durante su primer año de vida (Ahmad *et al.*, 1996).

Por lo tanto, cada vez que un macho se aproxima a una hembra sexualmente receptiva, su comportamiento es influenciado por las experiencias previas con otras hembras. Por ejemplo, una medida común para el comportamiento sexual es el número de eyaculaciones durante una prueba de capacidad de servicio, ésta es baja cuando un macho es expuesto por primera vez a una hembra receptiva. A medida que la experiencia sexual es adquirida, aumenta la frecuencia de las eyaculaciones (Fabre-Nys., 2007, 2000).

El inicio de maduración sexual puede ejercer una importante influencia en la eficiencia reproductiva de un individuo; la caracterización de la pubertad y el inicio del desarrollo de la maduración sexual son un criterio importante para el uso en la selección de los machos para sementales (Ahmad, 1996).

El inicio de la maduración sexual junto con pruebas de progenie reduce el intervalo de generación, ofreciendo así una ayuda a la selección (Louw y Joubert, 1964; Madani y Rahal, 1988).

Así mismo, se puede decir que la evaluación del comportamiento sexual aunado a la evaluación del semen son herramientas para poder determinar que machos sirven como sementales, ya que pueden existir machos que presenten una buena calidad seminal pero que no presentan una buena conducta sexual pudiendo interferir con la fertilidad de un hato (Cardelas, 2010).

II. MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE MADURO

La fertilización es un proceso complejo, para llegar a término se requiere que el espermatozoide desarrolle procesos determinados que lo habilitan para fecundar el ovocito. Los procesos de la fertilización que metodológicamente pueden ser claramente definidos son: cambios en la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA).

La membrana plasmática (MP) del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delineadas denominadas dominios, los cuales difieren en cuanto a la concentración y distribución de los distintos componentes de la MP: fosfolípidos, proteínas, colesterol, carbohidratos, etc. (Frits *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Ainsworth *et al.*, 2005). Dentro de los dominios más estudiados están la región acrosomal, la cual difiere principalmente de los demás dominios precisamente porque en este lugar se encuentran más receptores a Progesterona (P_4), otro dominio importante es la región post-acrosomal, lugar donde hay depósitos de Ca^{2+} , dando una colocación diferencial entre espermatozoides capacitados y no capacitados cuando se realiza la tinción con clorhidrato de tetraciclina (CTC), otros dos dominios estudiados son el ecuatorial y la pieza media (Rathi *et al.*, 2003).

Morfológicamente los espermatozoides maduros se han dividido en tres regiones altamente especializadas: a) La cabeza. Representa la parte más voluminosa y anterior de la célula espermática y está involucrada en todos los mecanismos de interacción, entre espermatozoide y ovocito, que darán inicio a la formación de un nuevo individuo. La cabeza del espermatozoide contiene poca cantidad de citoplasma y en ella se encuentra el núcleo y el acrosoma. El acrosoma es una vesícula compleja que contiene enzimas hidrolíticas que son necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimashi *et al.*, 1994, Frits *et al.*, 2000). El acrosoma presenta un evento de exocitosis regulada, esto a través de la interacción coordinada de compuestos de origen intra y extracelular, por ejemplo: fosfoinositoles, nucleótidos cíclicos, aniones y cationes, calmodulina, P_4 , glicosaminglicanos, factores de crecimiento, microtúbulos y microfilamentos (Meizel, 1985; De Jonge *et al.*, 1993; Fabbri *et al.*, 1998). b) La pieza media. En esta región se localizan las mitocondrias, encargadas de la producción de energía. c) El flagelo. Esta región también llamada cola proporciona la movilidad a la célula (Frits *et al.*, 2000).

III. EVENTOS EN EL ESPERMATOZOIDE

El desarrollo de la capacidad para fecundar se asocia con cambios de varios aspectos de la integridad funcional del espermatozoide: a) desarrollo del potencial para mantener la motilidad progresiva, b) alteración en los patrones metabólicos y estados estructurales de los organelos específicos del flagelo, c) cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática, d) modificación, en algunas especies, de la forma del acrosoma (Robitaille *et al.*, 1991).

IV. LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Los espermatozoides de mamífero presentan dos formas de movilidad, el estado activado y el hiperactivado. La movilidad activada muestra un movimiento flagelar de baja amplitud que lo empuja a través del tracto reproductor de la hembra. Este movimiento flagelar es estimulado por la fosforilación de proteínas flagelares de Serinas/ Treoninas y Tirosinas (Turner, 2006). Se han identificado pocas proteínas que son objeto de esta fosforilación, entre ellas esta la dineína del axonema, y al parecer es un punto de regulación en el inicio de la movilidad (Tash, 1989). La movilidad hiperactivada se caracteriza por movimientos de gran amplitud que hacen que en medios de baja viscosidad el espermatozoide nade de una particular “forma de 8”. En medios de alta viscosidad la trayectoria es más progresiva. La movilidad hiperactivada es importante para el desplazamiento del espermatozoide a través del medio de alta viscosidad de los oviductos (Turner, 2006). El calcio también se requiere para el inicio y mantenimiento de la movilidad hiperactivada, esto al regular de manera directa los componentes de la maquinaria del axonema (Darszón, 2008).

V. CAPACITACION ESPERMÁTICA

Durante el recorrido que el espermatozoide debe realizar para fecundar el ovocito, se presentan diferentes condiciones extracelulares que modifican su fisiología, esto sucede durante su migración en el tracto reproductor del macho como el de la hembra.

Así, los espermatozoides almacenados en los testículos son inmóviles e incapaces de fecundar. Hasta que alcanzan el epidídimo es cuando adquieren la movilidad progresiva. Pero los espermatozoides de mamífero no son capaces de fecundar al ovocito inmediatamente de ser eyaculados, estos adquieren capacidad fecundante después de residir en el tracto reproductor de la hembra por un periodo de tiempo (Gazella, 2001).

A este proceso se le llama capacitación (Yanagimachi *et al.*, 1994). Como resultado de la capacitación se alteran procesos bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide, algunas de estas modificaciones incluyen: cambios en la composición de la membrana, alcalinización intracelular, hiperpolarización de la membrana plasmática, incremento en la concentración de calcio intracelular y activación de PKAs y cinasas de tirosina. Todos estos cambios hacen que en el espermatozoide se incremente la afinidad por un receptor de la Zona Pelucida y la progesterona, promoviendo el inicio de la reacción acrosomal y que desarrolle un patrón distinto de movilidad conocido como hiperactivación, el cual se caracteriza por movimientos flagelares pronunciados, desplazamiento lateral marcado de la cabeza espermática y una trayectoria no lineal (Bedford, 1983; Drahorat, 1991; Yanagimachi *et al.*, 1994; Flesh y Gadella 2000; Gazella, 2001).

La capacitación es necesaria en todas las especies de mamíferos, al menos con espermatozoides eyaculados. Sin embargo, en algunas especies el tiempo de capacitación es muy corto (Fournier-Delpech y Thibault, 1993; Hafez y Hafez, 2002; Juárez y Valencia, 2009).

Los espermatozoides pueden capacitarse en el istmo de especies como el cerdo y equino donde el semen es depositado en el útero. En primates y rumiantes donde los espermatozoides son depositados en la vagina la capacitación comienza al pasar por el moco cervical (Yanagimachi *et al.*, 1994; Rodríguez–Martínez *et al.*, 2005).

Los pocos espermatozoides vivos que se encuentran en el ámpula del oviducto están capacitados y son capaces de fertilizar a los ovocitos inmediatamente, la selección del pequeño número de espermatozoides que puede sufrir la capacitación se da a lo largo del tracto femenino. Esto puede explicar porque son necesarios un gran número de espermatozoides para poder obtener tasas altas de fertilidad *in vitro* (Fournier-Delpech y Thibault, 1993; Hunter, 1996).

VI. REACCION ACROSOMAL

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis que involucra múltiples sitios de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, con la subsiguiente vesiculación y liberación de enzimas acrosomales requeridas para la fertilización (Sukardi *et al.*, 1997).

Este proceso se presenta después de la capacitación, esto a nivel del tracto genital de la hembra en condiciones naturales; la RA se inicia inmediatamente después de la unión primaria del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Wasserman, 1992). Las enzimas hidrolíticas liberadas del acrosoma sirven para hidrolizar y disolver la matriz de la ZP de manera local en la dirección inmediata de la penetración del espermatozoide, lo cual finalmente asegura la entrada del espermatozoide al espacio perivitelino (Llanos *et al.*, 1993; Patrat *et al.*, 2000). Diversos estudios apoyan la evidencia de que la RA es un indicador claro de que ya se ha realizado la capacitación espermática (Frits *et al.*, 2000). A pesar de las investigaciones que se han hecho relacionadas al tema, todavía existe cierta controversia acerca de que si la RA debe considerarse como la parte terminal de la capacitación espermática o por el contrario como un fenómeno independiente, pero está bien demostrado que para que los espermatozoides puedan fertilizar el ovocito deben de estar previamente capacitados y presentar reacción acrosomal (Reyes y Chavarria, 1987; Florman y Frits, 1998; Kumakiri *et al.*, 2003).

La ZP es un iniciador fisiológico de la RA, hay reportes en la cual la progesterona secretada por las células del cúmulus también promueve la reacción acrosomal en espermatozoides de humanos (Osman *et al.*, 1989), ratón (Melendrez *et al.*, 1994), cerdo (Roldan *et al.*, 1994), equino (Meyers *et al.*, 1995) y hamster dorado (Meizel *et al.*, 1996).

VII. PROGESTERONA

La P₄ es producida principalmente por las células del cuerpo lúteo del ovario y la placenta, aunque también es producida por las células foliculares parcialmente luteinizadas antes de la ovulación. En espermatozoides de humano en condiciones *in Vitro*, la P₄ a una concentración de 14 ng/mL induce el flujo de Ca²⁺ y cuando la concentración se eleva es capaz de inducir la hiperactividad y la RA (Kumar y Thompson, 1999).

Durante la capacitación, la eliminación de componentes de la superficie deja al descubierto los receptores de P₄ en la MP del espermatozoide. Se ha demostrado que en espermatozoides de perro, obtenidos de cola de epidídimo, mas del 90% tiene afinidad por la P₄, mientras que los eyaculados no la tienen, se ha sugerido que esto se debe a que algunos factores secretados en la próstata, se agregan a la membrana de la célula (Sirivaidyapong *et al.*, 1999). Los espermatozoides que exponen receptores funcionales a P₄ inician la RA cuando se estimulan con ésta (Cheng *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 1999). La vía por la cual, en varias especies, la P₄ induce la RA es el incremento en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, por lo que posiblemente esta hormona activa directamente los canales de Ca²⁺ dependientes del voltaje (Cheng *et al.*, 1998). Los espermatozoides poseen receptores para P₄, del tipo no genómicos (Blackmore y Lattanzio, 1991; Sabeur *et al.*, 1996, Meyer *et al.*, 1998). Estos receptores difieren considerablemente de los genómicos localizados en el citosol encontrados en células somáticas (Kumar y Thompson, 1999).

Por lo anterior, está claro que la P₄ y su derivado la 17 α -hidróxiprogesterona, contenidas en el líquido folicular, inducen la RA a través de un mecanismo mediado por receptores no genómicos, presentes en la membrana plasmática del espermatozoide, particularmente sobre la región acrosomal (Blackmore *et al.*, 1990, 1991, 1993; Krausz *et al.*, 1995, Giojalas, 1998).

Concentraciones *in Vitro* de 0.3 μ g/mL de P₄ son capaces de inducir la RA en varias especies de mamíferos (Osman *et al.*, 1989; Baldi *et al.*, 1991, Melendrez *et al.*, 1994).

VIII. CAPACITACIÓN *IN VITRO*

Se han logrado capacitar espermatozoides *in Vitro* en un medio definido sin la adición de fluidos biológicos, lo que sugiere que este proceso está modulado por el mismo espermatozoide, de manera que las células están pre-programadas para sufrir la capacitación cuando son incubadas en el medio adecuado. Medios comerciales como Tyrode modificado (TALP), Krebs - Ringer suplementado con fuentes de energía como glucosa, lactato, piruvato y fuentes de proteína como la albúmina sérica (BSA), así como la adición de bicarbonato de sodio y calcio (Yanamigachi, 1994; Visconti y Kopf, 1998, Pomer *et al.*, 2002).

La capacitación *in Vitro* se ha realizado en muchas especies de mamíferos; las condiciones *in Vitro* tienden a imitar las condiciones *in vivo*, según Fournier-Delpech y Thibault (1993) éstas deben ser:

- 1) Remoción del plasma seminal y resuspensión de los espermatozoides lavados en un medio que les permite sobrevivir y capacitarse.
- 2) Presencia de un receptor de colesterol, el suero sanguíneo o suero de albúmina (bovino BSA o humano HSA). Estas proteínas remueven el colesterol, de esta manera se facilita el aumento de fluidez de la MP.
- 3) La presencia de heparina y otros glucosaminoglicanos en el medio capacitante incrementan la tasa de fertilización *in Vitro* en ganado. Estas sustancias son secretadas en los oviductos y en el útero de la vaca y la oveja.

IX. TINCIONES PARA EL ACROSOMA

La tasa y la extensión de los cambios precedentes a la reacción acrosomal han sido muy difíciles de investigar debido a que no hay cambios observables en la morfología, además de que los espermatozoides en un eyaculado no se capacitan en forma sincronizada sino en pequeñas subpoblaciones. Hay dos clases de pruebas fluorescentes para la determinación del estado acrosomal: las que detectan material asociado al acrosoma (intracelular) y por lo tanto requieren que la célula sea permeabilizada antes de realizar la tinción, y las que pueden ser usadas en células vivas no permeabilizadas. En la primera categoría se encuentran las lectinas y anticuerpos para los antígenos intracelulares acrosomales; en la segunda categoría se encuentra la clortetraciclina y los anticuerpos para los antígenos expuestos en el exterior de la célula (Cross y Meizel, 1989).

Las lectinas y anticuerpos no siempre están unidos a los espermatozoides de manera uniforme. Esto sugiere que existe una heterogeneidad en la población de espermatozoides. Esta propiedad ha permitido observar los cambios que sufre la superficie de la membrana espermática durante la maduración epididimaria en los espermatozoides de diversos mamíferos incluyendo el cordero, rata, conejo, cerdo, perro y el ratón (Cross y Watson, 1994).

La determinación del estado del acrosoma puede ser realizada en espermatozoides vivos, la ausencia de fluorescencia es indicativa de un acrosoma intacto y la fluorescencia es indicativa de daño o reacción acrosomal, esta técnica es usada principalmente en combinación con citometría de flujo. Cuando la determinación se lleva a cabo en espermatozoides fijados y permeabilizados, la fluorescencia completa del acrosoma nos indica que esta estructura está intacta, mientras que los acrosomas con baja fluorescencia o una banda de fluorescencia ecuatorial muestra daño o reacción acrosomal (Silva y Gazella, 2006).

La prueba de clortetraciclina fluorescente (CTC) permite estudiar la capacitación en varias especies, caracterizándose tres diferentes patrones: el patrón F asociado a células no capacitadas, el patrón B para células que están parcialmente o han completado la capacitación pero sin reacción acrosomal y el patrón AR característico de células con reacción acrosomal (Curry, 2000).

Aunque no están claros los detalles del mecanismo de la CTC, una hipótesis propone que la clortetraciclina podría interactuar con el calcio en la superficie espermática y por lo tanto sería un indicativo de la actividad de la bomba calcio-ATPasa (Holt y Medrano, 1997). Las desventajas de este método es que tiende a ser un proceso laborioso y tardado al evaluar la reacción acrosomal (Cross y Meizel, 1989).

4. OBJETIVOS

General. Evaluar la respuesta de los espermatozoides de distintos machos cabrios para llevar a cabo el proceso de capacitación espermática y reacción acrosomal en un medio especial adicionado de progesterona.

Específicos. Evaluar la motilidad espermática, el estado de capacitación y la reacción acrosomal de de los espermatozoides de diez machos cabrios, incubados en medio TALP con y sin progesterona, incubados durante 4 horas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

El presente trabajo se realizó en el Módulo de Caprinos (Centro de Enseñanza Agropecuaria) y en el laboratorio de Reproducción y Comportamiento Animal de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, Campo 4, ubicado en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán – Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 2,450 msnm, a 19 grados 43 minutos de latitud norte, y a 99 grados 14 minutos de longitud poniente.

Animales

Se emplearon los eyaculados de 10 machos cabríos, adultos, encastados con Alpino, con una edad de 18 meses en promedio, todos ellos alojados en un corral comunitario techado de 16 m², bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. Los machos fueron identificados mediante aretes de plástico, fotografías y un número pintado en el flanco derecho del animal.

Obtención y procesamiento del semen

La recolección del semen se realizó 2 días a la semana de 3 diferentes machos cada sesión (un solo eyaculado por macho). El semen se colectó mediante la técnica de la vagina artificial empleando a una hembra sujeta a una trampa.

Una vez obtenido el semen se realizó una dilución 1:1 (v/v) con un medio de transporte modificado (Evans y Maxwell, 1990) y se trasladó al laboratorio en una caja térmica, la cual contenía una bolsa de solución salina fisiológica previamente calentada para mantener una temperatura aproximada de 37°C durante su traslado. Las muestras llegaron al laboratorio en un periodo máximo de 20 minutos.

Evaluación

A su llegada al laboratorio, el semen fue evaluado tomando los siguientes puntos:

a) Evaluación macroscópica

1. Volumen
2. Color
3. Consistencia
4. Presencia de cuerpos extraños

b) Evaluación microscópica

- A. Motilidad masal
- B. Motilidad progresiva (semen diluido 1:100 (v/v) en solución salina fisiológica (0.9% p/v)
- C. Integridad de la membrana plasmática
- D. Anormalidades
- E. Integridad de la membrana acrosomal.
- F. Concentración espermática.

a) Evaluación macroscópica

Se evaluó en el mismo tubo colector graduado donde fue obtenido, expresándose el volumen en mililitros (mL), en forma paralela se observaron posibles anormalidades en el eyaculado en cuanto al color, olor o aspecto que pudiera presentar.

b) Evaluación microscópica

A. Motilidad masal (MM)

Para esta determinación se colocó una gota de semen, mediante una Pipeta Pasteur sobre un portaobjetos colocado sobre la platina térmica a 32°C. Posteriormente y sin

colocar un cubreobjetos se observó con aumento 10x los bordes de la gota y la zona ubicada entre el centro y el borde de la misma, observando el movimiento de oleaje del semen. La evaluación se hizo con una escala de 0-3, en donde el valor de 3 es de una motilidad de oleaje excelente (rápido y denso), 2 buena (rápido pero no muy denso), 1 mala (densidad variable, lento) y 0 nula.

B. Motilidad progresiva (MP)

Para estimar el porcentaje de espermatozoides en movimiento se tomaron 200 μ L del semen recolectado y se agregaron a 9.8 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF), realizando la dilución 1:100 v/v. Posteriormente se agregó una gota de esta mezcla sobre un portaobjetos cubriéndolo con un cubreobjetos atemperado a 32°C sobre una platina térmica, y la observación se llevó a cabo en un microscopio óptico con el objetivo de 20x, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0 -100% en múltiplos de 5.

C. Integridad de la membrana plasmática

Para evaluar la Integridad de la membrana plasmática (viabilidad), se utilizó la tinción Eosina-Nigrosina. El frotis se realizó depositando una gota de semen diluido (1:100, v/v) en un portaobjetos atemperado, agregándole una gota de la tinción antes mencionada y mezclando ambas gotas extendiéndolas en una capa delgada y secándola con aire rápidamente. La laminilla con la muestra se observó al microscopio óptico con el aumento de 40x, contándose 200 espermatozoides por laminilla de manera aleatoria y el resultado se expresó como porcentaje de células vivas. Los espermatozoides sin teñir (blancos) se consideran vivos y los teñidos (rosa) total o parcialmente se consideran muertos (Hafez 2000).

D. Anormalidades

El porcentaje de anomalías se determinó a través de la observación del frotis con la tinción Eosina-Nigrosina. Este frotis se observó al microscopio óptico con el aumento de 40x, contándose 200 espermatozoides por laminilla expresando el resultado de anomalías primarias y secundarias en porcentaje (Hafez 2000).

E. Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática del eyaculado, se llevó a cabo utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico con aumento de 40x; se empleó una dilución de semen 1:200 (v/v) con solución salina formolada (0.3% v/v). Se contaron los espermatozoides contenidos en 5 de los 25 cuadros de cada lado de la cámara.

Centrifugación

Posterior a la evaluación del semen recolectado éste fue diluido en un volumen de 1+5 (v/v) con solución de lavado (Evans y Maxwell, 1990) y se centrifugó a 700 x g por 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de retirar el plasma seminal; una vez que el plasma fue retirado, el botón de espermatozoides fue resuspendido con un medio especial para incubación (TALP, anexo 1) hasta 2 mL y se ajustó a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/mL, después la suspensión de espermatozoides diluidos en TALP se dividió en dos alícuotas.

Incubación con progesterona

Las muestras incorporadas al medio TALP fueron incubadas en una incubadora para cultivos celulares con una atmósfera de 5% de CO₂ y a 38°C.

A una de las alícuotas de cada macho que fueron incubadas se le agregó 2 µg/mL de progesterona (Sigma, México) para inducir la capacitación y la reacción acrosomal (Grupo Experimental); la otra muestra no recibió progesterona (Grupo Testigo). Ambas muestras fueron incubadas bajo las mismas condiciones y evaluadas en el mismo tiempo (tiempo 0 y tiempo 4).

Estado de capacitación

Para evaluar el estado de capacitación se realizó la prueba de clortetraciclina (CTC) utilizando el microscopio de fluorescencia. La solución CTC contenía un amortiguador (NaCl 130 Mm, Tris 20 Mm), CTC-HCl (850 mM) Cisteína (5 Mm) y con un pH de 7.9 (Green y Watson, 2001).

Posteriormente se agregaron 100 μ L de la solución CTC a 100 μ L de cada una de las alícuotas de semen con progesterona y sin progesterona y se mezclaron durante 30 segundos; enseguida se añadieron 22 μ L de solución fijadora de glutaraldehído al 0.2% (v/v). Después, se preparó una laminilla con 10 μ L de la mezcla anterior y una gota de DABCO (220 Mm diluido en glicerol/PBS 9:1) para retrasar la pérdida de fluorescencia, y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo una presión suave. Las laminillas se observaron en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x; se determinó el porcentaje de los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide de acuerdo a la clasificación utilizada por Kaneto *et al.* (2002):

Patrón F. Fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide, patrón de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.

Patrón B. Una banda libre de fluorescencia en el dominio postacrosomal, patrón de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.

Patrón AR. Poca o nula fluorescencia en la totalidad de la cabeza con una banda de fluorescencia brillante a lo largo del segmento ecuatorial y otra variante consistente en la emisión de fluorescencia en la región postacrosomal, patrón de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

Determinación de la integridad acrosomal.

Para la determinación de la integridad acrosomal se utilizó la lectina del chicharo (PSA - *Pisum sativum agglutinin*) unida con fluorocromo FITC (isotiocionato de fluoresceína). Se realizaron y se prepararon frotis secados al aire de las alícuotas de semen incubadas, las cuales fueron fijadas por una hora en etanol al 96%. Una vez concluido el tiempo de fijación, las laminillas con la muestra fueron secadas al aire y se le agregaron 20 μ L de lectina en la superficie de cada laminilla, distribuyéndola uniformemente manteniéndose en la oscuridad por 10 minutos. Enseguida los frotis se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se les agregó una gota de DABCO. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos ejerciendo presión suave, observándose al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x; se examinaron 200 células por laminilla de cada uno de los machos con y sin progesterona evaluando la uniformidad del borde apical (Cross y Meizel, 1989).

DIAGRAMA DE FLUJO

Evaluación del semen
(Motilidad, viabilidad, concentración, anomalías, integridad del acrosoma)



Remoción de plasma seminal
(Centrifugación a 700 g por 15 min.)



Dilución con medio TALP y obtener alícuotas
de 100×10^6 /mL.



Incubación de los espermatozoides en el medio TALP A 38°C,
durante 4 horas y a una atmósfera de 5% de CO₂

Se le agregó 2 µg/mL de Progesterona
en las alícuotas de semen

Sin Progesterona y se incubó
bajo las mismas condiciones



**Evaluación de semen (Motilidad Progresiva, prueba de CTC y
Reacción Acrosomal (patrón F, B y AR) al tiempo 0 y 4 horas de incubación.**

Análisis estadístico

Los datos del semen fresco se analizaron mediante estadística descriptiva. Para detectar posibles entre el Tiempo 0 y el Tiempo 4 horas de incubación, los datos de las variables, motilidad progresiva, integridad del acrosoma y el estado de capacitación, todas ellas expresadas como porcentajes, se analizaron mediante la prueba t de Student previa transformación de los datos al arcoseno para normalizarlos.

Para analizar posibles diferencias en las variables, motilidad progresiva, integridad del acrosoma y el estado de capacitación dentro de macho, se empleo la prueba de pares de Wilcoxon.

Las diferencias porcentuales (diferencias de los valores al Tiempo 0 y el Tiempo 4 horas de incubación) de las variables, motilidad progresiva, integridad del acrosoma y el estado de capacitación, entre machos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, en caso necesario se empleo la prueba de pares de Wilcoxon.

Los datos se analizaron empleando el programa Statistica (Statsoft Ltd, UK) versión 5 (1997).

6. RESULTADOS

Los valores de las diferentes variables del semen fresco de cada macho se presentan en el **cuadro 1**. En éste se puede observar que existió variación inicial entre machos.

Cuadro 1. Valores de las variables de semen fresco de cada macho (Media \pm error estándar).

Macho	Volumen (mL)	Motilidad Masal	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad (%)	Normales (%)	Concentración (X10⁶/mL)
14	1.34 \pm 0.18	2.1 \pm 0.18	74 \pm 6.59	86.6 \pm 1.53	78.8 \pm 5.8	6249.6 \pm 321.1
7	1.5 \pm 0.17	2.2 \pm 0.12	84 \pm 4.8	78.7 \pm 7.52	91.4 \pm 2.29	6094 \pm 427.2
9	1.4 \pm 0.1	2 \pm 0.27	75 \pm 9.08	79.4 \pm 1.96	89 \pm 4.03	4786 \pm 1089.7
6	1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.37	57 \pm 14.3	65.8 \pm 7.71	72.8 \pm 7.06	2943.6 \pm 389.7
19	0.52 \pm 0.08	2 \pm 0.27	75 \pm 6.89	83.7 \pm 2.17	89.8 \pm 2.03	5297.4 \pm 1284
13	0.84 \pm 0.11	2.1 \pm 0.18	85 \pm 3.87	84.6 \pm 2.01	89.4 \pm 3.17	4534 \pm 1175.2
4	0.72 \pm 0.11	0.6 \pm 0.1	18 \pm 7.17	53.9 \pm 8.2	29.4 \pm 7.16	2815.8 \pm 342.8
8	0.28 \pm 0.06	1.7 \pm 0.33	72 \pm 6.81	76.6 \pm 2.4	92.2 \pm 0.86	3567 \pm 755.3
17	1.24 \pm 1.22	1.9 \pm 0.29	80 \pm 1.5	77 \pm 2.5	87.6 \pm 4.0	3263.2 \pm 315.0
2	0.86 \pm 0.2	1.6 \pm 0.29	62 \pm 4.63	70.6 \pm 4.73	93.4 \pm 1.83	4504 \pm 679.8
Valor promedio	0.98 \pm 0.07	1.8 \pm 0.09	68.2 \pm 3.4	75. \pm 1.93	81.4 \pm 2.91	4405.4 \pm 277

1) Motilidad progresiva

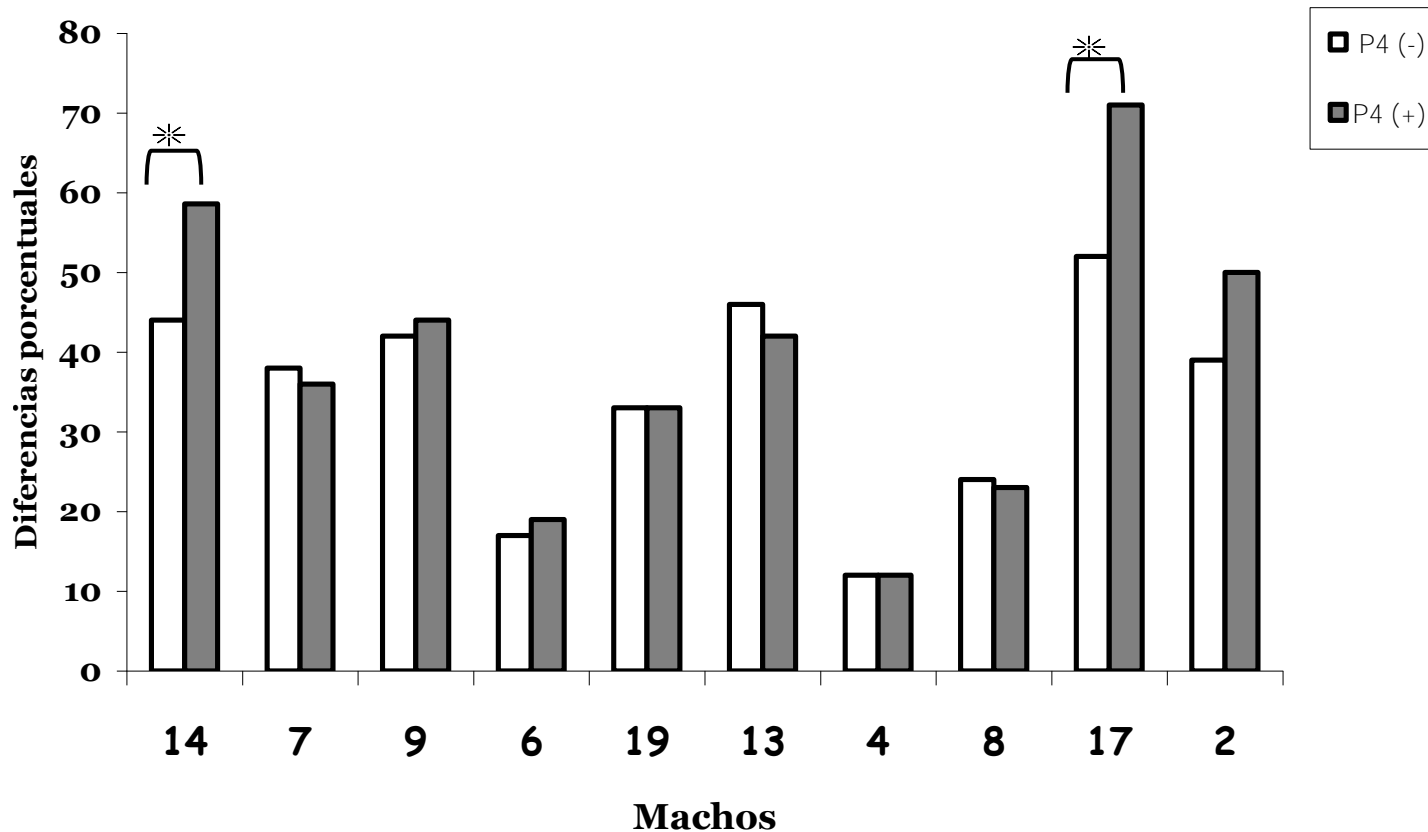
En el **Cuadro 2** se observan los valores obtenidos de la motilidad progresiva de cada macho cabrio en el tiempo 0 y 4 horas de incubación sin y con progesterona (P₄), en una incubadora para cultivos celulares con una atmósfera de 5% de CO₂ y a 38°C. Se puede observar que la incubación de los espermatozoides disminuye de manera significativa la motilidad progresiva (P<0.05) en casi todos los machos, independientemente de la progesterona.

Cuadro 2. Valores de motilidad progresiva (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación con y sin Progesterona (P₄) de cada macho.

Macho	Sin Progesterona		Con Progesterona	
	Tiempo 0	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 4
14	82 ± 8.4a	38 ± 22.8b	87,6 ± 8.2x	29 ± 25.3y
7	79 ± 10.8a	41 ± 24.8b	89 ± 4.2x	53 ± 16y
9	81 ± 9.6a	39 ± 23b	92 ± 2.7x	48 ± 36.7y
6	62 ± 16.8a	45 ± 23.2a	74 ± 16.4x	55 ± 19x
19	84 ± 6.5a	51 ± 13.4b	88 ± 7.6x	55 ± 24y
13	86 ± 4.2a	40 ± 12.7b	87 ± 9.1x	45 ± 14.6y
4	20 ± 11.7a	8 ± 7.6b	25 ± 14.6x	13 ± 13x
8	85 ± 5a	61 ± 14.7b	89 ± 7.4x	66 ± 14.3y
17	79 ± 2.2a	27 ± 9.7b	93 ± 5.7x	22 ± 10.4y
2	81 ± 5.5a	42 ± 30.5b	85 ± 7.1x	35 ± 31.5y
Valor promedio				

Los valores son medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (ab, sin P₄; xy con P₄) dentro de renglón difieren significativamente (P<0.05).

En la **Gráfica 1** se observan las diferencias porcentuales en la motilidad progresiva (Valor a Tiempo 0 – Valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con P₄. Existieron diferencias significativas (P<0.05) entre algunos machos.*



Grafica 1. Diferencias porcentuales de la motilidad progresiva (valor a Tiempo 0 menos valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos, incubados sin y con P₄. No hay diferencias significativas entre machos sin y con Progesterona.*Indica diferencias significativas dentro de macho (P<0.05).

2) Integridad del Acrosoma

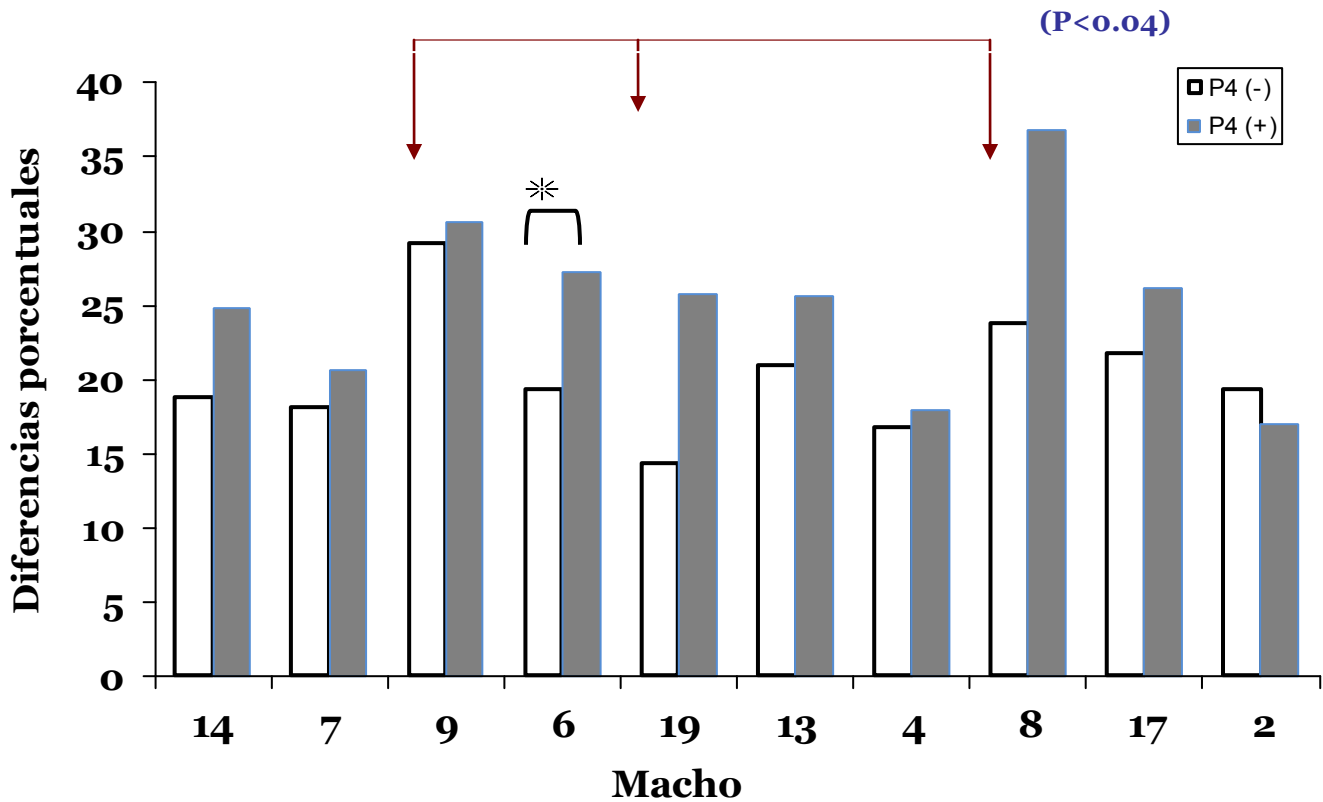
En el **Cuadro 3** se presentan los valores de los acrosomas intactos entre ambos tratamientos y en los diferentes tiempos de incubación. Se puede observar que la incubación de los espermatozoides disminuye de manera significativa el porcentaje de acrosomas intactos ($P < 0.05$) en todos los machos, independientemente de la presencia de progesterona.

Cuadro 3. Valores de acrosomas intactos (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación con y sin Progesterona (P_4) de cada macho.

Macho	Sin Progesterona		Con Progesterona	
	Tiempo 0	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 4
14	74.8 ± 16.5a	56 ± 18.3b	61 ± 14.2x	36.2 ± 7.6y
7	75 ± 8.2a	56.8 ± 7.2b	58.8 ± 5.8x	38.2 ± 11.9y
9	85.2 ± 8.1a	56 ± 17.6b	67.6 ± 12.8x	37 ± 12.6y
6	72.8 ± 7.9a	53.4 ± 11.7b	66.6 ± 9x	39.4 ± 10.7y
19	69.2 ± 14.1a	54.8 ± 13.9b	60.6 ± 13.9x	34.8 ± 10.9y
13	66.4 ± 7.8a	45.4 ± 7.9b	58.2 ± 11.2x	32.6 ± 6.6y
4	55.8 ± 18.3a	39 ± 13.3b	43.8 ± 14.9x	25.8 ± 10.3y
8	85.2 ± 9.3a	61.4 ± 11.8b	75.6 ± 11.7x	38.8 ± 15.0y
17	75.8 ± 9.7a	54 ± 8.5b	63.4 ± 9.8x	37.2 ± 6.2y
2	67.8 ± 9.7a	48.4 ± 7.8b	53.8 ± 7.9x	36.8 ± 6.9y

Los valores son medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (ab, sin P_4 ; xy con P_4) dentro de renglón son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

En la **Gráfica 2** se presentan las diferencias porcentuales de los acrosomas intactos (Valor a Tiempo 0 – Valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con P₄. No existieron diferencias significativas (P>0.05) entre machos independientemente de la presencia de progesterona.



Gráfica 2. Diferencias porcentuales de los acrosomas intactos (valor a Tiempo 0 menos valor a Tiempo 4 horas de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos, incubados sin y con P₄. La línea roja con puntas indica diferencias significativas entre algunos machos cuando fueron incubados sin Progesterona.

* Indica diferencias significativas dentro de macho (P<0.05).

3) Estado de capacitación

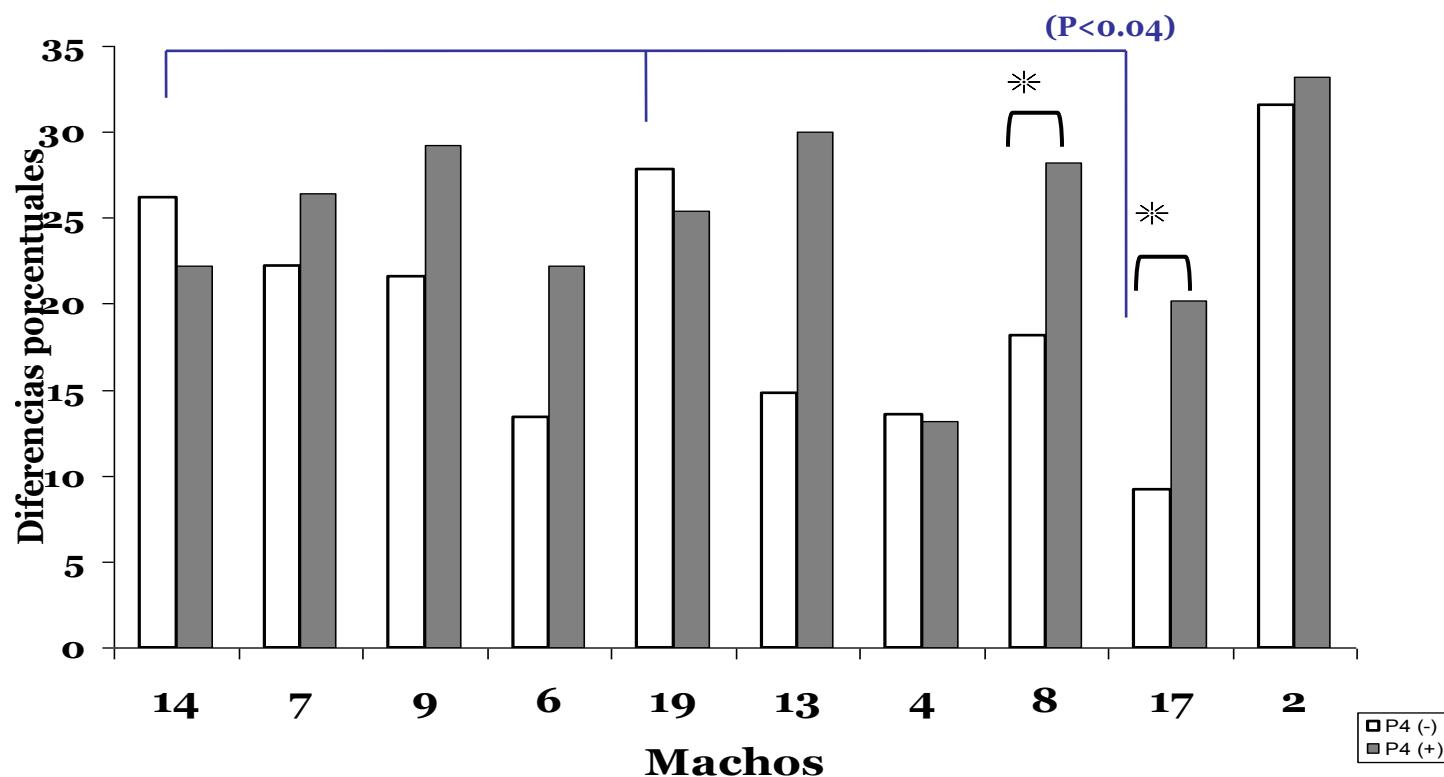
En el **Cuadro 4** se presentan los valores promedio de cada individuo del patrón F (espermatozoides No Capacitados con Acrosoma Intacto) en el semen incubado sin y con Progesterona. La incubación de los espermatozoides disminuyó de manera significativa el porcentaje del Patrón F ($P < 0.05$) en todos los machos, independientemente de la progesterona.

Cuadro 4. Valores del patrón F (%) en tiempo 0 y 4 horas de incubación sin y con Progesterona, de cada macho.

Macho	Sin Progesterona		Con Progesterona	
	Tiempo 0	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 4
14	59.8 ± 11.8a	32 ± 7.9b	31.2 ± 10.6x	10 ± 3.1y
7	50 ± 22.8a	27.8 ± 6.8b	33.6 ± 15.4x	7.2 ± 5.2y
9	46.4 ± 16.3a	24.8 ± 3.5b	36.2 ± 17.9x	7.0 ± 6.8y
6	40.6 ± 8.9a	27.2 ± 6.7b	29.4 ± 12.0x	7.2 ± 5.6y
19	54.2 ± 9.3a	26.4 ± 8.8b	39.4 ± 13.9x	9.2 ± 10.9y
13	46 ± 16.6a	31.2 ± 11.8b	40 ± 15.9x	10.0 ± 6.3y
4	34 ± 8.5a	20.4 ± 10.1b	27.8 ± 8.7x	12.4 ± 7.3y
8	47.4 ± 9.0a	29.2 ± 5.0b	35.4 ± 10.9x	7.2 ± 6.5y
17	39.2 ± 19.6a	30 ± 16.6b	28.8 ± 16.7x	8.6 ± 4.2y
2	58.8 ± 10.6a	27.2 ± 6.1b	50.8 ± 16.5x	12.0 ± 4.5y

Los valores son medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (ab, sin P₄; xy con P₄) dentro de renglón son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

En la **Gráfica 3** se presentan las diferencias porcentuales de los patrones que indican capacitación: B + AR (Valor a Tiempo 4 – Valor a Tiempo 0 de incubación) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con Progesterona. Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre algunos machos cuando se incubó sin progesterona.



Gráfica 3. Diferencias porcentuales de los patrones que indican capacitación: B + AR (valor a Tiempo 4 menos valor a Tiempo 0) de los espermatozoides de los distintos machos incubados sin y con Progesterona. La línea azul indica diferencias significativas entre algunos machos cuando fueron incubados sin Progesterona.

* Indica diferencias significativas dentro de macho ($P < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó para evaluar indirectamente la capacidad reproductiva de los machos caprinos mediante la inducción de la capacitación espermática y la reacción acrosomal, adicionando un factor inductor de la reacción acrosomal (Progesterona). El objetivo fue probar si bajo las condiciones experimentales utilizadas era posible identificar diferencias entre machos en la respuesta a dichos procesos fisiológicos, y en consecuencia diferencias en la fertilidad *in vivo*.

La efectividad de la progesterona como inductor de la reacción acrosomal se ha probado con anterioridad en espermatozoides caprinos (Somanath *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias en los valores observados al inicio (Tiempo 0) y a las 4 horas (Tiempo 4) de incubación, esto demuestra que las condiciones que se emplearon en este trabajo fueron las adecuadas para inducir la capacitación espermática. Resultados similares también fueron observados en otros trabajos de capacitación y reacción acrosomal *in vitro* de espermatozoides caprinos (Somanath *et al.*, 2000; Martínez y Carvajal, 2010) y en espermatozoides de humano (Meizel y Kenneth, 1991).

Existen varias pruebas para poder predecir la fertilidad de algún macho como la evaluación de la motilidad espermática, considerada como prueba de rutina para identificar los machos sobresalientes, y así poder usarlos para inseminación artificial; y la evaluación de la integridad del acrosoma, que ha mostrado una correlación positiva con la fertilidad *in vitro*. Sin embargo, algunos autores han cuestionado la correlación observada entre esos parámetros y la fertilidad (Selvaraju *et al.*, 2008), incluso en otros trabajos no se ha reportado algún tipo de correlación positiva (Bailey *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1999).

Los métodos convencionales basados principalmente en el análisis descriptivo del semen como la valoración del volumen, concentración del eyaculado, la valoración de los espermatozoides móviles, así como la determinación del porcentaje de

espermatozoides vivos y morfológicamente normales, proporcionan únicamente aspectos indirectos de la competencia funcional de los espermatozoides (Palomo Peiro, 1995). Por esta controversia, es necesario incorporar otras pruebas que muestren mayor correlación con la fertilidad, como el estado de capacitación espermática y la evaluación de la reacción acrosomal, así como incluir pruebas de la conducta sexual de los machos con la finalidad de poder obtener mayor información de la capacidad reproductiva del macho.

En otros trabajos se ha utilizado agentes inductores de la reacción acrosomal tales como la progesterona en espermatozoides de humano (Osman *et al.*, 1989), de ratón (Melendrez *et al.*, 1994), de caballo (Meyers *et al.*, 1995), de cerdo (Melendrez *et al.*, 1993), de hámster dorado (Meizel *et al.*, 1990; Llanos y Anabalon, 1996) y de caprino (Somanath *et al.*, 1999); también se ha empleado Ionóforos (Birck *et al.*, 2010), homólogos de la Zona Pelucida (Somanath *et al.*, 1999) y compuestos de fosfatidilcolina (Graham y Foote, 1987). En los trabajos mencionados anteriormente se ha reportado una correlación positiva de la respuesta de los espermatozoides a la inducción acrosomal con la fertilidad *in vivo*.

En nuestro trabajo se realizó la inducción de la capacitación y reacción acrosomal mediante la progesterona; nuestros resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los machos en lo que respecta a la reacción acrosomal. Esto sugiere que quizá el grupo de machos con el que se trabajó fue demasiado homogéneo en cuanto a calidad espermática inicial, aunque algunos machos si fueron diferentes desde el inicio del experimento. En contraste, se observaron diferencias entre algunos machos en la proporción de patrones que indican capacitación, aunque esto fue en el tratamiento sin progesterona.

Otros autores han observado respuestas diferentes en machos fértiles y subfértiles (Petrunkina *et al.*, 2005). Estos autores observaron que dentro de los machos subfértiles algunos mostraron una disminución mientras que otros mostraron un aumento en dicha respuesta en comparación con los machos fértiles, lo cual establece

que la subfertilidad de algunos machos pudiera deberse a una respuesta demasiado rápida o demasiado lenta, en consecuencia no debe juzgarse la magnitud de dicha respuesta de manera absoluta sino como una secuencia ordenada de eventos. Chen *et al.* (1989), observó que hay una variación entre machos en el tiempo que ocurre la capacitación espermática.

En estudios recientes, se empleó semen de 100 toros para ver si era posible utilizar la inducción de la reacción acrosomal como un método potencial para identificar toros con fertilidad reducida (Birck *et al.*, 2010). Estos autores concluyen que la inducción de la reacción acrosomal (porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en la población de espermatozoides vivos) fue el mejor índice para la predicción de la fertilidad.

Los resultados del presente trabajo nos indican que se debe continuar investigando en esta línea para poder establecer las condiciones más apropiadas de incubación de los espermatozoides de distintos machos, de tal forma que nos revelen *in vitro* el potencial de dichos machos en condiciones de campo.

8. Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, se detectaron algunas diferencias en la respuesta de los espermatozoides de distintos machos para llevar a cabo los procesos de capacitación espermática y reacción acrosomal *in vitro*.

Esta aproximación experimental podría utilizarse, potencialmente, para predecir *in vitro* el potencial reproductivo de un macho. De manera complementaria, se requiere hacer pruebas de comportamiento sexual que nos proporcionen mayor información del individuo evaluado.

Se sugiere continuar con esta línea de investigación, en particular se sugiere probar distintas dosis de progesterona en el medio de incubación para ver si se puede obtener una diferenciación más clara entre machos.

9. Bibliografía

1. Ainsworth C. 2005. The secrets life of sperm. *Nature* 436, 770-771
2. Ahmad N y Noakes DE. 1996. Sexual maturity British breeds of goat kids. *Br. Vet. J.* 152, 93.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 2002. *Biología molecular de la célula*. 3ra ed. Barcelona: Omega. pp. 1083-1109.
4. Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10, 89–98.
5. Anand SR, Atreja SK, Chauhan MS y Behl R. 1989. In vitro capacitation of goat spermatozoa. *Ind. J. Exp. Biol.* 27, 921- 924.
6. Arbiza SI. 1990. *Producción de Caprinos*. Mexico DF. A.G.T. Editor S.A.
7. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21:1–7.
8. Baldi E, Casano R, Falsetti C, Kraus C, Maggi M, and Forti G 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12: 323-330.
9. Bedford JM, Calvin HL 1974. The occurrence and possible functional significance of –S-S- crosslinks in sperm head, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool*; 88:137-155.
10. Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beeb SJ. Cell surface binding sites for progesterone mediated calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* 1991; 266:18655–18659.
11. Boyazoglu J, Hatziminaoglou I y Morand-Fehr P. 2005. The role of the goat in society past, present and perspectives for the future. *Small Rumin. Res.* 60, 13-23.
12. Chen JS, Doncel GF, Alvarez C, Acosta AA. Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zona pellucida binding. *J Androl* 1995;16:55-63.
13. Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 1998; 59:733–742.

14. Curry MR, 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5 46-52.
15. Darszon A., Lopez-Martinez P., Acevedo, JJ, Hernandez-Cruz A., Trevino CL, 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 40, 241–252.
16. Darszón A. et al 2006. Sperm channel diversity and functional multicity. *Reproduction* 131, 977-88.
17. De Jonge CJ, Barrat CL, Radwanska E and Cooke ID. 1993 The acrosome reaction- inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 1993; 14: 359-365.
18. Devendra C y Burns M. 1983. *Goat Production in the Tropics*. Commonwealth Agricultural Bureaux. United Kingdom. pp 55-63.
19. Fabre-Nys C. 2000. Le comportement sexuel des caprins: controle hormonal et facteurs sociaux . *INRA Production animal*. pp. 11-23.
20. Fabre-Nys C y Gelez H. 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic rumanants. *Hormones and Behavior* 52, 18-25.
21. Fabbri R, Porcu E, Lenzi A, Gandini L, Maersella T and Flamigni C. 1998 Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1998;69:112-117.
22. FAOSTAT http://www.fao.org/index_es.htm 2012.
23. Flesh FM y Gadella BM, 2000; Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469 197-235.
24. Fournier-Delpech S y Thibault C. 1993 Acquisition of sperm fertilizing ability. Paris Ellipses. 257-278.
25. Florman HM y Frits NL, 1998. The regulation of acrosomal exocytosis. I. sperm capacitation is required for in the induction of the acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev. Biol* 128:453-463.
26. Frits M, Flechs FM y Barend M. 2000. Dynamics of the mammals sperm plasma membrana in the process of fertilizacion. *Biochemica et Biophysica Acta* 1469, 197-235.
27. Foote RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim. Sci.* 80, 1-10.

28. Fowler D. 1984. Reproductive behavior of rams. En *Reproduction in sheep*. Academy of science. Sydney, Australia.
29. Foote RH. 2003 Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.* 75, 119-139.
30. Galina C, Saltier H y Valencia J. 1990. *Reproducción en animales domésticos*. Editorial Limusa. México.
31. Gadella, BM. Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127:2407-20.
32. Giojalas LC 1998. Correlation between response to progesterone and other functional parameters in human spermatozoa. *Fertil Steril*:69:107-111.
33. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987;24:42–52.
34. Hafez ESE y Hafez B. 2000. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7ª ed. México, D. F.
35. Hahn J, Stouffer JR, Foote RH. 1999. Ultrasonographic and other testicular characteristics of Holstein Bulls revisited. *J. Reprod. Dev.* 45, 405-410.
36. Holt WM. 2009. Is Semen Analysis useful to predict the odds that the sperm will Meet the egg? *Reprod Dom Anim* 44 (Suppl. 3) 31-38.
37. Hunter RFH. 1982. *Reproduction of farm animals*. London: Longman.
38. Iñiguez L. 2004. Goats in resource-poor systems in the dry environments of West India. Central Asia and the inter-Andean valleys. *Small Rumin. Res.* 51, 137-144.
39. Juárez Mosqueda ML y Valencia J 2009. Transporte de gametos y fertilización. De Galina C y Valencia J “Reproducción de los animales domésticos.” 3ra edición L
40. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S, 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by Chlorotetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci.* 73,197-209.
41. Krausz *et al.*, 1995 Krausz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E. Effect of platelet activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod* 1994; 9:471–476.

42. Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K and Miyasaki S 2003. Involvement of rho Family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by Clostridium difficile toxin B. developmental Biology, 260:522-535
43. Laing J y Brinley W. 1991. Fertilidad e infertilidad en la práctica Veterinaria. Editorial Interamericana. México.
44. Llanos MN y Anabalón MC. 1996. Studies related to progesterone induced hamster sperm acrosome reaction. Mol. Reprod. Dev. 45, 313-319.
45. Martínez MR y Carvajal FJ, 2010. Inducción de la capacitación espermática y reacción acrosomal en espermatozoides de machos cabríos jóvenes para evaluar su capacidad andrológica. Tesis de licenciatura. UNAM, México 2010.
46. McDonald. 1991. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Editorial Interamericana. México.
47. Meizel S y Turner KO. 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. Mol. Cell. Endocrinol. 11, R1-R5.
48. Meizel S, Pillai M, Diaz-Perez E y Thomas P. 1990. Initiation of human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: Bavister BD, Cummins JM y Roldan ERS. (Eds.), Fertilization in Mammals. Serona symposia, Norwell MA.
49. Mellado M. 1997. La cabra criolla en América Latina. Vet. Mex. 28, 333-343.
50. Melendrez C, Meizel S y Berger R. 1994. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction. Mol. Reprod. Dev. 39, 433-438.
51. Mendoza NK. 2010. Evaluación de la calidad seminal y conducta a la monta de machos caprinos jóvenes. Tesis de especialidad en producción de ovinos y caprinos. FES-C, UNAM. México.
52. Meyers SA, Overstreet JW, Liu IKM y Drobniz EZ. 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparisons of progesterone induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. J. Androl. 16, 47-54.
53. Nwakalor L y Enzinma C. 1989. Libido, serving capacity and breeding soundness in muturuan dama beef bulls. Theriogenology. 32, 901-911.
54. Oltenacu PA, Milligan RA, Rounsaville TR y Foote RH. 1980. Modeling reproduction in a herd of dairy cattle. Agric. Syst. 5, 193-205.

55. Osman RA, Andria ML, Jones AD y Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 828-833.
56. Ott RS. 1980. Breeding techniques for dairy goats. *Int. Goat Sheep Res.* 1, 1-5.
57. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 2000;92:255-266.
58. Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF and Topter-petersen E, 2004. Requiriments for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Society for Reproduction and fertility* ISSN 1470- 1626.
59. Pomer AC, Rutllant J, Meyers SA., 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58,1373-1384.
60. Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM, Gadella BM. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:120–128.
61. Reyes A y Chavarria ME, 1987. Rgulacion bioquímica de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero. *Gac. Med. Mexico* 123:261-267.
62. Robitaille G, Sullivan R and Bleau G. 1991 Identification of epididymal proteins associated with hamsters sperm. *J Exp Zool* 258: 69-74.
63. Rodríguez–Martínez *H, Barth AD,* 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64,39-54.
64. SAGARPA 2011 <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
65. Sabeur K, Edwards DP, Meizel S. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1996; 54:993–1001.
66. Silva PFN y Gadella BM, 2006. Detection of damage in mammals sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.
67. Sirivaidyapong S, Bevers MM, Colenbrander B. 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localised progesterone receptor. *J Androl* 20:537±544.
68. Somanath PR. Suraj K, Gandhi KK, 2000. Caprin sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Ruminant Research* 37: 279-286.

69. Sukardi S, Curry MR, Watson PF., 1997. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science* 46, 89-96.
70. Tash, JS 1989. Protein phosphorylation; the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell motil Cytoskel.* 14: 332-339.
71. Thurner RM, 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 18. 25-38.
72. Visconti PE y Kopf GS. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction* 59, 1 – 6.
73. Wassarman PM, L. Jovine ES. 2001 *Litscher Nat. Cell Biol.* 3 E59–64.
74. Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *En the Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press.