



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

Respuesta de concentración de calcio intracelular y  
motilidad en un modelo *in vitro* de competencia  
espermática en bovinos.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS

P R E S E N T A:

YOLOTZIN NALLELY PÉREZ QUIJANO

TUTOR: Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo.

COMITÉ TUTORAL: Dr. Carlos Gerardo García Tovar  
Dr. Gerardo Perera Marín

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2012



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.

## **Dedicatorias**

**A mis padres por seguir conmigo en cada paso que doy en mi camino, por forjarme como persona, por alentarme en todo momento, por todo el amor y la dedicación que han puesto en mi, simplemente por ser los mejores padres del mundo!**

**A mis abuelitos por inspirarme y por ser mi motivo para sacar adelante cada meta lo mejor que pueda, donde quiera que estén, siempre los llevo en mi corazón.**

**A mi hermana Itzel por su apoyo y su compañía y por traer al mundo a mi principito Emiliano que con su sonrisa es capaz de borrar todas las preocupaciones y cansancios del día, por inspirarme a ser una mejor persona y ser mi motor para lograr mis sueños.**

**A Víctor por darme ánimos, por creer en mí, por comprenderme, escucharme y estar a mi lado, por amarme, acompañarme y por los sueños que realizaremos juntos.**

**A mis hermanas de vida Isabel y Tere por formar parte de mi vida, por impulsarme a lograr mis metas, por sus consejos, su amistad incondicional y por nunca abandonarme, por hacerme partícipe de los momentos más especiales de sus vidas y por qué no? También de los tristes, gracias por estar siempre que las necesito!**

**A Ligia por ser una gran amiga, por estar siempre ahí, por los momentos especiales y por ayudarme a ver las cosas más claras cuando mas frustrante me pareció este camino, definitivamente no hay nadie que me entendiera mejor que tú en esta etapa.**

**A Saraí porque siempre nos tenemos presentes la una a la otra y se que aún estando lejos, ella esta conmigo dándome ánimos y una amistad sincera.**

**A Bety por ser además de mi madre académica, una gran amiga a quien quiero y admiro mucho.**

**A Gaby, Estela, Daniel, Miguel y Fátima por su amistad y lo que representan para mi, por enseñarme tantas cosas y porque deseo que sigan siendo parte de mi vida.**

## **Agradecimientos**

**A la UNAM por ser la institución donde me he formado académicamente y por todos los conocimientos y experiencias que he adquirido dentro de ella.**

**A CONACyT por el apoyo económico que permitió que este trabajo llegara a su fin.**

**Al Dr. Francisco J. Jiménez Trejo por continuar conmigo hasta el final del camino y creer en mi.**

**Al Dr. Gerardo Perera Marín y al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por su comprensión, apoyo y aportaciones hechas a este trabajo de tesis.**

**Al Dr. Salvador Romo García por todo el apoyo, material proporcionado, así como contactos que al final lograron que este trabajo pudiera realizarse después de tantos obstáculos que retrasaban nuestro avance.**

**A los miembros de mi jurado por las aportaciones que ayudaron a mejorar el escrito.**

**Al Dr. Demetrio Ambriz de la UAM-Iztapalapa por su disposición a apoyar esta investigación y por estar al pendiente de los avances que se iban teniendo.**

**A Minitube, Querétaro por el equipo prestado, por su tiempo, disposición y apoyo en el uso del sistema CASA que permitió llegar a los resultados que en este trabajo se muestran.**

**A la empresa RECA por las pajillas donadas de semen heteroespermático que permitieron obtener datos aún mas interesantes y ahondar un poco mas en las consecuencias de mezclar semen bovino previamente a la congelación.**

**A mis compañeros que aportaron algo por mínimo que fuera a este proyecto que hoy logra llegar a su fin, entre ellos un especial agradecimiento a mi amigo Aarón de la Concha por su tiempo y por su gran ayuda.**

## Resumen

Mediante Inseminación Artificial el porcentaje máximo de preñez en ganado bovino es del 60% en México. El éxito de la IA depende entre otras cosas, de la calidad y cantidad de espermatozoides depositados en la hembra. Actualmente hay países que están comercializando pajillas heteroespermáticas, logrando alcanzar aproximadamente un 9% más de preñez, lo cual puede estar relacionado al fenómeno de competencia espermática que de manera natural se presenta en bovinos. Esta competencia esta regulada entre otras cosas por el calcio, ya que este ion genera una respuesta inmediata al presentarse cambios en el medio externo, generando motilidad. Los objetivos del estudio fueron: 1) Evaluar si existe un aumento en la concentración de calcio intracelular cuando se confrontaban espermatozoides de dos toros distintos, 2) Evaluar si existe un aumento en la motilidad espermática debido al influjo de calcio durante la competencia espermática *in vitro* y 3) Determinar si el semen descongelado presentaba parámetros de hipermotilidad. Los resultados indicaron, que en las condiciones de este estudio, no se presentó un aumento de la concentración de calcio intracelular, no se observaron cambios en la motilidad espermática cuando se confrontaron espermatozoides de toros de fertilidad similar y/o conocida, y finalmente no se presentó hipermotilidad en muestras de semen individual o mezclado; esto podría ser debido al uso de semen congelado, así como a que el semen utilizado fue de toros de fertilidad similar. Se sugiere hacer más estudios utilizando semen fresco y de toros con distinta fertilidad con el propósito de evaluar si la congelación o la calidad del semen de los toros utilizados en este experimento intervinieron en los resultados. De igual manera debe considerarse que una buena motilidad no refleja necesariamente una fertilización exitosa ya que la selección por parte de las hembras juega un papel importante en la competencia espermática.

Palabras clave: bovino, competencia espermática, motilidad, calcio, heteroespermático.

## **Abstract**

By Artificial Insemination, the maximum rate of pregnancy in cattle is 60% in Mexico. The success of AI depends, among other things, the quality and quantity of sperm deposited in the female. Currently there are countries that are marketing frozen heterospermic straws, managing to reach approximately 9% of pregnancy, which may be related to the phenomenon of sperm competition that naturally occurs in cattle. This competition is governed among other things, by calcium, since this ion generates an immediate response to changes in the external environment, generating motility. The study objectives were: 1) To assess whether there is an increase in intracellular calcium concentration when spermatozoa from two different bulls confronting, 2) assess if there is an increase in sperm motility due to calcium influx during sperm competition *in vitro* and 3) Determine whether thawed semen had hypermotility parameters. The results indicate that under the conditions of this study there is not an increase in intracellular calcium concentration or motility when we confront sperm from two bulls of similar and known fertility, and neither the individual semen samples nor mixed semen showed parameters of hypermotility; it may be due to the use of frozen semen, as well as the similar characteristics of the bull semen used. We suggested further studies are made using fresh semen and bulls with different fertility to evaluate whether freezing or semen quality of bulls used in this experiment involved that the results were not as expected in this study. Similarly, should be considered that a good motility does not necessarily means successful fertilization, and selection within the female reproductive tract plays an important role in sperm competition.

Key words: bovine, sperm competition, motility, calcium, heterospermic.

## Contenido

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Antecedentes</b>	
2.1	Calcio intraespermático	4
2.2	Interacción Motilidad-Calcio	5
2.3	Motilidad	8
2.4	Hipermotilidad	11
2.5	Cuantificación de calcio intraespermático con FURA	13
2.6	El Percoll para la separación de espermatozoides móviles para uso experimental	13
2.7	Uso de CASA (Computer assisted sperm analysis)	13
2.8	Competencia espermática	17
2.8.1	Nivel morfológico	18
2.8.2	Nivel conductual	18
2.8.3	Nivel fisiológico	18
2.8.4	Experimentos de motilidad asociados a competencia espermática	19
<b>3.</b>	<b>Justificación</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>24</b>
5.1	Objetivo general	24
5.2	Objetivos particulares	24
<b>6.</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>25</b>
6.1	Muestras biológicas	25
6.1.1	Pajillas	25
6.1.2	Selección de muestras de semen	25
6.1.3	Características de las pajillas donadas	25
6.2	Concentración de calcio intraespermático.	26
6.2.1	Medio de mantenimiento	26
6.2.2	Preparación del gradiente de Percoll	26
6.2.3	Descongelación de las pajillas	27
6.2.4	Preparación de las muestras	27
6.2.4.1	Separación de espermatozoides viables	27
6.2.4.2	Incorporación del fluoróforo	28

6.2.4.3. Calibración y funcionamiento del espectrofluorómetro.	29
6.2.4.4. Lecturas de fluorescencia	29
6.3 Evaluación de parámetros de motilidad.	30
6.3.1 Análisis de pajillas	31
6.3.2 Hipermotilidad	31
6.3.3 Análisis estadístico	32
7. Resultados	33
7.1 Concentración de calcio intraespermático	33
7.2 Evaluación de los parámetros de motilidad	37
7.2.1 Motilidad subjetiva	37
7.2.2 Motilidad evaluada por CASA	39
7.2.3 Hipermotilidad	43
8. Discusión	45
8.1 Concentración de calcio intraespermático	45
8.2 Evaluación de los parámetros de motilidad	47
9. Conclusiones	52
10. Bibliografía	53

## Lista de cuadros

Cuadro 7.1. Datos de motilidad espermática y vigor de la motilidad de los espermatozoides de manera individual y al enfrentarse en competencia espermática <i>in vitro</i> mediante observación a microscopio de campo claro por parte de dos observadores.	38
Cuadro 7.2. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen de baja concentración (hasta 10 millones/ml).	40
Cuadro 7.3. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen de concentración estándar (de 11 a 20 millones/ml).	41
Cuadro 7.4. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen congelado donados por la empresa RECA, S.A. de C.V.	42
Cuadro 7.5. Datos que influyen en la hipermotilidad del espermatozoide.	44

## Lista de figuras

Figura 2.1. Modelo de los eventos moleculares que inducen la activación e hiperactivación del flagelo.	6
Figura 2.2.a) Ultraestructura del axonema por microscopía de transmisión y b) Esquema del axonema con cada una de las estructuras que lo integran.	7
Figura 2.3. Esquema en el que se muestra el deslizamiento del microtúbulo bajo la acción de los brazos de dineína.	10
Figura 2.4. La dirección del movimiento del flagelo espermático cambia con un aumento de $Ca^{2+}$ intraespermático.	12
Figura 2.5. Esquema que representa los parámetros medidos por un equipo CASA en un desplazamiento desde el punto A al punto B.	16
Figura 7.1. Microfotografía de espermatozoides de bovino cargado con Fura 2-AM mediante microscopio epifluorescente a 40x.	34
Figura 7.2. Registros de concentración intracelular de Calcio.	35

## 1. Introducción

La Inseminación Artificial (IA) es una herramienta de gran utilidad en los programas de mejoramiento animal (Baracaldo *et al.*, 2007), aunque en nuestro país, así como en otros, el porcentaje máximo de preñez en ganado bovino es del 60% (Breuel *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1996; Brogliatti, 2003; Overton, 2008; Aceves *et al.*, 2008).

El éxito de las IA y los procesos de fertilización *in vitro* tienen enormes alcances tanto económicos como biológicos, por ejemplo, menor propagación de enfermedades, mayor posibilidad de cruce entre organismos separados geográficamente, utilización de semen de machos ya fallecidos pero con un gran valor genético, reducción del índice de distocia, disminución de accidentes durante la monta, aumentar el número de vacas inseminadas con un mismo eyaculado, mayor productividad, entre otros (Valergakis *et al.*, 2007); y dependen entre otras cosas, de la calidad y cantidad de espermatozoides depositados en el tracto reproductivo de la hembra.

La evaluación de los espermatozoides, requiere del análisis de parámetros como datos de viabilidad, motilidad espermática, morfología celular y grado de integridad, especialmente del acrosoma.

A este respecto, la motilidad espermática, considerada como uno de los factores principales de calidad a evaluar, comprende el estudio de la motilidad progresiva, la motilidad local y la ausencia de la misma; factores que permiten a los espermatozoides un transporte más eficiente dentro del tracto femenino para lograr la capacidad de penetrar al ovocito para ser fecundado (Canorio, 2008).

En este sentido, lo que le ocurre a los espermatozoides dentro del tracto reproductor de la hembra (capacitación, hipermotilidad, reacción acrosomal y formación del nuevo dominio de fusión) (Gilbert, 2003; Olivera *et al.*, 2006) después de la IA es muy importante para la fertilización, ya que aunque solo uno penetra el ovocito, es necesario que hayan muchos espermatozoides de alta calidad dentro del tracto genital de la vaca (Saacke, 2002).

Es por lo anterior que toma importancia la manipulación del semen para llevar a cabo la técnica de IA, proceso que se realiza utilizando semen fresco y/o congelado; es importante destacar que durante la congelación y almacenamiento del semen en nitrógeno líquido, los espermatozoides sufren cambios como son la hiperactivación, decremento de calmodulina, cambios de pH intracelular, remoción de proteínas de superficie, pérdida del colesterol, cambios del metabolismo oxidativo, entre otros (Stornelli *et al.*, 2005); a la vez, este proceso de congelación provoca daños a nivel de membrana plasmática, también induce una reducción en la motilidad, en la actividad enzimática y viabilidad, que a las bajas temperaturas de congelación (-196°C) disminuyen la oportunidad de ser reparados (Beatty *et al.*, 1976; Cormier *et al.*, 1997). De hecho, Cormier *et al.* (1997) mencionan que comparado con el semen fresco, se requieren hasta ocho veces más espermatozoides congelados para obtener tasas de fertilización semejantes.

En países como Brasil, están congelando dosis espermáticas de dos o tres toros combinados, lo que les ha generado un aumento en la fertilidad, debido posiblemente a que los espermatozoides aprovechan las variaciones entre estados de capacitación de distintos toros para ampliar la ventana de fertilización (<http://www.genusbreeding.co.uk>) aunque no hay ninguna investigación del motivo de esta respuesta, sin embargo en este trabajo se ha considerado la posibilidad de que sea debido al fenómeno de competencia espermática.

El término competencia espermática se define como la competencia entre los espermatozoides de dos o más machos dentro del tracto genital femenino para fertilizar un conjunto de óvulos de una hembra en período fértil (Parker, 1998). Esta competencia espermática es actualmente reconocida como una fuerza evolutiva (Baker, 1996) y ocurre cuando hay inseminación heteroespermática, es decir, cuando múltiples apareamientos permiten la presencia simultánea de espermatozoides viables de dos o más machos dentro de los conductos genitales femeninos. Según Baker (1996), sólo un bajo porcentaje de los espermatozoides, posiblemente alrededor del 1% está capacitado para la fertilización; el resto son espermatozoides de bloqueo o de ataque (kamikase), cuyas funciones son prevenir que los espermatozoides de otros machos fecunden los óvulos.

No obstante no se conocen los procesos fisiológicos y bioquímicos de la competencia espermática en ninguna especie de mamífero y mucho menos en trabajos con semen congelado, sin embargo se sabe que uno de los primeros eventos que ocurren en respuesta al ambiente externo de la célula es la activación de canales de calcio presentes en la membrana plasmática del espermatozoide (Darszon *et al.*, 2006), por lo que es probable que durante la interacción celular al confrontar y congelar espermatozoides de diferentes toros, se activen una o varias vías de señalización en las que el calcio interviene, provocando un efecto en la motilidad, ya que este catión es uno de los factores principales que intervienen en la motilidad espermática y el batido del flagelo (Darszon, 2007), con lo que se esperaría un aumento de la fertilidad de las hembras inseminadas con estas pajillas heteroespermáticas, fenómeno que fisiológicamente aún no está descrito.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación del influjo de calcio con el fenómeno de competencia espermática, utilizando como modelo, espermatozoides de toro, en particular *Bos taurus*; además, se pretendió evaluar el aumento en la motilidad de diferentes poblaciones de espermatozoides, con la finalidad de realizar investigación científica básica que justifique la creación de pajillas congeladas de semen, que combinado con espermatozoides de dos o más individuos puedan incrementar la fertilidad en especies con fines de producción.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Calcio intraespermático

La regulación de la actividad celular en respuesta a las señales de otras células o al ambiente externo ocurre a distintos niveles a largo o corto plazo, un ejemplo de estos últimos mecanismos se realiza a través de cambios en la concentración intracelular de segundos mensajeros o iones.

En el espermatozoide que carece de retículo endoplásmico y tiene muy condensado el núcleo, la regulación por expresión genética es muy limitada y los mecanismos post-traduccionales deben por lo tanto, controlar toda la actividad celular, en este sentido, los cationes y los aniones juegan un papel importante en la modulación de la motilidad espermática, el mayor efecto se atribuye a cationes tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ . Las diferencias de concentración extra e intracelular inducen el tránsito de estos cationes, provocando cambios en la composición iónica intracelular y en el potencial funcional, así como en la motilidad del espermatozoide (Olivera *et al.*, 2006).

La regulación por calcio es esencial para una gran cantidad de actividades importantes de la función del espermatozoide como lo son: hiperactivación, quimiotaxis y reacción acrosomal (Costello *et al.*, 2009; Neri *et al.*, 2009).

La señalización a través del calcio se da permitiendo que el calcio entre a la célula y a través de organelos intracelulares donde la concentración de calcio es hasta 4 veces mayor que en el citoplasma; este inicio de la señalización requiere que los canales permeables al calcio estén abiertos, permitiendo que los iones fluyan en un gradiente electroquímico (Costello *et al.*, 2009).

En espermatozoides de ratón se han identificado canales de calcio dependientes de voltaje y Neri *et al.* (2009), proponen la presencia de estos mismos canales en el espermatozoide humano; por otro lado, existen canales CatSper 1 a 4 (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2007; Suarez, 2008) y ATPasas de calcio (Cooner *et al.*, 2007) que están ubicados en la membrana plasmática de la pieza principal del flagelo y que

están íntimamente asociados a la motilidad, ingresando calcio (Olivera *et al.*, 2006). La entrada de calcio dentro del flagelo se da en dos fases: fase lenta y fase rápida, pero solo el influjo inicial rápido afecta la trayectoria del espermatozoide (Tuma, 2005).

## 2.2 Interacción Motilidad-Calcio

La motilidad del espermatozoide se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por interacción con ligandos específicos y por glucosa, presentes en el líquido seminal y en el tracto reproductivo femenino; estos cambios inducen señales citosólicas flagelares, a través de la fosforilación de proteínas, de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de vías dependientes de nucleótidos cíclicos como el GMPc y AMPc (Gagnon y De Lamirande, 2006).

Los ligandos específicos más conocidos son: la progesterona (Lishko *et al.*, 2011) y el esteroide sulfatado SAAF (Sperm Activating and Attracting Factor) que inducen el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al espermatozoide, el cual es un mecanismo fundamental y común en todos los animales (Yoshida *et al.*, 2008) y de esta manera inducen múltiples vías fisiológicas dependientes de calcio esenciales para una fertilización exitosa (ver Figura 2.1.).

El calcio proviene de varias fuentes: reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  (RIC) mediada por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), del  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente de la mitocondria o de la teca perinuclear o del  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa gracias a sistemas antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Olivera *et al.*, 2006). Este calcio específicamente participa en la activación e hiperactivación de la motilidad del flagelo, cuyo eje principal es el axonema (Figura 2.2.), el cual está compuesto por 9 dobletes de microtúbulos periféricos y 2 microtúbulos centrales que corren a lo largo de todo el flagelo; su proteína motora es la dineína, cuyos brazos se proyectan desde el microtúbulo A hacia el microtúbulo B del doblete adyacente y son los principales participantes en el deslizamiento activo de los microtúbulos mediante la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la proteína calaxina localizada en el axonema del flagelo espermático (Mizuno *et al.*, 2009). Estos dobletes están unidos a su vez a otros mediante puentes de nexina y espinas radiales de la vaina que rodean los dos microtúbulos centrales del axonema.

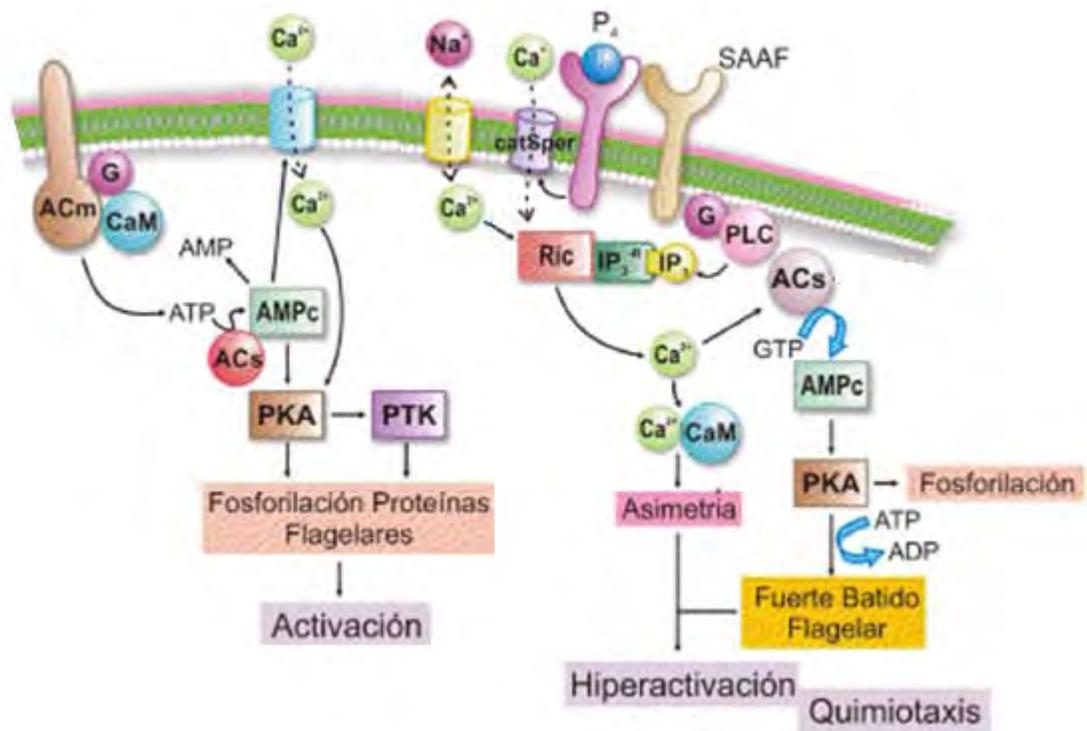


Figura 2.1. Modelo de los eventos moleculares que inducen la activación e hiperactivación del flagelo (Modificada de Olivera *et al.*, 2006). El calcio puede entrar a través de distintos canales aumentando el AMPc y activando de esta forma a la PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc) que está anclada a microtúbulos cerca del brazo de dineína externo, esto provoca la fosforilación de tirosinas y polipéptidos de la cadena ligera de ese brazo para activar la motilidad.

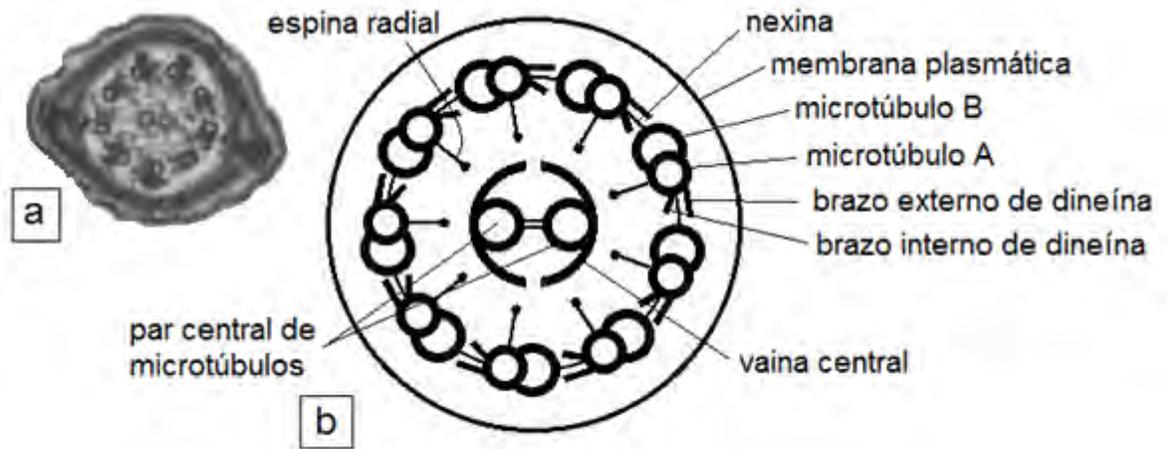


Figura 2.2. a) Ultraestructura del axonema por microscopía de transmisión. (Imagen tomada de Miki *et. al*, 2004), b) Esquema del axonema con cada una de las estructuras que lo integran ([www.sciencerevolution.net](http://www.sciencerevolution.net)).

### 2.3 Motilidad

La dineína es la responsable de la conversión de la energía química de la hidrólisis del ATP en energía mecánica para la motilidad, alterando su conformación en respuesta al calcio a través del brazo externo de dineína (Sakato *et al.*, 2007; Tanner *et al.*, 2008).

Los dos brazos de dineína tienen diferentes funciones. Mientras que los brazos de dineína externos determinan la velocidad máxima del deslizamiento del doblete de microtúbulos externos, los brazos internos afectan la forma de la ola flagelar, regulando la simetría del batido mediante el incremento de calcio intraflagelar (King y Patel-King, 1995; Mizuno *et al.*, 2009) o proveyéndolo de la fuerza adicional necesaria para mantener altas velocidades. El complejo regulador de dineína (7 polipéptidos) está estrechamente ligada a la red de microtúbulos y podría funcionar como andamio para enzimas que regulan y modifican la actividad de la dineína o como un sensor de la tensión del axonema para proveer el mecanismo de retroalimentación de los brazos de dineína (Figura 2.3.).

Las espinas radiales son estructuras en forma de T que señalan hacia el par central de microtúbulos y están adyacentes a los brazos internos de dineína y anclados a los microtúbulos A. Debido a su localización, las espinas radiales proveen un enlace estructural entre el par central y los brazos de dineína.

El par central y las espinas radiales no son esenciales para la motilidad pero la interacción de estas estructuras pudiera actuar como una señal de transducción química y mecánica para controlar el tamaño y la forma de la curva del flagelo, y para modificar la motilidad en respuesta a señales específicas. El complejo de espinas radiales y par central regula la velocidad de deslizamiento de los microtúbulos dirigidos por la dineína y coordina la actividad de los brazos de dineína internos y externos a niveles fisiológicos de ATP. Las espinas radiales afectan parámetros específicos de motilidad como el movimiento espacial y el batido flagelar. Los microtúbulos están constituidos por tubulina (heterodímero  $\alpha$  y  $\beta$ ), mediante asociaciones laterales de 13 (microtúbulo A) y 11 (microtúbulo B) protofilamentos (asociaciones longitudinales de tubulina). La tubulina puede cambiar su configuración incorporando grupos acetilo, ácidos fosfóricos, entre otros, lo cual es importante para la motilidad flagelar. El otro doblete externo de

microtúbulos está unido por puentes de nexina por asociación con los complejos reguladores de dineína. Una de las proteínas asociadas a la nexina corresponde a la subunidad regulatoria p72 nucleosidodifosfatocinasa de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El axonema espermático está rodeado de fibras densas y vainas fibrosas, cada uno de los dobletes de microtúbulos está asociado con una fibra densa, compuesta por varias proteínas semejantes a filamentos intermedios ricas en cisteína, serina y prolina con un alto grado de cruzamiento por puentes disulfuro dependientes de zinc. Las fibras densas externas pueden estar involucradas en el mantenimiento de la estructura elástica pasiva del flagelo, pero el nivel alto y variable de fosfoserinas sugiere algún rol indeterminado en la regulación de la motilidad flagelar (Gagnon y De Lamirande, 2006).

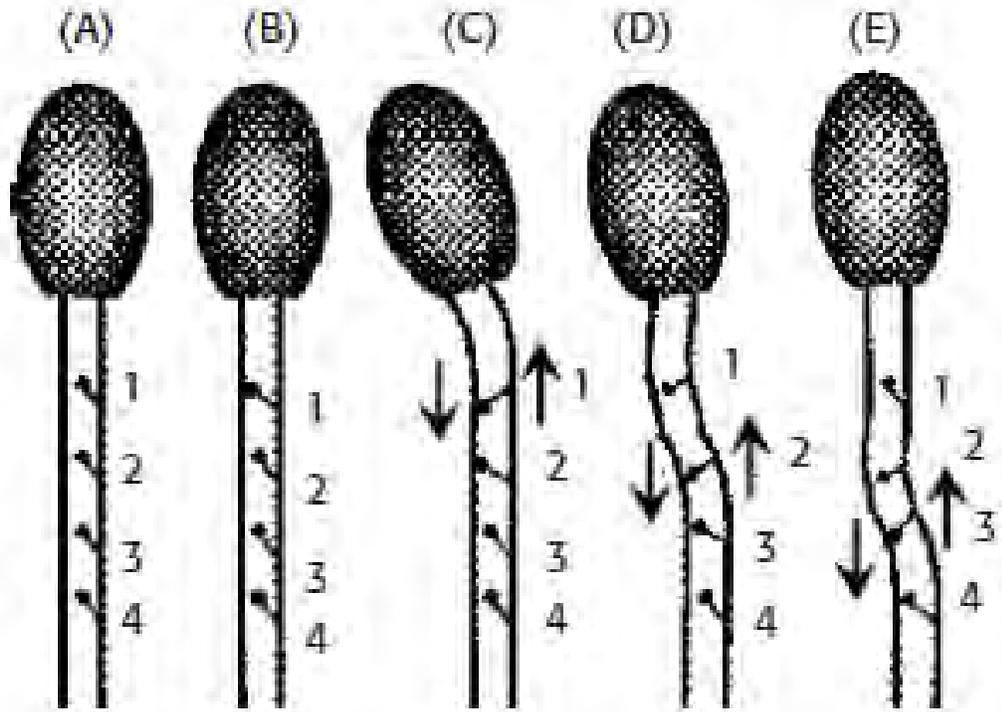


Figura 2.3. Esquema en el que se muestra el deslizamiento del microtúbulo bajo la acción de los brazos de dineína. Únicamente están dibujados 2 dobletes de microtúbulos externos y cada brazo numerado es para un par de brazos internos y externos. A) Si los brazos de dineína están inactivos no hay batido flagelar. B) cuando el primer brazo de dineína se une al microtúbulo adyacente C) genera un movimiento hacia abajo, la fuerza de deslizamiento se traduce en una curva en el axonema y D) el segundo brazo de dineína induce al doblete de microtúbulos adyacentes. El batido flagelar entonces se propaga cuando el primer brazo de dineína se relaja, el segundo genera el movimiento hacia abajo y E) el tercero entra en acción. Una secuencia similar se repite continuamente y ocurre al mismo tiempo en los nueve dobletes de microtúbulos de manera asincrónica pero coordinada a todo lo largo del flagelo y alrededor de la circunferencia que le permite nadar en tres dimensiones ([www.bioscience.org](http://www.bioscience.org))

## 2.4 Hipermotilidad

La motilidad tiene dos vertientes: la motilidad normal activada y la hipermotilidad, esta última se caracteriza porque el batido flagelar comienza a ser más amplio y asimétrico (Ho *et al.*, 2002; Suarez, 2008) (Figura 2.4.); y está dada por los componentes quimiotácticos que se encuentran en el fluido folicular, entre los que destaca la progesterona (Villanueva *et al.*, 2005), siendo esta quimioatracción dependiente del influjo rápido de calcio a través principalmente de los canales CatSper ((Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2003; Tuma, 2005; Wood *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2007; Suarez, 2008).

Quill *et al.* (2003) demostraron que los espermatozoides no son capaces de hiperactivarse cuando se bloquean los canales CatSper (Ho *et al.*, 2002), sin embargo también se ha provocado el rompimiento de las membranas celulares de los espermatozoides provocando la inmovilidad y activándola posteriormente en los flagelos en presencia de un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  (Suarez, 2008).

El hecho de que el espermatozoide comience a ser hiper móvil es sumamente importante para la fertilización; de hecho, se han sugerido 5 distintas razones para la hipermotilidad: prevenir que queden atrapados entre las criptas del oviducto, aumentar la probabilidad de tener contacto con el ovocito, mantenimiento del microambiente, apoyo en la penetración del cúmulo ovífero y apoyo en la penetración de la zona pelúcida y por lo tanto, la membrana del ovocito (Mortimer, 2000).

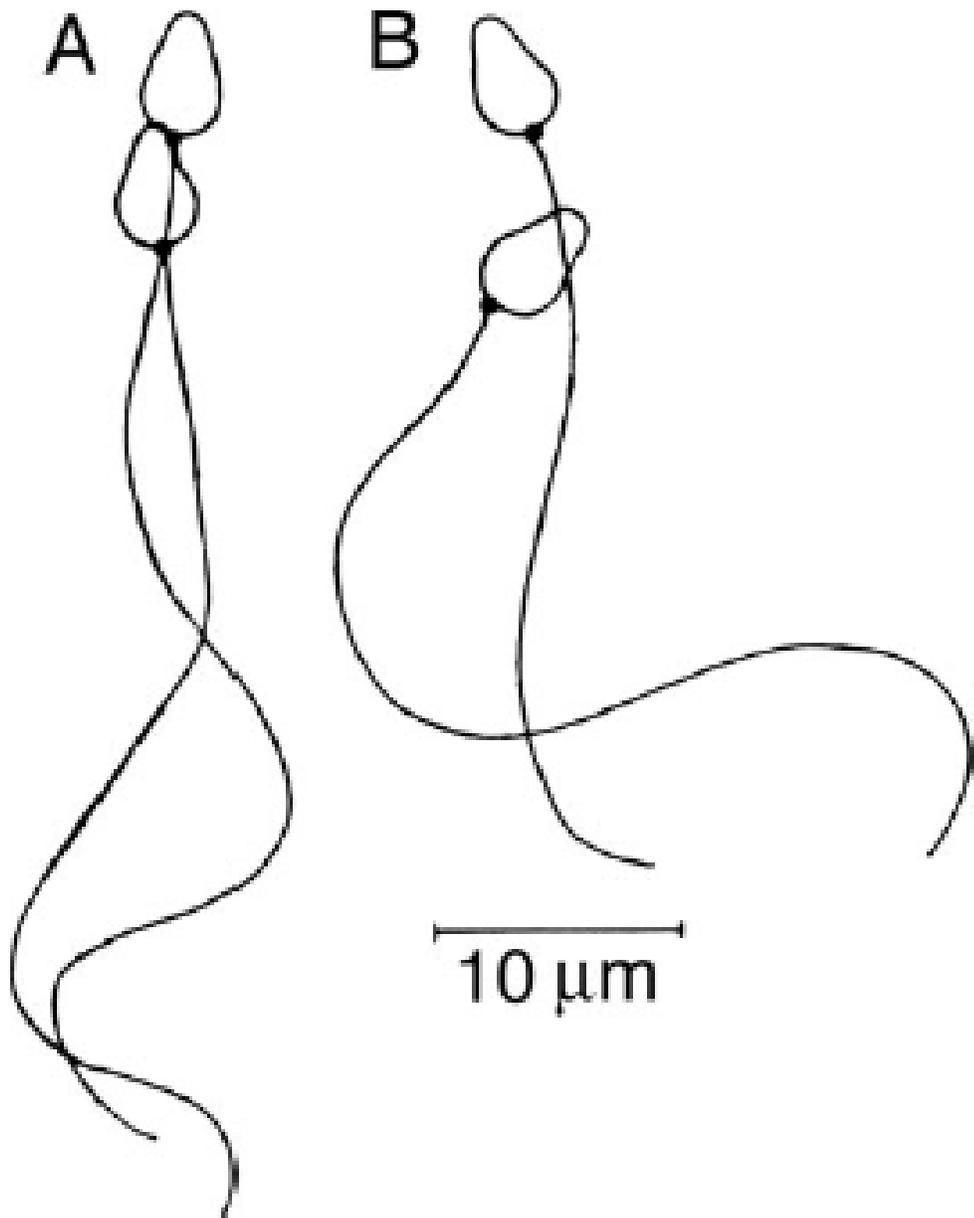


Figura 2.4. La dirección del movimiento del flagelo espermático cambia con un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intraespermático. A) Patrón de flexión flagelar normal y B) Patrón de flexión flagelar hipermotil (Tomado de Suarez, 2008)

## **2.5 Cuantificación de calcio intraespermático con FURA**

Por otro lado, la espectrofluorometría es un método que se ha utilizado para cuantificar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células; esta técnica se basa en utilizar marcadores fluorescentes, como el fura 2-AM, que atraviesan las membranas, una vez ahí el grupo acetoximetil se remueve por medio de esterasas celulares y cambia su conformación a la forma de Fura-2 (Gillis y Gaill, 1994), esta conformación molecular, permite su unión al calcio por medio de 4 grupos carboxil, permitiendo la cuantificación de este ion dentro de la célula. Este colorante requiere de la excitación y de la emisión de dos longitudes de onda distintas (340 y 380 nm) que permiten que la metodología sea más específica y tiene mejor selectividad de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a otros cationes (www.bphys.uni-linz.ac.at; Grynkiewicz *et al.* 1985).

## **2.6 El Percoll para la separación de espermatozoides móviles para uso experimental**

Las técnicas de reproducción asistida utilizan espermatozoides de buena calidad, viabilidad y motilidad. Para el caso de los bovinos el semen se congela en pajillas que se mantienen en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , que al descongelarse permiten obtener mejores resultados experimentales si al centrifugar las muestras se utilizan gradientes de densidad discontinuos de Percoll. Estos se han probado en espermatozoides de humanos, bovinos y otras especies domésticas (Talevi y Gualtieri, 2001; Salazar, 2004; Ocaña *et al.*, 2009), mostrando que en bovinos se mejoran los índices de fecundación *in vitro* así como la división celular comparados con el método tradicional de lavado. El Percoll ayuda a la separación del 90% de los espermatozoides móviles, a eliminar residuos tóxicos de los criopreservantes y de espermatozoides muertos y obtener un alto porcentaje de espermatozoides con morfología normal y acrosomas íntegros (Ocaña *et al.*, 2009).

## **2.7 Uso de CASA (Computer assisted sperm analysis)**

Los sistemas CASA son una herramienta para evaluar la motilidad y parámetros cinemáticos de los espermatozoides de manera objetiva en un gran número de muestras, esta herramienta permite eliminar la subjetividad que proporcionan los métodos de

microscopía y observación, siempre y cuando todas las mediciones se realicen con el mismo equipo, ajustes técnicos, material y recurso humano con experiencia (Contria *et al.*, 2010).

Estos sistemas también permiten que los resultados sean repetibles y puedan ser comparados con otros que hayan utilizado los mismos parámetros, o incluso se puede evaluar al mismo toro con diferencias de tiempo para ver si ha mejorado o no su motilidad.

El sistema CASA detecta las cabezas de los espermatozoides en una cantidad mínima de muestra (3-10  $\mu$ l) de acuerdo a los valores técnicos que se manejan por especie y los analiza como pixeles, toma imágenes sucesivas de espermatozoides en movimiento y se digitalizan para establecer las trayectorias y frecuencias de cambios de dirección llevadas a cabo por las cabezas de los espermatozoides. Esta información es analizada por un procesador matemático incluido en el sistema y proporciona los datos requeridos respecto a la motilidad (Mortimer, 2000; Quintero y Rubio, 2008).

Los parámetros de motilidad que evalúa el sistema CASA son (Figura 2.5.):

- ✓ VCL- Velocidad curvilínea ( $\mu$ m/seg): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
- ✓ VLR- Velocidad rectilínea ( $\mu$ m/seg): Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria.
- ✓ VAP- Velocidad media ( $\mu$ m/seg): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
- ✓ LIN- Índice de linearidad (%): Relación porcentual entre la VLR y VCL.
- ✓ STR- Índice de rectitud (%): Relación porcentual entre la VLR y VAP.
- ✓ WOB- Índice de oscilación (%): Relación porcentual entre VAP y VCL.
- ✓ ADL- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu$ m): Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- ✓ FBF- Frecuencia del batido del flagelo (Hz): Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo (Quintero y Rubio, 2008).

Contria *et al.* (2010) recomiendan hacer el análisis con una concentración espermática de  $20 \times 10^6$  millones/ml, realizaron una comparación del uso de distintos diluyentes sin encontrar diferencias en el análisis de motilidad, aunque recomiendan un medio con PBS (amortiguador de fosfatos salino con pH 7.4) para evaluar muestras después de la congelación.

Para realizar los análisis en sistemas CASA se utilizan portaobjetos comerciales o cámaras que presentan características específicas en sus dimensiones que permiten estandarizar el volumen y motilidad de los espermatozoides; Contria *et al.* (2010) y Lenz *et al.* (2011) compararon 2 distintas cámaras bajo las mismas condiciones, concluyendo que la cámara Makler es superior a la cámara Leja de 2 y 4 cámaras debido a que esta última detecta menor motilidad total y progresiva y mayor número de células estáticas para el uso de un sistema CASA Hamilton-Thorne IVOS 12.3 con semen bovino congelado. Una de las recomendaciones generales que aportan estos autores es que el análisis del semen debe ser realizado uno o dos minutos después de la descongelación y nunca deben excederse los 5 minutos (Contria *et al.*, 2010).

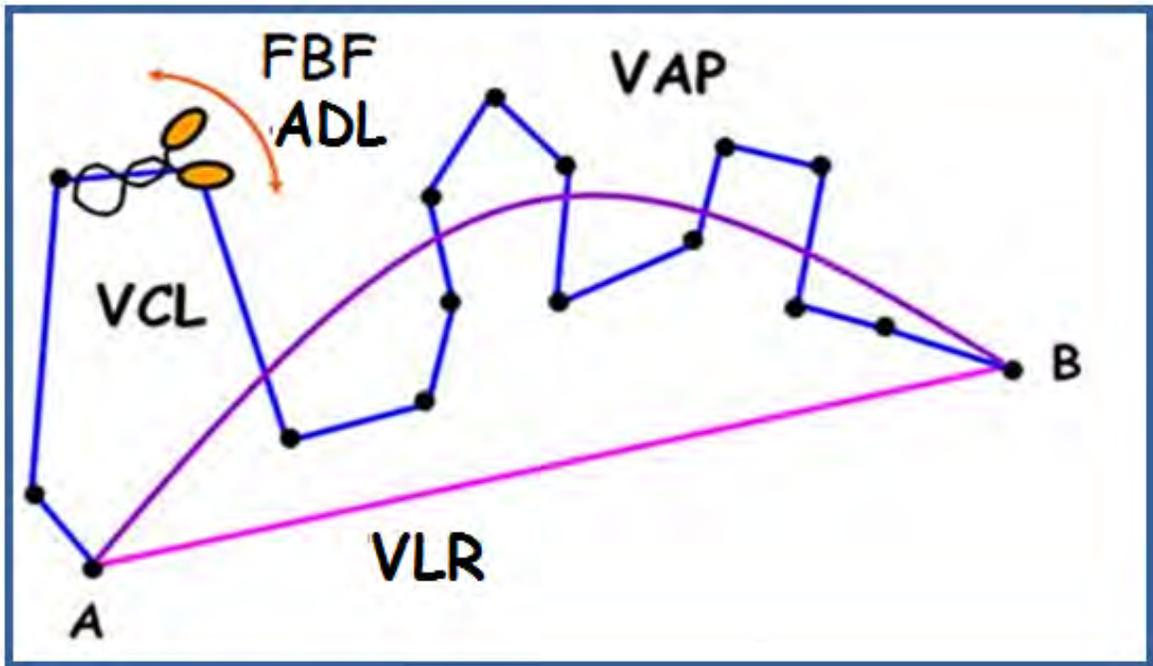


Figura 2.5. Esquema que representa los parámetros medidos por un equipo CASA en un desplazamiento desde el punto A al punto B. La línea rosa corresponde a la VLR (velocidad en línea recta), la línea azul a la VCL (velocidad curvilínea) y la morada a VAP (velocidad media). La flecha naranja representa ADL (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza) y FBF es la frecuencia del batido del flagelo.

## 2.8 Competencia espermática

Parker en 1970 describió un fenómeno al que denominó competencia espermática, el cual se presenta cuando los espermatozoides de dos o más machos compiten para fertilizar los gametos de las hembras en especies generalmente polígamas (Ginsberg y Huck, 1989; Parker, 1998; Contreras *et al.*, 2005). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en muchas especies desde el punto de vista descriptivo, morfológico, fisiológico, conductual y ultraestructural, mostrando evidencias que incluso pueden ser muy sutiles, pero importantes y varían de acuerdo al sistema de apareamiento (Ginsberg y Huck, 1989; Anderson y Dixson, 2002).

El sistema de apareamiento es elegido por cada especie como una adaptación que les permite preservar la especie y específicamente en los machos, para incrementar la paternidad antes, durante y después de la cópula (Parker, 1998). El tipo de apareamiento puede ser monogámico y poligámico. La monogamia es una estrategia empleada por aproximadamente el 3% de las especies animales y se caracteriza porque un macho y una hembra se aparean solo entre ellos, garantizando de esta forma que la progenie sea de ambos y llegue viva hasta la edad adulta, tal es el caso del zorro (*Vulpes vulpes*), murciélago (Chiroptera) y pocas especies de roedores (*Microtus ochrogaster*) y primates (*Aotus* e *Hylobates*), mientras que en la poligamia existen dos vertientes: la poliandria, donde las hembras se aparean con muchos machos, por ejemplo: perros (*Canis familiaris*) (Woodall y Johnstone, 1988), tamarinos (*Saguinus fuscicollis*) y el roedor *Microtus montanus*; y la poliginia, donde los machos se aparean con múltiples hembras, por ejemplo: tití, papión y babuino.

De esta forma la selección intrasexual y la elección de pareja, provoca que las hembras elijan de entre los machos, al que tenga mejor condición, discriminando entre ellos en base a caracteres sexuales secundarios y promoviendo la competencia entre ellos, mientras que los machos evolucionan caracteres útiles para el combate que los lleve a tener mayor éxito con las hembras (Rodríguez *et al.*, 2005)

En organismos que presentan monogamia, el dimorfismo sexual es mínimo; mientras que en organismos polígamos, el grado del dimorfismo sexual varía y puede dar

una idea de la proporción de sexos que hay en un grupo social, así como del grado de competencia que existe entre ellos (Florenzano, 2009).

### **2.8.1 Nivel morfológico**

De entre los estudios morfológicos que demuestran la existencia de la competencia espermática, abundan los realizados en insectos. Un ejemplo evidente de que el sistema de apareamiento promueve el desarrollo de ciertas características morfológicas, fue el experimento realizado con moscas del género *Scatophaga*, donde se midió el tamaño testicular después de 10 generaciones de selección de un sistema de apareamiento particular, generando un mayor tamaño promedio de testículo en el grupo poliándrico a comparación del monogámico (Hosken y Ward, 2001). Otros machos de insectos han desarrollado adaptaciones en el órgano copulador que previenen cópulas posteriores o remueven espermatozoides de cópulas anteriores (Contreras *et al.*, 2005); y en organismos superiores algunos machos han desarrollado una estructura llamada *báculum* que ayuda a la cópula, posiblemente para mantener la erección (Kelly, 2000).

### **2.8.2 Nivel conductual**

En el aspecto conductual es bien conocida la existencia de cópulas forzadas (Woodall y Johnstone, 1988), retención de espermatozoides mediante cópulas prolongadas (Florenzano, 2009), infanticidios y abortos inducidos (Gutiérrez y Riveros, 2003; Arteaga *et al.*, 2007); mientras que otros machos simplemente evalúan el grado de rivalidad que tienen por una hembra y deciden la cantidad de espermatozoides a eyacular, o incluso depositan espermatozoides anucleados o nucleados como en las mariposas (Contreras *et al.*, 2005; Martínez, 2006).

### **2.8.3 Nivel fisiológico**

Fisiológicamente existen ejemplos que relacionan un mayor volumen de la pieza media del espermatozoide con un aumento en la concentración de testosterona producida dentro de un estudio en 21 géneros de primates (Dixson y Anderson, 2004). También en humanos, primates y roedores se ha demostrado que de acuerdo al nivel de competencia,

los machos regulan el número de espermatozoides que producen (Parker, 1998; Yamamoto *et al.*, 2000; Pound y Gage, 2004; Kilgallon, 2004; Lucio y Gutiérrez-Ospina, 2006). De hecho, algunas ratas machos colocan tapones espermáticos en las hembras (Dewsbury y Hartung, 1980), generan sustancias en las glándulas accesorias que promueven una mejor competencia, matan a los espermatozoides de apareamientos previos y generan sustancias tóxicas que promueven el conflicto sexual dañando incluso a las hembras, como el caso de múltiples insectos (Contreras *et al.*, 2005).

La competencia espermática parece ejercer cierta presión incluso en la forma y función de los espermatozoides, de tal forma que en la naturaleza se encuentran una gran diversidad de estos, existen espermatozoides sin flagelos, cabezas con más de un flagelo, dos o tres espermatozoides con flagelos muy largos y enmarañados, o espermatozoides que se mueven juntos para avanzar a mayor velocidad (Contreras *et al.*, 2005).

#### **2.8.4 Experimentos de motilidad asociados a competencia espermática.**

Considerando que en la naturaleza es común encontrar espermatozoides de distintos machos en el tracto reproductivo, desde hace tiempo se han llevado a cabo distintos estudios evaluando la competencia de los espermatozoides de un macho contra los de otro.

En pavos por ejemplo, se realizó un experimento para demostrar que la motilidad espermática difiere entre cada macho y qué tanto ésta influía en la paternidad de las crías, se realizaron combinaciones con espermatozoides de machos con motilidad alta, donde no hubo diferencias entre la proporción de la descendencia producida, mientras que si se combinaban espermatozoides de pavos con motilidad baja, uno de ellos obtenía mayor éxito reproductivo sobre los demás (Donoghue *et al.*, 1999), demostrando que la motilidad espermática es un componente crítico del éxito de fertilización. Esto mismo quedó demostrado en gallinas, donde se hicieron inseminaciones heteroespermáticas *in vivo* y se observó que los eyaculados de machos con motilidad lenta pierden su capacidad fertilizante con mayor rapidez que los eyaculados con motilidad rápida, esto debido a que sufren envejecimiento post-meiótico más pronto que los espermatozoides veloces, esta dinámica de competencia espermática dependiente del tiempo tiene repercusiones

importantes para la evolución de las estrategias reproductivas de los machos (Pizzari *et al.*, 2008).

Resultados similares se obtuvieron en conejos, donde se reportaron diferencias entre machos asociadas a la ovulación, ya que parece ser que los espermatozoides de un macho tienen diferentes tiempos de sobrevivencia respecto a los de otros machos, o son eliminados selectivamente dentro de la hembra (Parrish y Foote, 1985).

En bovinos este fenómeno no había sido estudiado como tal, aunque se tienen antecedentes de experimentos donde realizaron inseminaciones heteroespermáticas con pajillas de semen mezclado de toros o de líquido seminal de un toro y espermatozoides de otro para ver si encontraban alguna mejora en cuanto a la fertilidad de las vacas (Stewart *et al.*, 1974, Nelson *et al.*, 1975). En esos casos se obtuvieron resultados variables donde generalmente se observa que hay toros que tienen un mayor éxito en cuanto a la paternidad de la progenie por separado, mientras que para otros toros es mejor combinarlos para mejorar su capacidad fecundante. Sin embargo, en cuanto a motilidad no se tuvieron diferencias en ninguna de las mezclas con respecto al semen individual post-congelación, esto puede deberse a varias razones como son: diferencias entre el semen de los machos para resistir las diferentes etapas del proceso de congelación, las diferencias en el tiempo de capacitación de los espermatozoides, o a su fertilidad inherente individual.

En muchos de esos experimentos se observó que los espermatozoides mezclados de diferentes toros en una inseminación, no competían por el todo o nada ya que en algunas ocasiones en que se tenían gemelos, cada uno era de diferente padre (Stewart *et al.*, 1974); por otra parte, en los mismos estudios se reportaron diferencias en el semen del mismo toro previo a la congelación con respecto a la post congelación o descongelación, lo cual habla de que hay diferencias individuales en cómo reaccionará el semen de cada toro a la congelación para tener una mayor capacidad fecundante. Flint *et al.* (2003) mencionan que si se insemina de manera heteroespermática, al comparar entre 2 toros casi siempre habrá una proporción de 70:30 en la progenie. Un ejemplo claro es el experimento de Beatty *et al.* (1976) donde compararon la capacidad fecundante de semen bovino en fresco y a dos diferentes tiempos de congelación y observaron que la relación

en la proporción de la progenie fue igual en semen fresco para todos los toros usados, mientras que una vez que el semen se congelaba, variaba hasta ser de 102:32:35:67 crías para cada uno de los cuatro machos del estudio, por lo tanto, el efecto de la congelación es diferente para cada individuo ya que se puede haber dañado mecánicamente al espermatozoide.

De igual manera el proceso de capacitación es distinto entre los espermatozoides de cada toro, de hecho, en la actualidad, hay empresas dedicadas al ámbito de la reproducción bovina que están comenzando a incrementar la fertilidad, aumentando el porcentaje de concepción hasta un 9% mediante la explotación de la variación natural en el proceso de capacitación que existe entre los espermatozoides de diferentes toros; estas empresas combinan espermatozoides de hasta tres toros en diferentes estados de avance de capacitación en una sola pajilla para la IA, dando la oportunidad de que haya una amplia ventana de oportunidad para fertilizar el ovocito, ya que éste puede ser ovulado a diferentes tiempos (<http://www.genusbreeding.co.uk>).

Como dato adicional, se sabe que en algunos lugares se puede elevar un índice de concepción bajo si se pasa de IA al servicio natural. Ello es explicable si se tiene en cuenta que la monta natural cuenta con algunas ventajas (mayor dosis seminal, repetición de servicios durante el mismo celo por uno o varios toros, siembra de semen natural, repetición incontrolada de servicios en distintos celos, etc.), pero no puede considerarse como un defecto de la IA, por lo que de manera natural se demuestra que existe la competencia espermática en bovinos al tener una misma vaca servicios de varios toros (Bavera, 2005)

En bovinos se sabe que por medio de IA el porcentaje de fertilidad es máximo del 60% (Breuel *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1996), por lo que es importante conocer si la presencia de espermatozoides de otro individuo provoca un cambio fisiológico como el aumento en la motilidad debida a un influjo de calcio con fines de incrementar el porcentaje de fertilidad en bovinos.

### 3. Justificación

Como se presentó en la revisión de literatura, el grueso de los estudios sobre la competencia espermática, están encaminados a los aspectos morfológicos y conductuales, incluso en algunos casos se intentó la correlación con los niveles hormonales; dentro de estos aspectos, el grupo animal en el que más ha sido estudiado este fenómeno es el de los insectos. Por otro lado en aves y mamíferos se enfocaron a determinar el porcentaje de éxito reproductivo en competencia espermática, relacionando que los machos con mayor éxito eran quienes tenían una mayor proporción de crías. Sin embargo, hay pocas evidencias de aspectos fisiológicos de los espermatozoides como la motilidad, es por ello que el enfoque de este estudio se encaminó al análisis de la motilidad espermática en competencia espermática. Para ello se analizó semen de la especie *Bos taurus* de dos razas distintas, Holstein y Jersey; es importante destacar que el estudio comprendió el análisis de semen congelado, cuya motilidad en competencia espermática a la fecha se desconoce.

De manera particular la importancia del estudio radica en que el porcentaje de fertilidad en bovinos utilizando semen congelado es aproximadamente del 60% en México, por lo que es importante conocer si la presencia de espermatozoides de otro individuo provoca un aumento en la motilidad debida al influjo de calcio con fines de incrementar ese porcentaje en bovinos.

#### **4. Hipótesis**

El fenómeno de competencia espermática *in vitro* en semen bovino congelado genera un aumento en la motilidad debida a un incremento de calcio intraespermático.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Identificar las respuestas que se presentan a nivel de calcio intraespermático y de motilidad en los espermatozoides de toro, provenientes de pajillas descongeladas, cuando los espermatozoides de dos individuos distintos se mezclan en un modelo *in vitro*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar si existen respuestas *in vitro* asociadas a canales de calcio<sup>2+</sup> durante el fenómeno de competencia espermática en toros utilizando la metodología para espectrofluorometría.
- Evaluar la motilidad y vigor de los espermatozoides bovinos mediante el método subjetivo utilizando microscopía de campo claro de manera individual y mezclando el semen de dos toros.
- Evaluar parámetros de motilidad mediante el Sistema CASA (Computer-assisted-sperm-analysis) en espermatozoides de toros sometidos a competencia espermática.
- Comparar el uso del método subjetivo de microscopía de campo claro contra el sistema CASA para la evaluación de motilidad espermática en espermatozoides congelados de bovinos.
- Determinar la presencia de hipermotilidad en espermatozoides congelados de bovino en base a los parámetros de VCL, LIN y ADL.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Muestras biológicas**

#### **6.1.1 Pajillas**

Para este estudio se utilizaron un total de 78 pajillas de semen congelado de *Bos taurus*, que incluyo las razas Holstein y Jersey. Este material biológico fue donado por el Dr. Salvador Romo García, del Departamento de Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, así como por el Dr. Wilhelm Remberg, de la empresa RECA, S.A. de C.V.

#### **6.1.2 Selección de muestras de semen**

El semen de ambas razas se colectó mediante vagina artificial. Sólo se congelaron aquellas muestras que presentaron un color blanco, opaco, con aspecto cremoso y ligeramente viscoso, así como una concentración entre 500,000 a 1,000,000 de espermatozoides/ml (Zemjamis, 1966) y un pH de 6 a 7 con una viabilidad  $\geq$  al 60% contenido en volumen de 1-10ml.

#### **6.1.3 Características de las pajillas donadas**

Del total de las pajillas donadas, 36 correspondieron a pajillas de semen congelado de *B. Taurus* de la raza Holstein y 36 pajillas de semen *B. Taurus*, de la raza Jersey. Cada pajilla estaba contenida en un volumen de 0.25 ml, con una concentración aproximada de 25 millones de espermatozoides. Por su parte, las pajillas donadas por el Dr. Wilhelm Remberg, correspondieron a semen de animales individuales así como de semen mezclado, denominado semen heteroespermático.

Para verificar la concentración espermática, se analizó al azar una pajilla de cada lote; este procedimiento consistió en descongelar las pajillas y el volumen total

se colocó en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml, de este volumen, únicamente 5  $\mu$ l se diluyeron en agua hasta obtener una dilución 1:20, de esta dilución se tomaron 10  $\mu$ l y se colocaron en la cámara de Neubauer para su conteo.

## **6.2 Concentración de calcio intraespermático.**

La determinación de la concentración de calcio intraespermático se realizó en el Laboratorio de Biomembranas de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **6.2.1 Medio de mantenimiento**

Con el fin de conservar los espermatozoides vivos y móviles, se desarrolló el medio de mantenimiento que consistió en una solución a pH de 7.2 a 7.3 en condiciones de esterilidad que contenía 114.4 mM NaCl, 3.16 mM KCl, 0.48 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM lactato de sodio, 2.17 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM piruvato de sodio, 2 mM dextrosa y 10 mM HEPES (Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico). Este medio se preparó previamente y se conservó a 4°C hasta su uso. El día de análisis, el medio se conservó a una temperatura de 36°C por lo menos una hora antes de comenzar cada experimento para evitar que los cambios de temperatura afectaran durante el proceso.

### **6.2.2 Preparación del gradiente de Percoll**

Con el propósito de seleccionar de forma precisa los espermatozoides completos de aquellos fragmentados presentes en la pajilla en estudio, se realizó un gradiente discontinuo de densidad, descrito por González-Martínez *et al.*, 2002 y Sánchez *et al.*, 2009.

Se preparó Percoll\* al 90%, combinando 4.5 ml de producto comercial (conservado entre 2 y 8°C) con 0.5 ml de medio Sperm TL modificado (conservado

\* Sigma, P1644

a 2 a 8°C), inmediatamente después se colocó a temperatura ambiente. Se añadió 1M CaCl<sub>2</sub> (9.85 µl), de 0.1 M MgCl<sub>2</sub> (19.7 µl), 10.45 mg de NaHCO<sub>3</sub>, finalmente se colocó ácido láctico al 60% (18.4 µl) conservado entre 2 y 8°C. Una vez colocados todos los componentes, la muestra se mezcló por inversión.

Para la realización de Percoll al 45%, se mezclaron por inversión 1.5 ml de Percoll al 90% conservado a 4°C y 1.5 ml de Sperm TL s/BSA a -20°C en un tubo cónico estéril bajo campana de flujo laminar.

Una vez obtenidos el Percoll al 90% y 45%, se conservaron a una temperatura de 36°C durante una hora, posterior a ese tiempo, se colocó 1 ml de Percoll al 90% en tubo cónico de plástico de 10 ml e inmediatamente sobre este se colocó cuidadosamente 1 ml de la solución de Percoll al 45%.

### **6.2.3 Descongelación de las pajillas**

Todas las pajillas utilizadas en el experimento se descongelaron al momento de utilizarlas, para ello, las pajillas se sumergieron en agua corriente a 36°C durante 40 segundos, inmediatamente se secaron y se cortó uno de los extremos de la pajilla el que se colocó en la boca del recipiente vaciando el semen y finalmente se cortó el otro extremo de la pajilla para que el semen se depositara en el frasco.

### **6.2.4 Preparación de las muestras**

#### **6.2.4.1 Separación de espermatozoides viables**

Se tomaron 8 pajillas del mismo toro de la raza Holstein (tubo 1) y 8 pajillas del mismo toro de la raza Jersey (tubo 2), estas pajillas se descongelaron de acuerdo al procedimiento previamente mencionado. Una vez descongeladas las pajillas, el contenido se depositó en un tubo Eppendorf respectivamente, se mezcló por inversión y se tomaron 10 µl de cada mezcla de semen para evaluar motilidad espermática mediante observación con microscopio óptico.

El resto del semen se colocó sobre el gradiente de Percoll como ya se ha descrito, 2 ml de cada mezcla de semen se colocaron en gradientes de Percoll independientes, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 600 Xg a temperatura ambiente durante 30 minutos, una vez concluido este procedimiento, el sobrenadante de ambos gradientes se eliminó y el precipitado se resuspendió en 5 ml de medio de mantenimiento y se continuo con una centrifugación a 300 Xg durante por 5 min, finalmente el precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de medio de mantenimiento ya que en él se localizaban los espermatozoides viables.

El tubo 2 se ajustó a un volumen de 8 ml y se mantuvo en una incubadora a 37°C hasta su confrontación con la muestra del tubo 1.

#### **6.2.4.2 Incorporación del fluoróforo**

Por su parte los espermatozoides del tubo 1 se resuspendieron homogéneamente y 250 µl de la suspensión se diluyeron con 8 ml de medio de mantenimiento, el resto del volumen se ajustó a 1 ml con medio de mantenimiento e inmediatamente se le adicionó una concentración de 1µM de Fura-2 acetoximetil-éster (Fura 2-AM de Molecular Probes) contenida en 1 µl de solución, finalmente la mezcla se incubó a 37°C durante un periodo de 40 minutos.

Concluido el tiempo de incubación, el FURA no incorporado, se eliminó colocando 5 ml de medio de mantenimiento a la mezcla y se procedió a una centrifugación a 300 Xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se desechó, y el precipitado se resuspendió homogéneamente en 3 ml de medio de mantenimiento, este volumen se distribuyó en tres fracciones de 1 ml cada una, con el propósito de analizar la competencia espermática entre la mezcla de espermatozoides del tubo 2 obtenido anteriormente, la competencia con espermatozoides del mismo toro y finalmente una fracción para la calibración del espectrofluorómetro. Las tres fracciones se ajustaron a un volumen de 5 ml y se

conservaron a una temperatura de 37°C durante 5 minutos, previo a su utilización.

#### **6.2.4.3. Calibración y funcionamiento del espectrofluorómetro.**

Se utilizó el espectrofluorómetro (PTI, Photon Technology International, Inc., modelo MD-5020), que se calibró mediante un barrido en ausencia de muestra. Una vez obtenido el fondo del aparato, se iniciaron los registros de calcio, para ello, se agregó a la muestra de semen cargado con el fluoróforo, 1 µM de ionomicina, con el fin de facilitar la entrada de calcio a la célula y saturar al FURA. Las muestras fueron leídas a diferentes longitudes de onda para obtener la 340/380 nm máxima (Rmax) y posteriormente se queló el Ca<sup>2+</sup> con 3.5 mM de EGTA + 1% Tritón X-100 para obtener la relación 340/380 nm sin Ca<sup>2+</sup> (Rmin).

Los valores de R a lo largo del registro se convirtieron a valores de calcio intracelular con la ecuación descrita por Grynkiewicz (*et al.*1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \beta$$

en donde  $\beta = (F_{f380}/F_{b380})$ , esto es, la relación de fluorescencias detectadas excitando a 380 nm en medio sin Ca<sup>2+</sup> (EGTA-tritón) y con Ca<sup>2+</sup> (ionomicina), respectivamente. La K<sub>d</sub> es la constante de disociación que para el Fura 2 es de 260 nm.

La fluorescencia se detectó con un filtro de 488 nm y se excitó alternadamente a 340 y 380 nm con el monocromador PTI.

#### **6.2.4.4. Lecturas de fluorescencia**

Una vez calibrado el equipo, se realizaron las lecturas de fluorescencia para las muestras en estudio. Para ello, las fracciones cargadas con FURA (con aproximadamente 25 millones de espermatozoides) se centrifugaron a 300 Xg

durante 5 min y el sobrenadante se eliminó, mientras que el precipitado se resuspendió en 2.5 ml de medio de mantenimiento y el volumen final se colocó en una cubeta de cuarzo para su lectura en el espectrofluorómetro con agitación magnética continua a 37°C, durante 5 minutos. Simultáneamente, se procesó una segunda muestra del mismo toro (250 µl de muestra diluida en 8 ml de medio de mantenimiento) que no contenía el fluoróforo, para ello, la muestra se centrifugó a 300 Xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue recuperado, se colocó directamente en la cubeta de cuarzo que contenía la muestra con fluoróforo y se reanudó la lectura de fluorescencia, lo que permitió la evaluación del influjo de calcio por competencia.

Este procedimiento se llevó a cabo para el análisis de muestras de este estudio, confrontando muestras espermáticas de toros raza Holstein contra espermatozoides de toros de raza Jersey.

### **6.3 Evaluación de parámetros de motilidad.**

Motilidad subjetiva: Esta parte del estudio, se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la FES-Cuautitlán. Para ello, se seleccionaron 6 pajillas de semen congelado de las razas Holstein y Jersey, que se descongelaron de acuerdo al procedimiento antes descrito. En breve, el o los portaobjetos y cubreobjetos se colocaron en una platina térmica a 36°C, durante 15 minutos, al término, se depositaron 10 µl del semen de cada toro (Holstein y Jersey) por separado, así como la mezcla de ambas muestras. Realizado este proceso, se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles y el vigor del movimiento en una escala de 0 (sin movimiento) a 5 (movimiento enérgico). Este procedimiento se realizó en 3 muestras distintas, siempre confrontando el semen de ambas razas. Además, estos parámetros se determinaron por dos observadores y al final se compraron los resultados.

Análisis mediante método computarizado CASA Prism/ Sperm Vision 3.7.5 Professional, equipo proporcionado por la empresa Minitube, ubicada en el estado de Querétaro, México): Con el objeto de analizar la velocidad curvilínea (VCL),

velocidad en línea recta (VLR), velocidad media (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ADL), frecuencia del batido del flagelo (FBF) e índice de linealidad (LIN), se recurrió a la utilización del sistema computarizado llamado CASA, para ello, el equipo se calibró siguiendo las especificaciones establecidas en el sistema.

Cabe mencionar que para el análisis de la información emitida por el equipo, fue necesario indicar el tipo de semen a ser analizado, el tipo de diluyente utilizado (Triladyl-yema de huevo) y el volumen de la pajilla.

### **6.3.1. Análisis de pajillas**

Para el análisis de las muestras del estudio empleando el sistema CASA, primero, cada muestra de semen se analizó de forma independiente, segundo, se mezclaron muestras de semen de toros distintos y los parámetros emitidos por el equipo se analizaron en competencia espermática, estas muestras se denominaron mezclas heteroespermáticas postcongelación. Simultáneamente se analizaron muestras heteroespermáticas precongelación, donadas por la empresa RECA, S.A. de C.V.

Para el desarrollo del estudio, las pajillas se descongelaron de acuerdo al protocolo descrito, así, el semen se colocó en tubos individuales mantenidos a la misma temperatura y ambas muestras se mezclaron y únicamente 3  $\mu$ l de la mezcla se colocaron en la cámara (Leja, Minitube) para su análisis.

El análisis de cada muestra, consistió en identificar 7 campos de la muestra y aquel campo que mejor la representó, se tomaron secuencias en 30 imágenes.

### **6.3.2. Hipermotilidad**

De las muestras evaluadas por el equipo CASA, también se analizó la hipermotilidad, tomando como parámetros a VCL, ALH y LIN, que corresponde al índice de linealidad:  $(VLR/VCL) \times 100$ , ya que el patrón de desplazamiento influye

en los valores de velocidad mencionados, tomando como referencia a los espermatozoides hipermotiles con valores de ALH ( $>7\mu\text{m}$ ) y VCL ( $>150\mu\text{m}/\text{seg}$ ) y un índice de linearidad bajo ( $<50\%$ ) (Mortimer, 2000).

### **6.3.3. Análisis estadístico**

Para analizar los datos estadísticamente, se separaron en bloques las muestras evaluadas postcongelación, el primero tenía pajillas con semen de menos de 10 millones de espermatozoides/ml y un segundo bloque de 11 a 20 millones de espermatozoides/ml, con la finalidad de que la concentración no fuera un factor que afectara la respuesta. Las mezclas precongelación y las muestras individuales correspondientes se evaluaron estadísticamente por separado. Se utilizó la prueba de t para datos independientes con un 99% de confianza.

## **7. Resultados**

### **7.1 Concentración de calcio intraespermático**

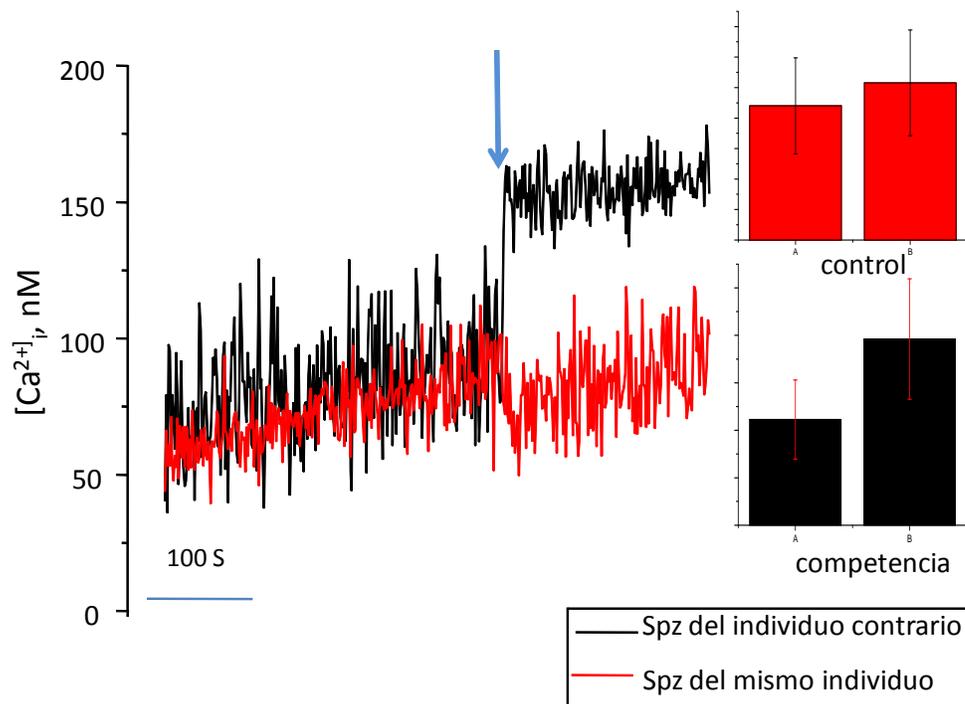
Es importante señalar que durante el proceso de descongelación mueren aproximadamente la mitad de los espermatozoides de una muestra, al igual que durante el tiempo de la carga con el fluoróforo, por lo cual fue necesario utilizar un gran número de pajillas para cada experimento. En la Figura 7.1 se puede ver una microfotografía de espermatozoides cargados con el Fura-2AM a un aumento de 40x en un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo E-600 con filtro para DAPI azul.

Una vez que los experimentos de calcio intracelular se comenzaron a llevar a cabo fue necesario reportar cada uno por separado (Figura 7.2.), ya que la cantidad de espermatozoides utilizados al final fue variable por la razón antes mencionada, sin embargo como se observa en las figuras 7.2.a, 7.2.b y 7.2.c, realmente no hay una diferencia significativa entre las respuestas de la concentración de calcio intracelular de las muestras antes de la competencia y durante ésta, aunque parecen variar ligeramente.

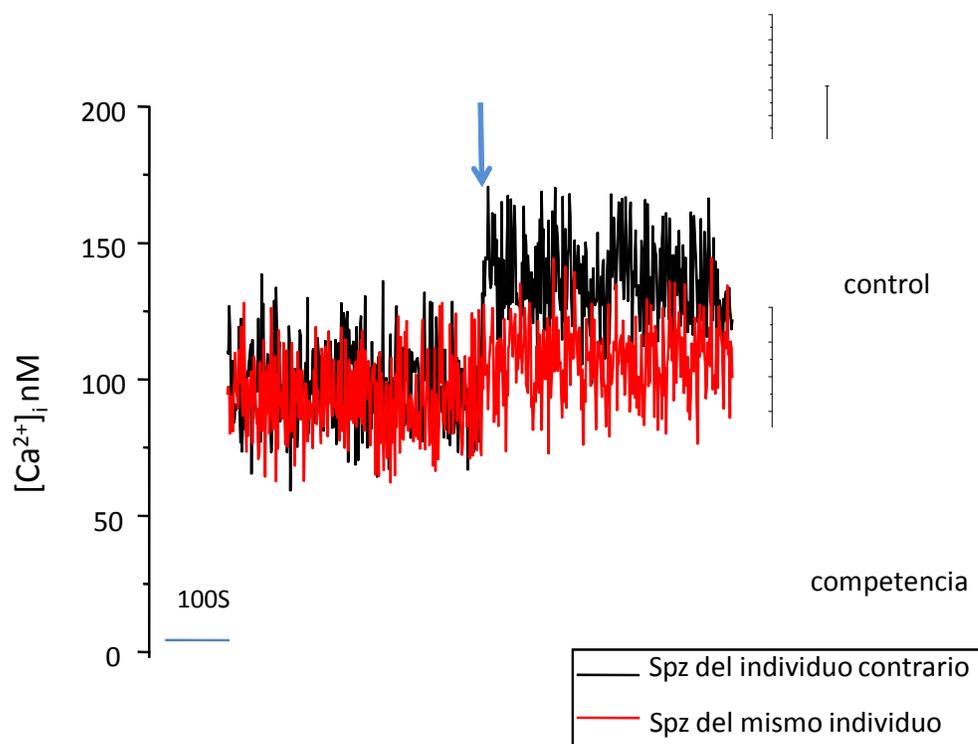


Figura 7.1. Microfotografía de espermatozoides de bovino cargado con Fura 2-AM mediante microscopio epifluorescente a 40x.

a



b



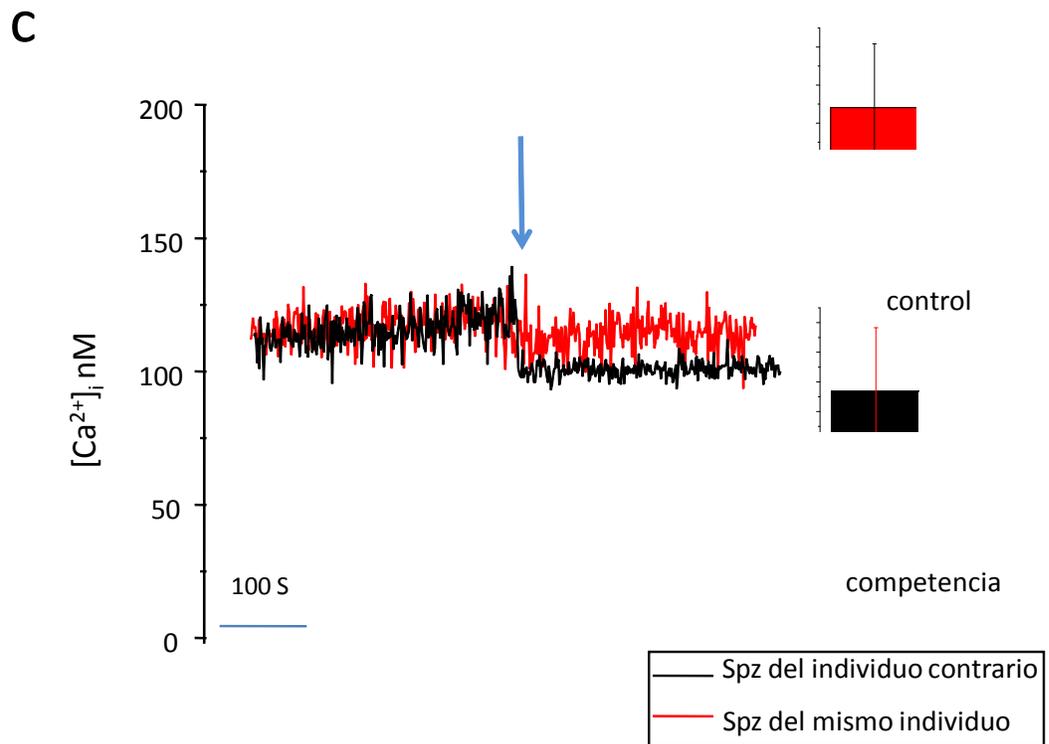


Figura 7.2. Registros de concentración intracelular de Calcio. En todos los experimentos (A, B y C), los espermatozoides del primer toro se dejaron durante 5 a 5:30 minutos en un estado de estabilidad. La flecha azul indica el término de ese tiempo y el momento en el que se agregan los espermatozoides para generar competencia. La línea negra indica espermatozoides del toro contrario y se observan cambios en la concentración de calcio, mientras que la línea roja indica que se agregaron espermatozoides del mismo toro, en el que no hay un aumento en la concentración de calcio. Las gráficas con barras rojas indican la comparación entre los registros control y las gráficas de barras negras indican la comparación entre el grupo control y el grupo donde se llevó a cabo la competencia espermática.

En la Figura 7.2.a se observa que hay una marcada tendencia a aumentar la concentración del calcio, misma que se ve disminuída en la Figura 7.2.b y cambia su tendencia en la Figura 7.2.c. Sin embargo como se observa en las gráficas, no hay diferencias significativas entre los grupos controles y los grupos sometidos a competencia.

## **7.2 Evaluación de los parámetros de motilidad**

### **7.2.1 Motilidad subjetiva**

Debido a los resultados no significativos que se obtuvieron al evaluar la respuesta de calcio intraespermático, se decidió hacer el análisis de datos de motilidad mediante un método subjetivo utilizando un microscopio óptico de campo claro con un aumento de 200x por parte de dos observadores distintos simultáneamente (ver Cuadro 7.1.). Posteriormente se evaluaron los mismos parámetros de motilidad mediante el equipo CASA- Como puede observarse, mediante el método subjetivo se pudo apreciar mayor vigor de la motilidad de los espermatozoides cuando se colocaban juntos, sin embargo una vez que se midieron los distintos parámetros cinemáticos en el equipo computarizado CASA, los resultados obtenidos fueron distintos.

Cuadro 7.1. Datos de motilidad espermática y vigor de la motilidad de los espermatozoides de manera individual y al enfrentarse en competencia espermática *in vitro* mediante observación a microscopio de campo claro por parte de dos observadores.

Experimento		% motilidad (0-100) / vigor (0-5)	
		Observador 1	Observador 2
1	Toro 1	40/4	50/4
	Toro 2	20/3	20/3
	Competencia	60/5	50/5
2	Toro 1	20/3	30/3
	Toro 2	30/3	50/3
	Competencia	40/4	40/4
3	Toro 1	30/3	40/3
	Toro 2	10/2	10/2
	Competencia	20/3	30/3

La escala utilizada para medir el vigor fue de tal forma que 0 equivale a muy poca motilidad y 5 a motilidad a gran velocidad.

### **7.2.2 Motilidad evaluada por CASA**

Al realizar la evaluación con el sistema CASA los resultados fueron distintos utilizando el mismo lote de pajillas y se muestran en los Cuadros 7.2, 7.3 y 7.4.

Los valores de  $t$  (datos no mostrados) no representaron diferencias estadísticas significativas en ninguna muestra evaluada tanto individualmente como en mezclas homoespermáticas o heteroespermáticas.

Cuadro 7.2. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen de baja concentración (hasta 10 millones/ml).

postcongelado	Concentración (billones/ml)	VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VLR ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	FBF	ADL ( $\mu\text{m}$ )
	0.0088	76.8	40.05	29.07	22.56	5.21
	0.0108	65.92	43.69	33.78	17.39	4.93
	0.0054	71.55	39.2	31.2	17.09	4.69
	0.0052	82.53	51.51	41.61	14.83	7.37
	0.0108	69.84	40.48	30.93	17.93	5.07
	0.0060	89.5	52.59	37.08	20.71	6.38
	0.0032	75.17	47.79	34.55	13.74	5
	0.0068	84.69	47.39	30.3	22.88	6.45

Las filas oscuras muestran los datos de competencia espermática *in vitro*, mientras que el resto muestran los mismos parámetros medidos de cada muestra de semen individual. VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad media), VLR (velocidad en línea recta), FBF (frecuencia del batido del flagelo), ADL (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza).

Cuadro 7.3. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen de concentración estándar (de 11 a 20 millones/ml).

Concentración (millones/ml)	VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VLR ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	FBF	ADL ( $\mu\text{m}$ )
20.60	82.94	49.01	37.15	19.54	6.25
11.00	80.05	47.31	34.75	18.53	5.83
18.60	83.96	48.91	34.89	20.54	6.19
12.00	77.55	46.08	36.97	19.24	5.55
20.00	75.49	48.19	38.08	19.48	6.14
15.50	73.5	45.61	35.81	17	5.88
12.50	78.21	45.96	34.43	21.11	6.42
18.40	74.96	44.1	34.41	18.46	5.65
19.20	103.29	57.35	40.42	19.44	7.11
18.60	99.39	53.99	37.61	20.72	6.93
18.40	86.96	51.33	40.8	19.63	6.5
11.40	88.92	49.47	33.87	19.19	6.11
11.60	76.92	44.79	34.1	18.28	5.23

postcongelación

Las filas oscuras muestran los datos de competencia espermática *in vitro*, mientras que el resto muestran los mismos parámetros medidos de cada muestra de semen individual. VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad media), VLR (velocidad en línea recta), FBF (frecuencia del batido del flagelo), ADL (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza).

Cuadro 7.4. Parámetros de motilidad obtenidos mediante el sistema CASA en pajillas de semen congelado donados por la empresa RECA, S.A. de C.V.

precongelado	Concentración (millones/ml)	VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VLR ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	FCP	ADL ( $\mu\text{m}$ )
	1.0	51.97	24.14	18.37	16.25	3.46
	0.7	49.86	24.77	17.61	24.7	2.75
	0.5	89.77	45.93	29.85	15.65	8.02
	1.5	112.78	71.21	54.52	23.69	10.43
	0.7	123.18	87.62	49.83	30.43	6.52
	1.0	44.07	25.85	18.67	14.49	3.53

Las filas oscuras muestran los datos de competencia espermática *in vitro* medidas en pajillas en las que el semen de dos toros fue mezclado previo a la congelación. En el resto se muestran los mismos parámetros medidos de cada muestra de semen individual de los mismos toros. VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad media), VLR (velocidad en línea recta), FBF (frecuencia del batido del flagelo), ADL (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza).

### **7.2.3 Hipermotilidad**

Por otro lado, en el Cuadro 7.5 se pueden observar los datos que se relacionan con la hipermotilidad de los espermatozoides; sin embargo tampoco estos datos arrojan indicios de que los espermatozoides presenten hipermotilidad una vez mezclados.

Cuadro 7.5. Datos a partir de los cuales se determinó la presencia de hipermotilidad de los espermatozoides.

VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	INDICE DE LINEARIDAD (%)	AMPLITUD DEL DESPLAZAMIENTO LATERAL DE LA CABEZA ( $\mu\text{m}$ )
92.02	0.44	6.42
111.92	0.38	7.45
82.94	0.44	6.25
74.96	0.45	5.65
71.55	0.43	4.69
80.05	0.43	5.83
104.15	0.38	7.3
103.29	0.39	7.11
83.96	0.41	6.19
90	0.43	6.16
82.53	0.5	7.37
77.55	0.47	5.55
69.84	0.44	5.07
99.39	0.37	6.93
76.8	0.37	5.21
87.27	0.42	6.8
89.5	0.41	6.38
75.49	0.5	6.14
94.66	0.4	7.02
75.17	0.45	5
73.5	0.48	5.88
86.96	0.46	6.5
88.92	0.38	6.11
78.21	0.44	6.42
76.92	0.44	5.23
84.69	0.35	6.45
65.92	0.51	4.93
89.77	0.33	8.02
112.78	0.48	10.43
51.97	0.35	3.46
123.18	0.4	6.52
44.07	0.42	3.53
49.86	0.35	2.75

El índice de linealidad es el valor porcentual de la Velocidad en línea recta entre la velocidad curvilínea. Las filas oscuras muestran los datos de semen mezclado tanto antes como después de la congelación.

## **8. Discusión**

Actualmente los estudios que describen el fenómeno de competencia espermática no han descrito aspectos moleculares que pudieran suceder en los espermatozoides cuando son confrontados dos individuos diferentes. Este es el primer estudio que trata de demostrar la respuesta intracelular y el efecto fisiológico relacionado con la motilidad en espermatozoides de mamíferos, y más aún con semen congelado en una especie cuyo índice de fertilidad puede aumentar al emplearse semen congelado y que es tan importante para la producción de carne y leche como los bovinos.

El hecho de que empresas dedicadas al ámbito de la reproducción bovina ya estén realizando y comercializando pajillas heteroespermáticas congeladas obteniendo un aumento en la fertilidad que alcanza el 9%, da pie para realizar este tipo de investigación y pensar que este aumento se debe a la competencia espermática.

Uno de los principales factores que afectan al espermatozoide en cuestión de motilidad es el influjo de calcio. La presencia de este ion permite el inicio, mantenimiento y aumento de la motilidad durante los procesos de capacitación, reacción acrosomal y fertilización del ovocito (Darszon, 2007).

### **8.1 Concentración de calcio intraespermático**

El proceso de congelación y descongelación de las pajillas de semen afecta en diversas medidas a los espermatozoides, principalmente a nivel de la integridad de la membrana plasmática (Stornelli *et al.*, 2005).

En estudios de sobrevivencia al usar Percoll, se ven también afectados los espermatozoides por la presencia de la polivinilpirrolidona (PVP) que se encuentra en el Percoll (Ocaña, *et al.*, 2009) utilizado para la separación de espermatozoides viables y móviles, sin embargo para nuestro estudio, estos cambios no impidieron que el colorante Fura 2-AM penetrara en las células y como se observa en los resultados de este estudio, la distribución del calcio está bien representada en la cabeza y pieza media del flagelo.

Aún y cuando se sabe que después de descongelar el semen, el calcio sufre un aparente desequilibrio por los cambios mecánicos y químicos dentro de la célula (Cormier *et al.*, 1997), durante cada una de las lecturas de fluorescencia, se realizó una prueba control con Tritón al 10% para corroborar el correcto funcionamiento del espectrofluorómetro, ya que esta sustancia rompe la membrana plasmática, mitocondrial y acrosomal (Suarez, 2008) liberando el calcio y demás componentes que hubiera dentro de ellas; el correcto funcionamiento se identificó mediante un pico en las concentraciones de calcio que se apreció muy superior e inmediato al de la lectura de cada experimento (datos no mostrados).

Una de las propuestas planteadas en este trabajo era evaluar si el contacto de espermatozoides de dos individuos distintos provoca un aumento de calcio que pudiera estar asociado a un aumento en la motilidad, desafortunadamente bajo las condiciones de este experimento, no hubo un incremento en la concentración de calcio intraespermático, por lo que pensamos que esta falta de respuesta se debe al daño que se produce en el citoesqueleto de la pieza media provocado previamente por la criopreservación (Cormier *et al.*, 1997; Stornelli *et al.*, 2005). Esta criopreservación probablemente cambia las respuestas a nivel de calcio intracelular, y cualquier alteración de su regulación o estructura debida a procesos de congelación y descongelación puede reflejarse en una disminución de la fertilidad del semen congelado bovino (Cormier *et al.*, 1997). De igual manera se sabe que la proporción de espermatozoides descongelados funcionales es reducida (Canorio, 2008). Sin embargo el daño no afecta de igual manera a todos los espermatozoides, por lo que en este estudio la falta de aumento significativo de calcio la atribuimos a que el semen fue congelado cumpliendo los criterios para realizar el procedimiento, y por lo tanto, los toros utilizados en este estudio tenían una calidad de semen conocida y similar.

Se considera que debe realizarse un estudio más consistente y efectivo para evaluar una respuesta de calcio con semen fresco para evitar que el proceso de criopreservación sea un factor que influye en las respuestas asociadas al influjo de calcio.

## 8.2 Evaluación de los parámetros de motilidad

La motilidad es considerada un parámetro muy importante para la evaluación de la calidad del semen congelado de bovinos; pero aunque ni esta ni los parámetros cinemáticos pueden considerarse indicadores fiables de la capacidad fecundante de un eyaculado, es poco probable que los espermatozoides con motilidad baja o alterada lleguen al oviducto y la mayoría de los espermatozoides con motilidad progresiva tendrán mejores oportunidades de alcanzar el ámpula (Contria *et al.*, 2010).

En esta sección evaluamos la motilidad mediante dos métodos, el primero fue hecho en base a datos relativos obtenidos de dos observadores (evaluación subjetiva) y para el segundo se utilizó un sistema automatizado para evaluar parámetros espermáticos (CASA).

La evaluación subjetiva de la motilidad de los espermatozoides que es ampliamente utilizada en los laboratorios de andrología, depende en gran medida, de la habilidad y la percepción del técnico. Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado diferentes equipos CASA para la evaluación objetiva de las características del movimiento de los espermatozoides (Contria *et al.*, 2010).

Los datos obtenidos en este trabajo mediante el método subjetivo sugieren que si hay una diferencia entre la motilidad del semen de toros individuales y al mezclar semen de dos toros, sin embargo debido a que el número de observaciones realizadas fue mínimo, no se pudo hacer un análisis estadístico.

Ambos procedimientos mostraron diferencias importantes en la motilidad, siendo que los proporcionados mediante el método subjetivo evidencian que los observadores pueden estar predisuestos a los resultados esperados para este estudio, mientras que el sistema CASA presenta valores reales aún evaluando una gran cantidad de muestras, esto sugiere que de preferencia deben utilizarse los métodos computarizados para evaluar parámetros de motilidad y evitar errores por parte del observador.

Para todos los datos obtenidos con el CASA, se observa que independientemente de la concentración de espermatozoides que hubiera en la pajilla o del momento de realizar la mezcla (antes de congelar o después de descongelar), no existen diferencias entre la motilidad de estos toros; como ya se mencionó esto podemos atribuirlo a la fertilidad similar entre estos; o quizá a la PVP proveniente del Percoll, que reduce la misma, aunque esto no se evaluó (Ocaña *et al.*, 2009).

La inseminación heteroespermática utilizándose para evaluar la capacidad fecundante de los machos, puede permitir un aumento en la fertilidad de un macho en particular, cuyo semen este menos favorecido y que en condiciones de inseminación homoespermática sea baja. Esto es posible debido a que el semen de los machos responde de manera distinta al formar parte de una mezcla que al utilizarse de forma individual, o viceversa (Dziuk, 1996; Flint *et al.*, 2005).

En cuanto a la fertilidad, se ha demostrado en toros y en pavos (Stewart *et al.*, 1974; Nelson *et al.*, 1975; Donoghue *et al.*, 1999) que al mezclar semen de machos de diferente calidad, los que son poco fértiles, aumentan su progenie con respecto a los resultados que se obtendrían utilizando su semen individual; por lo que se puede originar cierta fertilización competitiva que ofrezca una vía eficiente para evaluar la fertilidad (Dziuk, 1996; Foote, 2002). En este sentido, la motilidad es muy importante para que el espermatozoide llegue a fertilizar al ovocito, por lo que en esos experimentos los machos de baja fertilidad pudieron haber aumentado su motilidad al estar en presencia de semen de otro macho con buena fertilidad. Por el contrario cuando se colocaba semen de machos muy fértiles, la proporción de la progenie no favorecía a ninguno en específico; por lo que es de esperarse que en este experimento no exista un aumento en la motilidad y que esto sea debido a la falta de significancia en el aumento de la concentración de calcio, tal y como se observó en este estudio. Probablemente si se hace este experimento con semen de diferente calidad se obtengan resultados distintos y más cercanos a los que se esperaban.

Por otro lado, cuando los espermatozoides detectan la presencia del ovocito, responden alterando su comportamiento a un estado de hipermotilidad (Tuma, 2005), y al tratar de ver si los espermatozoides de este estudio la presentaban, no se observan

las características de mayor velocidad curvilínea, menor índice de linearidad y mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza que se requerían para considerarlas como hipermotiles.

En este estudio se consideró evaluar la hipermotilidad ya que aunque es una característica que se adquiere durante el proceso de capacitación dentro de la hembra, se pensó que la capacitación promovida por la congelación podría provocar que algunas muestras presentaran este comportamiento. Sin embargo un punto a considerar es que aunque los sistemas CASA son más objetivos para evaluar ciertos parámetros, la hipermotilidad la lleva a cabo el flagelo, no la cabeza del espermatozoide, y esto es finalmente lo que estos sistemas computarizados detectan (Mortimer, 2000). Las cabezas se mueven de lado a lado como resultado del movimiento flagelar, sin embargo no reflejan con exactitud el movimiento flagelar, además debe considerarse que cuando el espermatozoide se encuentra en el lumen del oviducto, sus movimientos son circulares, lo cual le permite abarcar todo el espacio en forma tridimensional, mientras que al colocar el semen en una superficie plana como el de la cámara Leja, los espermatozoides hipermotiles tienden a moverse en círculos debido a la asimetría del movimiento flagelar que se realiza usualmente en un lado del flagelo. Si los espermatozoides tienen un movimiento extremadamente asimétrico, entonces los movimientos son circulares en las laminillas utilizadas, ya que no es una superficie comparable al oviducto de las hembras, tal como lo reporta Suarez (2008).

Finalmente se debe considerar que la hipermotilidad al requerir un veloz influjo de calcio causado por la quimiotaxis del flujo folicular (Tuma, 2005), pudo no haberse presentado debido a que bajo condiciones *in vitro* el incremento de calcio no fue significativo al mezclar el semen, mientras que en las muestras homoespermáticas no hubo ningún factor que pudiera provocarla.

A pesar de no haberse encontrado diferencias entre la motilidad de los espermatozoides provenientes de semen homoespermático y heteroespermático, la motilidad es fundamental para el espermatozoide y está relacionada con el estatus energético del mismo (Contria *et al.*, 2010). Sin embargo, esta no es sinónimo de

capacidad fecundante, ya que refleja únicamente una de las funciones del espermatozoide, que es la actividad flagelar, mientras que otras estructuras espermáticas (acrosoma, membrana espermática) también intervienen en el proceso de la fertilización. Por tanto, a pesar de ser indispensable para la fertilización, no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, debido fundamentalmente a la valoración subjetiva de dicho parámetro (Canorio, 2008).

Cabe mencionar que aún y cuando el semen de los toros que se elijan para la IA sea de buena calidad, cumpliendo con los parámetros establecidos de viabilidad, motilidad y concentración después de la descongelación, es muy importante el manejo que se le da al semen por parte del inseminador, el estado en que se encuentra la vaca receptora y el momento adecuado para realizar el procedimiento (Rodríguez-Hernández *et al.*, 1995; Marini *et al.*, 2010). En este sentido no se puede dejar de lado que lo que ocurre con el semen dentro del tracto reproductor de la hembra no depende de nosotros y el semen que ha pasado por el proceso de congelación-descongelación reacciona de distintas maneras. Gil *et al.* (2008) demostraron que utilizando pajillas de semen congelado de toros para IA, aproximadamente el 10% de ellos tenía atracción quimiotáctica hacia gradientes de fluido folicular, demostrando al igual que Oliveira *et al.* (1999) que existen subpoblaciones que reaccionan quimiotacticamente tanto al fluido folicular como al fluido del oviducto, por lo que el efecto de la hembra como tal puede ejercer diferente respuesta y por lo tanto, ayudar a mejorar el porcentaje de preñez. De hecho actualmente se sabe que los factores quimiotácticos (principalmente progesterona; Villanueva *et al.*, 1995; Lishko *et al.*, 2011) que modifican las propiedades de flexión del flagelo para redirigir a los espermatozoides al gameto femenino, es dependiente de calcio extracelular, sin embargo no depende de la concentración de calcio como tal sino del flujo iónico rápido a través de vías alternativas (Tuma, 2005; Wood *et al.*, 2005).

Es bien sabido que los espermatozoides una vez que están en el tracto reproductor de la hembra se alojan en el istmo del oviducto para llevar a cabo el proceso de capacitación, y ella permite la liberación de los espermatozoides competentes para que puedan llegar al útero y se seleccionan los espermatozoides de mayor calidad (Talevi y Gualtieri, 2001). Por lo anterior el proceso de capacitación

es también uno de los factores más importantes para el éxito reproductivo, ya que si el semen de un macho tiene una capacitación rápida a diferencia de otro y se insemina en un momento cercano a la ovulación, este podría tener más ventaja sobre los espermatozoides de capacitación lenta o atrasada una vez que llegan al sitio de fertilización. Parrish y Foote (1985) reportan en conejos que los machos más fértiles tienden a tener más enzimas acrosómicas, lo cual supondría una mayor ventaja sobre los machos menos fértiles suponiendo que ambos resistieran de igual manera la congelación.

La evaluación de la motilidad es por lo tanto, solo una parte de todo lo que se debería tomar en cuenta para lograr una fertilización exitosa, se pueden tomar en cuenta otros análisis que si bien, a veces no están a nuestro alcance pueden ayudar a evaluar la calidad del semen de una manera más funcional.

Aunque se sabe que la fertilidad de los toros es una característica que se hereda a sus crías, la importancia de este estudio radica en que si los toros de baja fertilidad logran aumentarla y tienen ciertas características que a los ganaderos les interesen (mayor producción lechera, mayor ganancia de peso con respecto al tiempo), pueden lograr obtener crías con esas características y al mismo tiempo aumentar la diversidad genética que tienen en sus hatos. Esto a la larga los favorece ya que pueden reforzar a los individuos con los que cuentan e incluso en un futuro permitir la monta natural con sus mismos animales, evitando una tendencia a la endogamia.

## 9. Conclusiones

En base en lo logrado en este estudio, no se encontraron diferencias significativas en las respuestas de influjo de calcio *in vitro* evaluadas en las muestras de semen homoespermático descongelado al compararse con el semen heteroespermático descongelado de toros de las razas Holstein y Jersey con el mismo nivel de calidad evaluada previamente a la congelación.

En base a los resultados y a la propuesta de que existen efectos fisiológicos y de influjo de calcio inducidos por la confrontación de espermatozoides de dos o más toros durante el fenómeno de competencia espermática, recomendamos hacer más pruebas para mostrar porqué se logra aumentar la fertilidad al utilizar pajillas heteroespermáticas. De igual manera se sugiere que se lleven a cabo experimentos similares con semen fresco y con toros que tengan una fertilidad distinta entre ellos, para evaluar si la competencia espermática favorece al de menor calidad seminal, evitando de esta forma el posible efecto que tienen los factores asociados a la congelación del semen.

Por otra parte se evaluó la motilidad durante la competencia espermática mediante dos métodos: el subjetivo y por medio de un método computarizado CASA.

En cuanto a los parámetros de motilidad observados mediante el método subjetivo, se observó una ligera tendencia al aumento de la motilidad una vez que se mezclaban los espermatozoides de los dos toros, mientras que mediante el método CASA no se obtuvieron diferencias al comparar las muestras de espermatozoides de manera individual y al mezclar los espermatozoides de dos toros antes o después de la descongelación.

Es preferible utilizar métodos computarizados (CASA) en lugar del método subjetivo para la evaluación de parámetros espermáticos, ya que proporcionan un valor más objetivo y real del movimiento y de la velocidad de los espermatozoides, al mismo tiempo que permiten evaluar una gran cantidad de muestras de manera repetible.

De la misma manera no se encontraron indicios de hipermotilidad en pajillas homoespermáticas, mezclas precongelación y mezclas postcongelación.

## 10. Bibliografía

- ❖ Aceves GJM, Yescas LR, Flores RR, Reyna GJR, Ortiz EV, Peinado CME. Determinación de magnesio sérico en ganado bovino de carne en agostadero en los Municipios de Aconchi, Banamichi, Huépac y San Felipe de Jesús, en el Estado de Sonora. XXXII Congreso Nacional de Buiatría. 14-16 ago 2008, Boca del Río, Veracruz.
- ❖ Anderson MJ, Dixson AF. Motility and midpiece in primates. *Nature*, 2002; 416-496
- ❖ Arteaga CML, Martínez-Gómez M, Guevara-Guzmán R, Hudson R. Comunicación química en mamíferos domésticos. *Veterinaria México*. 2007; 38 (1): 105-123
- ❖ Baker R. Sperm Wars: The Science of Sex. Diane Pub Co. U.S.A. 1996 (319).
- ❖ Baracaldo MI, Barth AD, Bertrand W. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine. International Veterinary Information Service. Ithaca, N.Y.* 2007. 2007.
- ❖ Bavera GA. Inseminación artificial. Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC. 2005.  
([http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/27-inseminacion\\_artificial.pdf](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/27-inseminacion_artificial.pdf))
- ❖ Beatty RA, Stewart DL, Spooner RL, Hancock JL. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on fertility of individual bull semen. *J. Reprod. Fert.* 1976; 47: 377-379.

- ❖ Breuel KF, Spitzer JC, Thompson CE, Breuel JF. First-service pregnancy rate in beef heifers as influenced by human chorionic gonadotropin administration before and/or after breeding. *Theriogenology*. 1990; 34:139-143
  
- ❖ Brogliatti G. Inseminación artificial a tiempo fijo. *Rev. Brangus*. 2003; 25(46):72-74. ([http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/21-ia\\_tiempo\\_fijo.htm](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/21-ia_tiempo_fijo.htm))
  
- ❖ Canorio PNM. Criocapacitación del espermatozoide de *alpaca* (*Lama pacos*). Tesis para obtener el grado de Magíster en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Unidad de Postgrado. Lima, Perú. 2008 (102)
  
- ❖ Contreras GJ, Córdoba AA, Peretti AV. La elección femenina. *Ciencias*. 2005; 77:40-47
  
- ❖ Contria A, Valorzb C, Faustinic M, Wegherb L, Carluccioa A. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 2010; 74(3): 424-435.
  
- ❖ Cooner SJ, Lefievre L, Kirkman-Brown GSM, Michelangeli F, Publicover SJ, Barratt CLR. Physiological and Proteomic Approaches to understanding Human Sperm Function: Prefertilization Events. En *The Genetics of Male Infertility*. Ed. Douglas T. Carrell. 2007: 77-98.
  
- ❖ Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*. 1997; 18 (4): 461-468.

- ❖ Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. Review:  $\text{Ca}^{2+}$ -stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*. 2009; 138: 425-437.
  
- ❖ Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*. 2006; 131:977-988.
  
- ❖ Darszon A. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología*. 2007; 14.
  
- ❖ Dewsbury A, Hartung TG. Copulatory behavior and differential reproduction of laboratory rats in a two-male, one-female competitive situation. *Animal Behavior*. 1980; 95-102.
  
- ❖ Dixson AF, Anderson MJ. Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiology & Behavior*. 2004; 83:361-371.
  
- ❖ Donoghue AM, Sonstegard TS, King LM, Smith EJ, Burt DW. Turkey sperm mobility influences paternity in the context of competitive fertilization. *Biology of Reproduction*. 1999; 61: 422-427
  
- ❖ Dziuk PJ. Factors That Influence the Proportion of Offspring Sired by a Male Following Heterospermic Insemination. *Animal Reproduction Science*. 1996; 43: 65–88.
  
- ❖ Flint AF, Chapman PL, Seidel JGE. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted sperm in cattle. *J. Anim. Sci*. 2003; 81: 1814-1822

- ❖ Florenzano R. Charles Darwin y el proceso de selección sexual. *Gaceta de Psiquiatría Universitaria*. 2009; 5(2): 212-223
  
- ❖ Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 2002; 80:1-10
  
- ❖ Gagnon C, De Lamirande E. Controls of sperm motility. En *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Ed. C. de Jonge y C. Barratt. Cambridge, University Press. 2006 (108-133).
  
- ❖ Gil PI, Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Sánchez R, Giojalas LC. Chemotactic response of frozen-thawed bovine spermatozoa towards follicular fluid. *Animal Reproduction Science*. 2008; 108 (1): 236-246.
  
- ❖ Gilbert SF. Fecundación: El comienzo de un nuevo organismo. En *Biología del desarrollo*. 7 ed. Ed. Medica Panamericana. 2003 (204-227) P.p. 204-227
  
- ❖ Gillis JM, Gaill P. Measurements of Ca<sup>2+</sup>, with the diffusible Fura-2AM: Can some potential pitfalls be evaluated? *Biophysical Journal*. 1994; 67: 476-477.
  
- ❖ Ginsberg JR, Huck UW. Sperm Competition in Mammals. *Trends in Ecology and Evolution*. 1989; 4: 74–79.
  
- ❖ González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA, Guzmán-Grenfell AM. Stimulation of voltage- dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*. 2002; 408: 205-210.
  
- ❖ Gutiérrez G, Riveros JC. Aspectos conductuales de la competencia de esperma en aves. *Revista Latinoamericana de Psicología*. 2003; 35:67-76.

- ❖ Grynkiewicz G, Poenie M; Tsien RY. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *The journal of Biological chemistry*. 1985; 260:3440-3450.
- ❖ Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $\text{Ca}^{2+}$  and not cAMP. *Development Biology*. 2002; 250:208–217.
- ❖ Hosken DJ, Ward PI. Experimental evidence for testis size evolution via sperm competition. *Ecology Letters*. 2001; 4:10-13.
- ❖ Kelly DA. Anatomy of the Baculum–Corpus Cavernosum Interface in the Norway Rat (*Rattus norvegicus*), and Implications for Force Transfer During Copulation. *Journal of Morphology*. 2000; 244:69-77
- ❖ Kilgallon SJ. Human sperm competition: Can content of sexually explicit images influence the quality of ejaculates?. *School of Animal Biology. University of Western Australia*. 2004; 1-75.
- ❖ King SM, Patel-King RS. Identification of a  $\text{Ca}(2+)$ -binding light chain within *Chlamydomonas* outer arm dynein. *Journal of Cell Science*. 1995; 108: 3757-3764.
- ❖ Lenz RW, Kjelland ME, VonderHaar K, Swannack TM, Moreno JF. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *American Society of Animal Science*. 2011; 89: 383-388.
- ❖ Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal  $\text{Ca}(2+)$  channel of human sperm. *Nature*. 2011; 471 (7338): 387-391.

- ❖ Lucio A, Gutiérrez-Ospina G. Spermatic competition. The males also decide when, how much, and with whom. *Universidad Nacional Autónoma de México. Gaceta Biomédicas, octubre. 2006.*
  
- ❖ Marini PR, Galassi I, Di Masso RJ. Relación entre el lapso de detección del cello-inseminación y el porcentaje de preñez en vacas lecheras. *InVet. 2010; 12(1):69-73*
  
- ❖ Martínez LNE. Bases de la competencia masculina en la mariposa *Eumaeus toxea* Godart (Insecta: Lepidoptera:Lycaenidae). *Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2006 (72).*
  
- ❖ Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *PNAS 2004; 101(4):16501-16506.*
  
- ❖ Mizuno K, Padma P, Konno A, Satouh Y, Ogawa K, Inaba K. A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca (2+)-dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biology of the Cell. 2009; 101 (2):91-103.*
  
- ❖ Mortimer ST. CASA-Practical aspects. *Journal of Andrology. Julio/ Agosto 2000; 515-524.*
  
- ❖ Nelson LD, Pickett BW, Seidel JGE. Effect of Heterospermic Insemination on Fertility of Cattle. *Journal of Animal Science. 1975; 40:1124-1129.*
  
- ❖ Neri VPC, Torres FV, González MMT. Sensibilidad de los canales de calcio dependientes de voltaje al pH intracelular en el espermatozoide humano capacitado. Efecto modulador del AMPc. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2009; 1(3):102-108.*

- ❖ Ocaña QJM, Moreno MM, Pinedo MM, Ortega MMA, Rodero FA. Efecto del método de selección de esperma congelado de bovino sobre los índices de fecundación y división *in vitro*. *Archivos de Zootecnia*. ISSN 0004-0592. 2009; 46(174):153-158.
  
- ❖ Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1999; 115: 23-27
  
- ❖ Olivera M, Ruíz T, Tarazona A, Giraldo C. Ensayo: El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006; 19(4): 426-436.
  
- ❖ Overton MW. Semen sexado: resultados y rentabilidad. XXXII Congreso Nacional de Buiatría. 14-16 ago 2008, Boca del Río, Veracruz ([http://www.ammveb.net/2/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=67](http://www.ammveb.net/2/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=67))
  
- ❖ Parker GA. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: Sperm competition and sexual selection (Birkhead TR, Møller AP, eds). San Diego, California: Academic Press. 1998; 3–54.
  
- ❖ Parrish JJ, Foote RH. Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochrome-labeled spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1985; 33: 940-949.
  
- ❖ Pizzari T, Worley K, Burke T, Froman DP. Sperm competition dynamics: ejaculate fertilising efficiency changes differentially with time. *BMC Evolutionary Biology*. 2008; 8:332

- ❖ Pound N, Gage MJG. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptative ejaculate adjustment. *Animal Behavior*. 2004; 68:819-823.
  
- ❖ Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *PNAS*. 2003; 100 (25): 14869-14874.
  
- ❖ Quintero MA, Rubio GJ. Evaluación de la calidad espermática en toro mediante tecnología informática. *Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. Capítulo LVIII*. 2008; 707-714.
  
- ❖ Ren D, Navarro B, Pérez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 2001; 413:603-609.
  
- ❖ Rodríguez-Hernández T, Espinoza J, Verde O. Efecto del momento de Inseminación Artificial, masaje clitórico, temperatura rectal y otros factores sobre la preñez en bovinos. *Zootecnia Tropical*. 1995; 13(2):129-149.
  
- ❖ Rodríguez PJA, Castro RGV, Rodríguez CKJ. Selección de pareja y comportamiento sexual de los Guppys (*Poecilia reticulata*). *Orinoquia*. 2005; 9 (2): 38-44.
  
- ❖ Saacke RG. La fertilidad depende de lo que ocurre a los espermatozoides dentro de la vaca. Universidad de Mississippi. Reproducción, Artículos libres. Venezuela bovina. 2002. ([http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/18-fertilidad\\_dependede\\_espermatozoides\\_dentro\\_de\\_vaca.htm](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/18-fertilidad_dependede_espermatozoides_dentro_de_vaca.htm))

- ❖ Sakato M, Sakakibara H, King SM. *Chlamydomonas* Outer arm dynein alters conformation in response to  $Ca^{2+}$ . *Molecular Biology of the cell*. 2007; 18 (9): 3620-3634.
  
- ❖ Salazar HM. Ventajas de la fertilización in vitro en caballos. *UNAM Comunidad*. 2004; 15-16.
  
- ❖ Sánchez I, Mar C, Castilla JA, Marcos M, Martín I, Galán A, Jiménez MI, Moreno JM, Serrano MG, García-Cobaleda I, Aulesa C, Lozano V, Sánchez CJM. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité Científico. Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida. Documento C. Fase 3. Versión 4. *Documentos de la SEQC*. 2009; (23-26).
  
- ❖ Schmitt EJP, Barros CM, Fiels PA, Fiels MJ, Díaz T, Kluege JM, Thatcher WW. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first wave follicle with human chorionic gonadotropin of an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci*. 1996; 74:1074-1083.
  
- ❖ Stewart DL, Spooner RL, Bennett GH, Beatty RA, Hancock JL. A second experiment with heterospermic insemination in cattle. *J. Reprod. Fert*. 1974; 36: 107-116
  
- ❖ Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*. 2005; 25(2):28-32
  
- ❖ Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction update*. 2008; 14(6):647-657.
  
- ❖ Talevi R, Gualtieri R. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biology of Reproduction*. 2001; 64:491-498.

- ❖ Tanner CA, Rompolas P, Patel-King RS, Gorbatyuk O, Wakabayashi K, Pazour GJ, King SM. Three members of the LC8/DYNLL family are required for outer arm dynein motor function. *Molecular Biology of the cell*. 2008; 19(9): 3724-3734.
- ❖ Tuma RS. Sperm's quick calcium response. *The Journal of Cell Biology*. 2005; 169 (5):701.
- ❖ Valergakis GE, Arsenos G, Banos G. Comparison of artificial insemination and natural service cost effectiveness in dairy cattle. *Animal*. 2007; 1:293-300.
- ❖ Villanueva DC, Arias MJ, Bermejo ML, Vadillo OF. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertility and Sterility*. 2005; 64 (6):1183-1188.
- ❖ Wood CD, Nishigaki T, Furuta T, Baba SA, Darszon A. Real-time analysis of the role of Ca<sup>2+</sup> in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *The Journal of Cell Biology*. 2005; 169 (5):725-731.
- ❖ Woodall PF, Johnstone IP. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 1998; 82:603-609.
- ❖ Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. CATSPER Channel-mediated Ca<sup>2+</sup> entry into mouse triggers a tail-to-head propagation. *Biology of Reproduction*. 2007; 77:551-559.
- ❖ Yamamoto Y, Sofikitis N, Mio Y, Miyagawa I. Influence of sexual stimulation on sperm parameters in semen samples collected via masturbation from normozoospermic men or cryptozoospermic men participating in an assisted reproduction programme. *Andrologia*. 2000; 32:131-138.

- ❖ Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Review. Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65:3446-3457.
- ❖ Zemjanis R. Reproducción animal. Diagnóstico y técnicas terapéuticas. Limusa-Wiley, S. A. 1966: 163.
- ❖ [http://en.wikipedia.org/wiki/Fura-2-acetoxymethyl\\_ester](http://en.wikipedia.org/wiki/Fura-2-acetoxymethyl_ester)
- ❖ <http://www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/res/icg/fura.html>
- ❖ <http://www.fura-2.com>
- ❖ <http://www.genusbreeding.co.uk/content.output/79/81/Fertility/Fertility/Fertility%20Plus.msp>
- ❖ [www.sciencerevolution.net](http://www.sciencerevolution.net)
- ❖ [www.bioscience.org](http://www.bioscience.org)