



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal

Estudio sobre el estado de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides electroeyaculados y epididimales de ovinos domésticos (*Ovis aries*) en fresco y al descongelado.

TESIS

Que para optar por el grado de: Maestro en Ciencias de la Salud y de la Producción
Animal

Presenta:

MVZ. Jorge Alberto Ramos Lemus

Tutor principal

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez.

UAM-XOCH

Comité tutorial

Dr. José Alfredo Medrano Hernández.

FES-C

Dr. Oscar Gutiérrez Pérez.

FMVZ-UNAM

Ciudad de México Febrero 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres:

Bonifacio Ramos Maciel y María Trinidad Lemus Rodríguez

A mis hermanos:

Víctor Manuel, Carlos, Enrique y Omar Ramos Lemus

A Patricia Sánchez López

A mi mamá Glafi y mi madrina María Lemus Rodríguez

Agradecimientos

A mi director de tesis y amigo, Alejandro Ávalos Rodríguez, por su apoyo y por todas sus enseñanzas.

A mis asesores, José Alfredo Medrano Hernández y Oscar Gutiérrez Pérez, por su apoyo, sugerencias y recomendaciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al CONACYT por el apoyo recibido para la realización de mis estudios.

A Jorge Antonio Gonzáles Santos y al personal del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco por su apoyo para la realización de éste proyecto

Resumen.

La crioconservación permite el almacenamiento de espermatozoides a largo plazo, es una técnica ampliamente utilizada, que ocasiona daños parciales e irreversibles que conducen en última instancia a una reducción de la viabilidad y a una baja de fertilidad después de la Inseminación Artificial. Los espermatozoides de los mamíferos deben residir en el tracto reproductor femenino por un período obligatorio de tiempo para adquirir la capacidad de fertilización en un proceso conocido como capacitación, seguido por la reacción acrosomal, que consiste en la liberación de enzimas hidrolíticas que ayudan a los espermatozoides a penetrar a través de la zona pelúcida y llegar al oolemma y lograr la fertilización. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la ocurrencia de cambios en la membrana plasmática de espermatozoides del borrego doméstico, obtenidos mediante electroeyaculación y lavados de cola de epidídimo tanto en fresco como al descongelado durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal, así como detectar la ocurrencia y temporalidad de la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática. Para la realización del presente trabajo se utilizó el semen de 14 machos en edad adulta (entre tres y cinco años), divididos en dos grupos de siete individuos para la evaluación de semen obtenido mediante electroeyaculación y siete para la evaluación de semen epididimal, en los que se evaluó la capacitación espermática mediante el ensayo de clortetraciclina, reacción acrosomal mediante la tinción azul brillante de coomassie y pérdida de la asimetría con Anexina V, en fresco y al descongelado tras la congelación en el medio tris fructosa y con 6% de glicerol. Se indujo la capacitación con heparina y reacción acrosomal con progesterona *in vitro*. Al comparar el semen electroeyaculado y epididimal no se observaron diferencias significativas, aunque tras evaluar el proceso de criopreservación e incubación si se observaron diferencias significativas. Los resultados permiten concluir que con ambos métodos de recolección es posible obtener espermatozoides de carnero de buena calidad para la inseminación artificial.

Palabras claves: capacitación, reacción acrosomal, asimetría membranal, epidídimo, electro eyaculado

Summary.

Cryopreservation allows storage of long term sperm, it is a widely used technique, causing partial irreversible damage which can lead to a reduction in viability and a low fertility after artificial insemination. Mammalian sperm must reside in the female reproductive tract for a required period of time to acquire fertilizing capacity in a process known as capacitation, followed by the acrosome reaction, that is the release of hydrolytic enzymes that help the sperm to penetrate the zona pellucida and reach the oolemma and achieve the fertilization. The aim of this work was to study the occurrence of changes in the plasma membrane of sperm of domestic sheep, obtained by electroejaculation and washed tail epididymis both fresh as at thawed during capacitation processes and acrosome reaction, also as to detect the occurrence and timing of the loss of plasma membrane asymmetry. To carry out this work the semen of 14 males in adulthood (between three and five years) were used, divided into two groups of seven individuals for semen evaluation obtained by electroejaculation and seven to evaluate epididymal sperm, in which sperm capacitation was evaluated by chlortetracycline assaying, acrosome reaction by Coomassie Brilliant Blue staining and the loss of asymmetry by Annexin V, fresh and thawed, after freezing in the medium tris fructose and 6% glycerol. Was induced *in vitro* the capacitation by heparin and the acrosome reaction by progesterone. Comparing electroejaculation and epididymal sperm no significant differences were observed, but after evaluating the cryopreservation process and incubation if significant differences were observed. The results show that both methods of collection is possible to obtain sperm from sheep of good quality for artificial insemination.

Keywords: capacitation, acrosome reaction, membrane asymmetry, epididymis, electroeyaculation.

Indice

Resumen	IV
Abstract	V
Indice	VI
Indice de gráficas	VII
Indice de figuras	VII
Indice de esquemas	VII
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1. Anatomía reproductiva del macho	4
2.2. Espermatogénesis	5
2.3. Estructura espermática	5
2.4. Maduración epididimal	6
2.5. Superficie espermática	7
2.6. Plasma seminal	8
2.7. Transporte espermático	11
2.7.1. Defensas vaginales	11
2.7.2. Transporte espermático a través del cérvix	11
2.7.3. Transporte espermático a través del útero	12
2.7.4. Almacenamiento espermático en el reservorio oviductual.....	13
2.7.5. Acción muscular y ciliar en el transporte de ovocitos	13
2.8. Modificaciones de la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimaria	14
2.9. Membrana plasmática del espermatozoide eyaculado	15
2.10. Membrana plasmática del espermatozoide maduro	15
2.10.1. Lípidos	15
2.10.2. Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide.	16
2.10.3. Asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide	17
2.11. Capacitación espermática	17
2.11.1. Capacitación Espermática Definiciones y observaciones generales	17
2.11.2. Características generales de la capacitación:	18
2.11.3. Regulación de la fosforilación	19
2.11.4. Potencial de membrana	20
2.11.5. pH	21
2.11.6. Canal dependiente de voltaje H ⁺	22
2.11.7. Fluidez y permeabilidad membranal	24
2.12. Movilidad espermática	25
2.13. Inducción de la capacitación	27
2.14. Criocapacitación	28
2.15. Reacción Acrosomal	29
2.16. Reconocimiento espermático de la zona pelúcida	32
2.16.1. La membrana espermática durante la reacción acrosomal	33
2.16.1.1. Proteínas G	33
2.16.1.2. Inducción de la reacción acrosomal	33
2.16.1.3. Unión y fusión con el oolema	34

VII

Hipótesis	36
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
3. Material y métodos	37
3.1. Obtención de semen por electroeyaculación	38
3.2. Obtención de los espermatozoides epididimales	38
3.3. Evaluación espermática básica.....	39
3.4. Congelación	40
3.5. Descongelación	41
3.6. Preparación del medio capacitante	41
3.7. Capacitación <i>in vitro</i>	41
3.8. Prueba de fluorescencia CTC	41
3.9. Inducción de la reacción acrosomal	42
3.9.1.- Evaluación de la reacción acrosomal mediante Azul Brillante de Coomassie (BBC)	43
3.10. Prueba de translocación de fosfatidilserina	44
4. Resultados	45
5. Discusión	54
6. Conclusiones	61
7. Bibliografía	62

Índice de gráficas

Gráfica 1	45
Gráfica 2	46
Gráfica 3	47
Gráfica 4	48
Gráfica 5	49
Gráfica 6	50
Gráfica 7	51
Gráfica 8	52
Gráfica 9	53

Índice de figuras

Figura 1	40
Figura 2	42
Figura 3	43
Figura 4	44

Índice de esquemas

Esquema 1	37
-----------------	----

1.- Introducción

En las últimas décadas, la diversidad genética de los animales de granja ha disminuido rápidamente, debido principalmente a los cambios en las demandas del mercado y a la intensificación de la agricultura. El aumento de la conciencia sobre la reducción de la diversidad genética ha promovido esfuerzos globales para la conservación de las razas de animales de granja por varias razones, por ejemplo, mantener los genes potencialmente útiles y las combinaciones de estos, para aprovechar la heterosis y superar la selección sin variación, así como por razones culturales, de investigación y sobre la seguridad alimentaria. Se han propuesto dos tipos de estrategias de conservación, *in situ* y *ex situ*. En la conservación *in situ*, la raza es mantenida dentro del sistema de producción ganadera, en su medio ambiente. La conservación *ex situ in vivo* es la salvaguarda de animales vivos en los zoológicos, parques naturales, granjas experimentales u otros centros especializados. La conservación *ex situ in vitro* es la conservación de material genético en forma haploide (semen y ovocitos), diploide (embriones) o secuencias de ADN. En las últimas décadas en la industria ganadera, los programas de conservación *ex situ in vitro* de los recursos genéticos han centrado su interés en la criopreservación de gametos y embriones, con el fin del alargamiento de la vida útil de la genética de los individuos en programas de reproducción incluso después de la muerte (Mara et al., 2013).

Aunque la inseminación artificial (IA), ha sido utilizada rutinariamente durante muchos años, definitivamente esta merece especial atención debido a su relativa simplicidad y relevancia económica. Mientras que los árabes fueron los primeros en reportar sobre la IA en caballos alrededor de 1322, tuvimos que esperar hasta 1922, para que Ivanoff pusiera en marcha esquemas de procedimientos de IA para ser utilizados en caballos, vacas, ovejas y cerdos (Estany et al., 2010). Por otra parte Phillips y Lardy en 1939 fueron los primeros en utilizar yema de huevo para proteger a los espermatozoides de toro del choque térmico durante el enfriado. Salisbury et al., en 1941 mejoraron los medios con el uso de citrato de sodio y yema de huevo, permitiendo el uso del semen a 5 °C durante un máximo de tres días. Polge y colaboradores en 1949 fueron los primeros en congelar exitosamente semen de aves y toro mediante el uso de glicerol en el medio extensor (Ombelet et al., 2015).

La crioconservación es una de las biotecnologías más importantes a disposición de la industria animal ya que permite el almacenamiento a largo plazo y la diseminación eficiente de la genética (Leahy et al., 2010). Es una técnica ampliamente utilizada, pero que ocasiona daños parciales irreversibles. Esto se ha atribuido al choque frío, estrés oxidativo, modificaciones membranales, toxicidad del crioprotector, formación intracelular de cristales de hielo, y fluctuaciones en la presión osmótica a las que los espermatozoides se exponen durante todo el proceso. Posteriormente tales lesiones pueden conducir a una reducción de la motilidad espermática y a una baja de fertilidad después de la inseminación artificial (Jafaroghli et al., 2011). Particularmente el proceso de congelación-descongelación causa un significativo daño subletal en los espermatozoides reduciendo la condición heterogénea de la población espermática, de tal manera que la fertilidad de las ovejas se ve reducida después de la inseminación cervical, incluso si se utiliza una gran cantidad espermatozoides de carnero congelados-descongelados móviles y viables (Leahy et al., 2010).

A principios de los años 50, Chang y Austin informaron de forma independiente que los espermatozoides de mamíferos deben residir en el tracto reproductor femenino por un período obligatorio de tiempo para adquirir "la capacidad de fertilización" en un proceso conocido como capacitación. Este descubrimiento fue esencial para el desarrollo de la fertilización *in vitro* de los mamíferos, la cual se logró por Chang ocho años más tarde (Buffone et al., 2014). Demostrada inicialmente en conejos en 1959, la capacitación *in vitro*, en la mayoría de las especies de mamíferos se logra mediante incubación de los espermatozoides en un medio simple que imita al medio oviductal (Coy et al., 2012). Bracket et al, en una serie de informes demostraron que la breve exposición de semen bovino lavado en medios de alta fuerza iónica (HIS) inducen en los espermatozoides la suficiente capacitación para fertilizar *in vivo* ovocitos bovinos maduros (Parrish et al., 2014). En 1992, Cox et al., reportaron que el semen de carnero incubado con heparina presenta una mayor ocurrencia de reacción acrosomal y mayores porcentajes de fertilidad que el semen sin este tratamiento (Merino-González et al., 2003).

Por tal motivo la evaluación del estado de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides eyaculados y epididimales en fresco y descongelados, resulta en una herramienta para evaluar el estado en el que estos se encuentran durante el proceso de

criopreservación, que va desde la recolección, hasta su posible estadio *in útero*. Debido a que los espermatozoides pueden ser utilizados en las diferentes técnicas de reproducción asistida disponibles para lograr un mejor desempeño reproductivo, tales como la ovulación múltiple y transferencia de embriones, la producción de embriones *in vitro* y la criopreservación de semen y embriones. La producción de embriones *in vitro* cobra importancia gracias al potencial que representa producir embriones ovinos, incluso durante la temporada no reproductiva, a través de la maduración y las técnicas de fertilización *in vitro*, acortando el intervalo generacional. Los corderos de este modo se pueden producir a pesar de que las ovejas son de reproducción estacional (Nts'emelo et al., 2010).

2.- Marco Teórico

2.1.- Anatomía reproductiva del macho

La anatomía del órgano reproductor en los ovinos es similar a la de otros rumiantes. La uretra peneana está rodeada por el cuerpo esponjoso del pene en toda su longitud y esta termina como un apéndice vermiforme. La estructura más prominente del pene es el cuerpo cavernoso, éste se compone de un espacio cavernoso soportado por trabéculas fibrosas. Este tejido cavernoso está situado en la superficie dorsal y rodea parcialmente al cuerpo esponjoso. Todo el pene está rodeado por la túnica albugínea. Los dos músculos retractores del pene apareados surgen de las vértebras coccígeas y pasan alrededor del ano para convertirse en dos músculos distintos que se adhieren a la superficie ventrolateral del pene en la curvatura distal de la flexura sigmoidea. El pene normalmente se mantiene curvado en forma de S (flexura sigmoidea) excepto durante la erección y la eyaculación gracias al músculo retractor del pene (Pugh et al., 2012).

El escroto es pendulante, contiene a los testículos y los mantiene suspendidos fuera del cuerpo. El escroto está compuesto por ondulaciones de la epidermis. Debajo de esta piel se encuentra un plexo rico en vasos sanguíneos, linfáticos y glándulas sudoríparas. El dartos, es una capa de músculo liso, que está conectado a las túnicas vaginales del testículo por la fascia escrotal, compuesta por tejido conjuntivo. Las túnicas vaginales son prolongaciones del peritoneo y forman una cubierta protectora sobre los testículos. El espacio entre las dos capas de la túnica vaginal (parietal y visceral) que se refleja alrededor del testículo, normalmente contiene una pequeña cantidad de líquido peritoneal. El septo escrotal, compuesto principalmente por el músculo dartos, que divide al escroto en dos mitades (Pugh et al., 2012).

El testículo en sí está rodeado por una capa gruesa de tejido conectivo fibroso conocido como la túnica albugínea. El parénquima del testículo se compone por los túbulos seminíferos que contienen células germinales y células de soporte (Células de Sertoli). Los túbulos seminíferos desembocan en la rete testis, que a su vez es drenada por 10 a 12 conductos eferentes, éstos ductos desembocan en la cabeza del epidídimo, que se encuentra de forma dorsal craneolateral al testículo. El cuerpo del epidídimo se curva alrededor de la parte lateral de los testículos y termina caudomedialmente, como la cola

del epidídimo, esta estructura tubular se refleja dorsalmente y se convierte en el conducto deferente (Pugh et al., 2012).

Los ovinos presentan un gran complemento de glándulas sexuales accesorias. Las pequeñas glándulas bulbouretrales se localizan caudalmente en la cavidad pélvica a cada lado de la uretra pélvica y pueden ser palpadas por vía rectal. Estos animales también presentan glándulas vesiculares lobuladas, que difunden hacia la próstata, y una ampliación de los conductos deferentes conocida como la ampolla (Pugh et al., 2012).

2.2.- Espermatogénesis

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis, es generado a través de procesos sucesivos de mitosis, meiosis, y fases postmeióticas dentro de los túbulos seminíferos en el testículo. Durante la fase mitótica, las células madre de la línea germinal experimentan una serie de divisiones celulares que amplían la población de espermatogonias. La primera fase meiótica comienza con la última fase S del ciclo celular y culmina en la segunda fase meiótica que se produce rápidamente sin la replicación del ADN para producir espermátides haploides. Los espermatozoides son formados durante la fase postmeiótica, que se caracteriza por una amplia remodelación de las espermátidas en espermatozoides mediante la formación del acrosoma, condensación del núcleo, desarrollo flagelar y pérdida de citoplasma. Estos eventos dan lugar a la producción de una célula espermática altamente diferenciada en estructura y función. Este desarrollo lo hace capaz de fusionarse con un óvulo para iniciar la próxima generación. El espermatozoide tiene una pequeña cantidad de citoplasma y carece de la mayoría de los organelos comunes en las células somáticas (Toshimori et al., 2015).

La espermatogénesis en ovinos requiere aproximadamente el 49 a 60 días desde el inicio de la división de las células germinales hasta que los espermatozoides se liberan de los túbulos seminíferos. Se requieren de otros 10 días a 2 semanas para que los espermatozoides pasen desde los túbulos seminíferos y través del epidídimo (Pugh et al., 2012).

2.3.- Estructura espermática

Los principales componentes del espermatozoide son la cabeza y el flagelo, unidos por la

pieza conectora o cuello. La cabeza contiene al núcleo, al acrosoma, y una pequeña cantidad de citoplasma, en el que las estructuras del citoesqueleto están minuciosamente organizadas. El núcleo contiene cromatina altamente condensada y está cubierto anteriormente por el acrosoma, vesícula citoplasmática contenida por una membrana que contiene enzimas hidrolíticas y moléculas necesarias para la fertilización. A partir de la pieza conectora (cuello), el flagelo se divide sucesivamente en la pieza media, pieza principal, y la pieza terminal. La pieza conectora contiene derivados centriolares y columnas segmentadas. El flagelo contiene un complejo central de microtúbulos que forman al axonema, rodeado por fibras densas externas que se extienden desde el cuello hasta la pieza principal. La pieza media contiene la vaina mitocondrial, una envoltura de mitocondrias en forma de hélice que rodea a las fibras densas externas y al axonema. La pieza principal representa la mayor parte de la longitud del flagelo, es definida por la presencia de una vaina fibrosa que rodea las fibras densas externas y al axonema. La pieza final es el segmento final y sólo contiene los microtúbulos del axonema. La cabeza y el flagelo están estrechamente rodeados por la membrana plasmática y contienen una escasa cantidad de citoplasma (Toshimori et al., 2015).

2.4.- Maduración epididimal

Durante la maduración, los espermatozoides pierden la mayor parte de su citoplasma y se someten a la condensación cromosómica, reduciendo su capacidad antioxidante endógena y aumentando su dependencia del ambiente extracelular (Fang et al., 2015). La maduración espermática es un proceso de múltiples pasos. Si bien es necesario el desarrollo de un patrón maduro de motilidad, este no es suficiente para hacer que un espermatozoide sea capaz de fertilizar. Algunos de los cambios de maduración como la motilidad pueden ser intrínsecos a la célula espermática y desarrollarse con el tiempo, sin embargo, otros como la capacidad para interactuar con el óvulo dependen del ambiente epididimal (Robaire et al., 2015).

Existen proteínas como como Arilsulfatasa (AS-A), componente del líquido de la cauda epididimal, que son adquiridas por el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, donde se une a la superficie de la cabeza del espermática. Esta enzima capaz de dispersar los complejos cumulus-ovocito, ayudando al espermatozoide a alcanzar al ovocito, en donde media la unión a la zona pelúcida (Rodrigues et al., 2013).

Estudios de espermatozoides del epidídimo co-incubados en cultivos celulares de epitelio epididimal han confirmado el papel del epidídimo en la promoción de la maduración espermática. En estos cultivos, espermatozoides de la cabeza epididimal fueron sometidos a cambios de maduración morfológica dirigida a la cabeza, estos cambios fueron acompañados por motilidad progresiva. Cultivos de espermatozoides inmaduros tomados de la cabeza o el cuerpo del epidídimo, en células de la cola del epidídimo no sólo aumentan su motilidad, sino que también incrementan su capacidad para unirse y atravesar a la zona pelúcida y colaboran en el desarrollo embrionario. Estos cambios de maduración son promovidos por factores andrógeno - dependientes de las células principales del epidídimo. Tanto *in vivo* como *in vitro*, las etapas finales del proceso de maduración espermática, dependerán del epidídimo (Robaire et al., 2015).

2.5.- Superficie espermática

Los espermatozoides tienen una morfología polarizada característica y su superficie está altamente diferenciada y subdividida en dominios regionales que difieren en composición y función. La diferenciación y segregación de la superficie espermática se establece durante la espermatogénesis. Se pretende que esta segregación es importante para prevenir el inicio prematuro de eventos tales como la adquisición de la motilidad, hipermotilidad, capacitación, reacción acrosomal, y la interacción espermatozoide-óvulo que debe ocurrir en el momento más apropiado durante la fertilización. Sin embargo, aun cuando una vez ya establecidas, algunas de estas moléculas que están secuestradas en estos dominios pueden ser redistribuidas dentro y entre los dominios definidos después de la liberación de espermátidas maduras en el lumen de los túbulos seminíferos (espermiación). Estos cambios provocan la mezcla selectiva y el acarreo de proteínas entre dominios, que eventualmente inducen interacciones coordinadas de proteínas y vías de señalización específicas que culminarán en los cambios funcionales (Toshimori et al., 2015).

En el epidídimo, los componentes espermáticos están protegidos por glicoproteínas de la superficie celular, de diversas maneras (por ejemplo, por residuos de ácido siálico). Los espermatozoides están protegidos de la aglutinación aunque estos están densamente empaquetados en el epidídimo y el conducto deferente. El ácido siálico expresado en la superficie espermática es capaz de enmascarar epítomos de las moléculas antigénicas del

espermatozoide, de esta manera los residuo de ácido siálico funcionan inhibiendo la aglutinación-cola con cola. Los residuos de ácido siálico son secretados activamente por las células epiteliales del epidídimo, y se unen a la superficie espermática durante la maduración. En carneros, la carga negativa superficial neta de los espermatozoides testiculares es baja pero se convierte en alta conforme éstos pasan a través del epidídimo, debido la carga negativa que el ácido siálico confiere sobre la superficie del espermatozoide maduro (Toshimori et al., 2009).

2.6.- Plasma seminal

El plasma seminal, es una secreción fisiológica de las glándulas del tracto reproductor masculino, éste tiene un papel importante en la maduración espermática, y funciona como un vehículo para los espermatozoides eyaculados (Bernardini et al., 2011). El plasma seminal se compone de iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, lípidos, enzimas, prostaglandinas, proteínas y muchos otros factores. (Soleilhavoup et al., 2014)

En el carnero este está compuesto por: Fructosa 150-600 mg/dL; Glucosa 0.9-1.6 mg/dL; Acido cítrico 110-260 mg/dL; Proteínas totales, g/dL 2.30-2.50; Lípidos Totales 254-396 mg/dL; Fosfolípidos ... Colesterol ... Acido glutámico 4.5-5.2 mg/dL; Na⁺ 120-258 mg/dL; K⁺ 50-140 mg/dL; Ca²⁺ 6-15 mg/dL; P 4.8-12.0 mg/dL; Cl⁻ 86 mg/dL; Mg²⁺ 2-13 mg/dL; Zn²⁺ 56-179 mg/dL; Testosterona pg/mL 25-375; Estrogenos pg/mL ... Prostaglandinas ng/mL 500-20000; Fosfatasa alcalina 14895-40818 mU/mL; Aspartato aminotransferasa 190-256 mU/mL; Alanina aminotransferasa 39-148 mU/mL; Lactato deshidrogenasa 968-1697 mU/mL (Juyena et al., 2012).

Las proteínas del plasma seminal provienen principalmente de la mezcla del fluido de la cauda epididimal y de proteínas de fluidos de las glándula sexuales accesorias, aunque también son liberadas por la membrana del espermatozoide (Rodrigues et al., 2013). Estas afectan a una amplia gama de funciones, que incluyen la protección contra microorganismos y ataques inducidos por el complemento (Matias-Martins et al., 2013) a través de la actividad proteasa (Juyena et al., 2012).

La cantidad y calidad de las proteínas del plasma seminal varían entre individuos y algunos factores ambientales, tales como la temporada de recolección, temperatura, nutrición, y el estrés. Los cambios estacionales en los perfiles de proteínas del plasma seminal que se observan marcadamente en el carnero pueden deberse a la variación estacional en los niveles de gonadotropinas y sus receptores en los testículos y podrían afectar la función gonadal endocrina y las secreciones del epidídimo y vesículas seminales (Juyena et al., 2012).

Se cree que factores descapacitantes del plasma seminal mantienen a los espermatozoides en estado descapacitado durante las primeras etapas del transporte espermático, estos incluyen a la espermina en el carnero (Sutovsky et al., 2010), la cual es una poliamina que inhibe la movilidad lateral de proteínas de membrana, afectando su fluidez. La espermina asociada al espermatozoide puede ser removida por la heparina presente en el fluido del tracto reproductor femenino (Rubinstein et al., 1991).

Se atribuyen efectos benéficos a las proteínas del plasma seminal, especialmente RSVP14 y RSVP20, producidas en las vesículas seminales, estas proteínas se adhieren a toda la superficie espermática especialmente en la región acrosomal, y al parecer actúan estabilizando la membrana de los espermatozoides y participando en la capacitación. Estas proteínas poseen capacidad antioxidante por lo que su efecto benéfico podría estar relacionado en la protección contra el estrés oxidativo y la capacitación prematura (Bernardini et al., 2011).

Las proteínas de unión a heparina (HBPS) se encuentran en el plasma seminal, se unen a la membrana de los espermatozoides y afectan una serie de eventos que contribuyen a la fertilidad normal, tales como la capacitación espermática, la formación del reservorio oviductual y la unión al ovocito. Las HBPS representan el 16.5% de las proteínas del plasma seminal de los carneros (Matias-Martins et al., 2013).

Por otra parte en el plasma seminal de los cerneros se encuentran fracciones de unión a heparina, como la alfa-2-macroglobulina, que es un inhibidor de proteasas no específico que actúa para controlar la acción proteasa. Otro inhibidor de proteasas con afinidad por heparina en el plasma seminal es el factor Inhibidor XIIa. En la próstata, esta proteína

regula la actividad del factor XIIa, una serina proteasa prostática que hidroliza precalicreína, resultando en la enzima calicreína activa. Las calicreínas seminales están implicados en la regulación de la motilidad espermática en ovinos (Matias-Martins et al., 2013).

La catelicidina en el plasma seminal del carnero es otro componente que actúa en la protección de los espermatozoides contra la actividad bacteriana. Las catelicidinas son una familia de proteínas catiónicas sintetizadas como preproteínas y después de su proteolisis liberan el péptido antimicrobiano activo. Es producida en su forma inactiva por el epidídimo y se escinde por las proteasas los fluidos sexuales accesorios después de la eyaculación, por lo tanto, las catelicidina seminal está diseñada para proteger a los espermatozoides contra microorganismos en el medio ambiente vaginal (Matias-Martins et al., 2013).

La lactoferrina presente en el fluido de las glándulas vesiculares del carnero se une a los espermatozoides y ejerce actividad antimicrobiana, adicionalmente la lactoferrina previene la peroxidación lipídica y la formación de especies reactivas de oxígeno (Matias-Martins et al., 2013).

Bodhesina 2, es una proteína que forma parte de la superfamilia de las espermadhesinas, se originan en las glándulas sexuales accesorias y el epidídimo. Estas proteínas están relacionadas principalmente en la formación del reservorio oviductual y la interacción entre los gametos. Las espermadhesinas están asociadas con una reducción en la motilidad espermática (Rodrigues et al., 2013). Las espermadhesinas fueron designadas inicialmente como una proteína ácida del líquido seminal, estas proteínas están asociadas con la superficie de los espermatozoides y existe una correlación positiva entre el contenido total de estas proteínas del plasma seminal y la capacidad de congelabilidad del semen de carnero, ya que un estudio con semen de toros reveló que las proteínas ácidas del plasma seminal podrían ser utilizadas como un marcador de alta congelabilidad para el semen (Juyena et al., 2012).

Las proteína de las vesículas seminales de 22 kDa (RSVP22) pertenecen a la familia de proteínas de unión a espermatozoides (BSP's). Estas se unen al espermatozoide durante la eyaculación, y permanecen unida hasta que el espermatozoide alcanza al oviducto,

donde modulan la formación del reservorio espermático. Las RSVPs son producidas por las glándulas vesiculares, regulan la capacitación espermática eliminando selectivamente colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática (Rodrigues et al., 2013).

Zinc-alfa-2-glicoproteína (ZAG-2) está presente en el plasma seminal proveniente de la próstata, esta proteína se unen a la membrana espermática en la región pre-ecuatorial y pieza media y está involucrada en la regulación de la motilidad espermática (Rodrigues et al., 2013).

2.7.- Transporte espermático

2.7.1.- Defensas vaginales

La vagina está abierta al exterior y por lo tanto está expuesta a las infecciones, especialmente en el momento del coito; por lo tanto, está bien equipada con las defensas antimicrobianas que pueden trabajar contra los patógenos, así como contra los espermatozoides (Suarez et al., 2015).

2.7.2.- Transporte espermático a través del cérvix

En las ovejas el cérvix presenta una serie de 5-7 anillos en forma de embudo que no están alineados concéntricamente (Druart et al., 2012) Después de la deposición en la vagina, los espermatozoides entran en el canal cervical rápidamente, donde se encuentran con grandes volúmenes de moco cervical producido cuando los niveles sistémicos de estrógeno son altos. Bajo la influencia de estradiol, el cervix produce moco altamente hidratado. El grado de hidratación está correlacionado con la penetrabilidad de los espermatozoides. La naturaleza viscoelástica del moco cervical es debido a la presencia de proteínas glicosiladas grandes y poliméricas de la familia de la mucina. La producción de moco es mayor durante la dominación estrogénica que durante la dominancia de progesterona. Genes implicados en la glicosilación de las mucinas se regulan a la alta en estro, mientras que otros se regulan a la baja (Suarez et al., 2015).

El moco cervical representa la mayor barrera para los espermatozoides anormales que no pueden nadar correctamente o que presente un pobre perfil hidrodinámico. Se piensa que el moco cervical es un medio de selección espermático para espermatozoides morfológicamente normales y vigorosamente móviles. El mayor obstáculo para la penetración de los espermatozoides a través del moco cervical es en su borde, ya que en este sitio su estructura es más compacta. Los componentes del plasma seminal pueden ayudar a los espermatozoides a penetrar el borde del moco. Se ha atribuido el rol de la penetración del moco cervical al recubrimiento de los espermatozoides por proteínas específicas miembros de la familia de las defensinas. Las defensinas son péptidos catiónicos que juegan un papel en la inmunidad innata y que poseen actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, y algunos virus, se secretan en el epidídimo y recubren toda la superficie de los espermatozoides (Suarez et al., 2015).

Hay canales estrechos en el cérvix, no mucho más anchos que la cabeza de los espermatozoides, que conducen a la cavidad uterina. Por otra parte, la mucosidad en los canales es diferente en composición y es menos densa que en el lumen cervical durante la fase folicular. Los espermatozoides llegan la cavidad uterina, viajando a través de los canales estrechos, evitando el moco más viscosos en el centro del lumen cervical que sirve para descargar el contenido uterino y tal vez también para evitar el ascenso de patógenos (Suarez et al., 2015).

Los espermatozoides son guiados a través del cérvix por la microarquitectura propia del moco cervical. Las mucinas, que son las principales glicoproteínas que componen el moco cervical, son largas moléculas lineales flexibles, que se alinean conforme son secretadas a través de canales de la mucosa cervical y así sirven de guía a los espermatozoides. Los espermatozoides se orientan a lo largo del eje longitudinal de los hilos del moco cervical y nadan a través del este con una trayectoria recta (Suarez et al., 2015).

2.7.3.- Transporte espermático a través del útero

Los espermatozoides deben pasar a través del cuerpo y cuernos uterinos antes de alcanzar la unión útero-tubárica. En las ovejas son necesarias de 8 a 10 horas para que

un número suficiente de espermatozoides lleguen al oviducto. El transporte de espermatozoides a través del útero es asistido por las contracciones pro-ováricas del miometrio. Ondas dirigidas cranealmente generadas por contracciones del músculo liso uterino, que aumentan de intensidad durante la fase folicular tardía. En ovejas, se produce una fuerte actividad contráctil durante el estro, mientras que las contracciones son débiles y localizadas durante la fase lútea. Las contracciones del miometrio pueden ser estimuladas por la actividad estimulante de los componentes seminales, los espermatozoides, los testículos y secreciones del epidídimo (Suarez et al., 2015).

2.7.4.- Almacenamiento espermático en el reservorio oviductual.

La mayoría de los espermatozoides que entran en el oviducto no continúan inmediatamente al sitio de fertilización sino que se mantiene almacenados en un reservorio. Se ha reportado la existencia del reservorio oviductual de espermatozoides en una variedad de especies que incluyen a los ovinos. El oviducto ofrece un refugio seguro para los espermatozoides, ya que a diferencia de la vagina, el cervix, y el útero, el oviducto no responde ante la inseminación con la afluencia de leucocitos, su función es mantener la fertilidad de los espermatozoides entre el inicio del estro y el tiempo de la ovulación. El mantenimiento de los espermatozoides en el istmo oviductual también puede servir para prevenir la fertilización poliespérmica al permitir que en un tiempo sólo a unos pocos espermatozoides alcancen al ovocito en el ámpula (Suarez et al., 2015).

2.7.5.- Acción muscular y ciliar en el transporte de ovocitos

Una vez que la masa del cumulus rodean a uno o más ovocitos estos entran en el ámpula, y se mueven rápidamente a la unión istmo - ampular. Los efectores potenciales de este movimiento son la musculatura oviductual y los cilios.

Los cilios que recubre el ámpula oviductual en ovejas, impulsan hacia el útero para mover la masa de cúmulos/ovocito a su destino, con movimientos de ida y vuelta observados en el ámpula inferior, aunque el movimiento neto es hacia el útero. El movimiento hacia atrás y hacia adelante podría servir para mejorar la infiltración de la matriz del cumulus con secreciones ováricas o para iniciar el proceso de la eliminación del cumulus, mientras que

las contracciones del músculo liso en la pared son necesaria para el transporte de los ovocitos (Suarez et al., 2015).

2.8.- Modificaciones de la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimaria.

Las células espermáticas son únicas en muchos aspectos, incluyendo estructura y función. Esta célula es capaz de fertilizar ovocitos; esto ocurre en un cuerpo diferente al de su origen y género. Su membrana plasmática también es diferente a la mayoría de otras membranas celulares en su composición lipídica. Contiene gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente fosfolípidos esterificados con dos ácidos grasos poliinsaturados, que sólo se encuentran en el espermatozoide, retina, y ciertas áreas del cerebro que contribuyen a la fluidez y flexibilidad membranal. La composición lipídica de la membrana se ha relacionado con sus funciones específicas, ya que promueven la creación de microdominios con diferente fluidez, fusogenicidad, y la permeabilidad características, requerida para alcanzar y fusionarse con el ovocito. La composición lipídica y los ácidos grasos de las células espermáticas difieren no sólo en los diferentes animales sino también en las distintas especies, incluso en poblaciones fértiles y subfértiles en una misma especie (Mandal et al., 2014).

El patrón lipídico definitivo de los espermatozoides eyaculados se alcanza sólo después de la maduración epididimal. Los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide sufren cambios marcados durante la maduración epididimal, durante la cual los espermatozoides de carnero disminuyen en contenido lipídico y de colesterol. La relación colesterol: fosfolípidos y la concentración de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, y plasmalógenos de etanolamina disminuyen en todo el espermatozoide. Debido a esto, se producen incrementos en la cantidad de ácidos grasos insaturados en todo el espermatozoide de carnero. En particular la membrana plasmática de la región acrosomal, que es particularmente rica en fosfoglicéridos de colina y etanolamina. Los cambios en la cantidad y composición de los lípidos durante la maduración se cree que explican por qué los espermatozoides eyaculados son más sensibles al choque frío que los espermatozoides epididimales (Mandal et al., 2014).

Estos cambios también pueden dar cuenta de la disminución dependiente de maduración en la densidad y la disminución de la fluidez de la membrana de los espermatozoides carnero. Análisis de espermatozoides epididimales y eyaculados de carnero indican que existen diferencias regionales en la disminución de la fluidez de la membrana plasmática. Durante la maduración, la tasa de difusión de análogos de fluorescencia de lípidos aumenta en todas las regiones del espermatozoide excepto la pieza media (Mandal et al., 2014).

2.9.- Membrana plasmática del espermatozoide eyaculado

La membrana plasmática es responsable de la conservación de la homeostasis celular; Por lo tanto, tiene un papel vital en la supervivencia de los espermatozoides y la preservación de la fertilidad potencial en el tracto reproductivo femenino. La integridad funcional de la membrana espermática es crucial para la capacitación, reacción acrosomal, y sucesivamente la unión a la superficie del ovulo (Ahmad et al., 2013),

La membrana plasmática de los espermatozoides de carnero muestra una relación colesterol: fosfolípido (0.38), que es considerablemente menor que en otras especies de mamíferos. La composición de los ácidos grasos unidos fosfolípidos y, particularmente la elevada relación de ácidos grasos poliinsaturados / saturados, en la membrana espermática del carnero pueden influir en la susceptibilidad membranar (Colas et al., 2012).

2.10.- Membrana plasmática del espermatozoide maduro

2.10.1.- Lípidos.

El colesterol tiene un papel clave en la permeabilidad, fluidez y la organización de los lípidos de la membrana de los espermatozoides. El contenido de colesterol de la membrana espermática se modifica fisiológicamente durante la maduración epididimal y tras su transferencia al tracto genital femenino. Durante el almacenamiento del semen, el contenido de colesterol de la membrana espermática se altera de forma no-fisiológica por el enfriamiento y almacenaje. El eflujo de colesterol durante la capacitación *in vitro*

aumenta el desorden del empaquetamiento de los fosfolípidos, y da lugar a un aumento en la permeabilidad de la bicapa y la fluidez (Mehr et al., 2015) .

2.10.2.- Distribución heterogénea de los componentes estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide.

Los espermatozoides son células con una capacidad biosintética limitada. Por lo tanto, su funcionalidad es controlada principalmente por factores externos que actúan a través de la superficie celular y de los componentes de la membrana plasmática (Colas et al., 2012). Los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar al óvulo dentro del tracto reproductor femenino mediante la previa exposición de proteínas receptoras ocultas en su superficie, después de la reacción acrosomal (Bianchi et al., 2014).

Las balsas membranales se definen como pequeños dominios heterogéneos, altamente dinámicos que sirven para compartimentalizar los procesos celulares. Estos microdominios de membrana están asociados con un grupo heterogéneo de proteínas que flotan mayormente en la fase de esfingolípidos-colesterol en las membranas. Las propiedades ordenadas únicas están dadas debido a interacciones hidrofóbicas entre sus ácidos grasos saturados y la estructura rígida intercalada del colesterol (Colas et al., 2012). La fosforilación de proteínas dependiente de AMPc conducen al scrambling de los fosfolípidos y la formación de distintos microdominios de membrana, balsas lipídicas ricas en colesterol y ácidos grasos saturados (Sutovsky et al., 2010).

Varios esteroides, esfingolípidos, glicolípidos y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) han sido reportadas en las balsas lipídicas. En los espermatozoides de carnero se han reportado los microdominios caveolin-1 y GM1, comúnmente utilizados como marcadores de balsa lipídicas. Caveolin-1 es una proteína de unión a colesterol, clave en la organización de las balsa lipídicas, ha sido identificada en la región acrosomal de espermatozoides frescos de carnero y en la región ecuatorial, después de la capacitación. El gangliósido GM1 ha sido reportado como un receptor de espermatozoides que actúa como un factor descapacitante. GM1 se mueve rápidamente desde su posición sobre el acrosoma a la zona de post-acrosomal después de la muerte celular. GM1 se localiza en la región postacrosomal y la cola de todos los espermatozoides carnero. Esta distribución

espacial de las balsas lípidicas dentro de la membrana espremática se ve influenciada por el estado de capacitación (Colas et al., 2012).

2.10.3.- Asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide

Una característica distintiva de las membranas biológicas es la asimetría de la disposición de los fosfolípidos a lo largo de la bicapa lipídica. En la capa externa de la membrana plasmática están presentes los fosfolípidos que contiene colina tales como “fosfatidilcolina” y “esfingomielina”, mientras que en la parte interior se sitúan aminofosfolípidos, tales como “fosfatidiletanolamina” (PE) y “fosfatidilserina” (PS) (Kotwicka et al., 2013).

Fosfatidilserina es un fosfolípido ácido (aniónico) que tiene una alta propensión a quelar el calcio. Además de su función como un componente de las membranas celulares es un cofactor esencial que se une a y activa un gran número de proteínas, especialmente a aquellas con actividades de señalización. La presencia de cantidades considerables de fosfatidilserina expuesta permiten el acoplamiento con proteínas con dominios de unión específicos a fosfatidilserina, incluyendo varios efectores de señalización y fusogénicos importantes. La alta concentración de este lípido aniónico resulta en una acumulación de carga negativa a la que las proteínas poli-catiónicas se pueden unir. Se cree que el efecto es que ciertas proteínas son re-dirigidas de un dominio de membrana a otro (Christie et al., 2013).

2.11.- Capacitación espermática

2.11.1- Capacitación Espermática Definiciones y observaciones generales

Los espermatozoides de los mamíferos que aguardan al momento de la eyaculación en la cauda epididimal no son capaces de fertilizar a los óvulos. La maduración es un requisito que fue reportado por primera vez en 1951 por Austin y por Chang, quienes observaron que el espermatozoide debe residir en el tracto reproductor femenino para fertilizar al óvulo. La capacitación es proceso por el cual bajo la dirección de la hembra los

espermatozoides desarrollan la capacidad de fertilizar. La capacitación es un proceso evolutivo a través de la selección sexual postcopulatoria.

Un rasgo característico de la capacitación es el curso de tiempo. Esto varía entre las especies de mamíferos *in vivo*, de ~1 h en ratones a > 6h en algunos primates, pero en todos los casos los espermatozoides deben residir durante un período dentro del tracto reproductor femenino .

Los espermatozoides son funcionalmente heterogéneos, y es difícil correlacionar el estado fisiológico de los pocos espermatozoides fecundantes con el resto de la población, promediando propiedades bioquímicas o moleculares, ya que sólo una pequeña fracción del eyaculado llega al ampulla oviductual y está disponible para fertilizar al ovocito. Los espermatozoides que alcanzan al ampulla exhiben una motilidad hiperactivada y están fuertemente capacitados.

De manera experimental el desarrollo de un conjunto de marcadores permiten la identificación y posible categorización de una subpoblación capacitada. De esta forma muchos eventos durante la capacitación pueden ser seguidos con sondas de fluorescencia o mediante la observación de cambios en el comportamiento de los espermatozoides (Florman et al., 2015).

2.11.2.- Características generales de la capacitación:

1. La capacitación refleja la reprogramación funcional de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Sin embargo, la capacitación comienza cuando los espermatozoides están expuestos a los fluidos seminales durante la eyaculación. Los espermatozoides permanecen en reposo durante su almacenamiento en la cauda epididimal y activan la motilidad progresiva rápidamente después de su liberación. La capacitación se completa *in vivo* en el oviducto.

2. Como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides expresan la capacidad de interactuar con el ovocito, exhibiendo patrones únicos de motilidad flagelar. Muchos de los cambios bioquímicos y biofísicos que acompañan a la capacitación se refieren a estas modificaciones del comportamiento.

3. La capacitación no es un proceso único, sino más bien es la suma de diversas reacciones de componentes que proceden durante un curso de tiempo y regulación separadas. La vía AMPc / PKA tiene papeles tempranos y tardíos separados durante la capacitación.

4. Los espermatozoides están de manera altamente asincrónica al interior de una población capacitada, de tal manera que la cantidad de espermatozoides muy capacitados en una población en un momento dado puede ser baja tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto podría extender la vida útil plausiblemente fértil de un eyaculado mediante la continua reposición de un conjunto de espermatozoides capacitados, esto puede ser esencial para una reproducción eficiente en especies donde la ovulación y la receptividad sexual de la hembra no están estrechamente acoplados.

5. Los fluidos seminales contienen: moduladores negativos de la fertilidad (llamados "factores descapacitantes"); moduladores positivos de la fertilidad, que incluyen proteínas secretoras ricas en cisteína proteínas de la familia (CRISP); Proteínas de dominio Fn-2; espermadhesinas; otras proteínas y péptidos secretados; así como prostaglandinas. Cuando se utilizan espermatozoides eyaculados, en condiciones de cultivo *in vitro* se representa una simplificación del medio ambiente dentro del tracto reproductor femenino. Por ejemplo, la composición iónica de los fluidos del tracto reproductor femenino difieren de los medios de cultivo estándar utilizados para la capacitación, y esto puede influir en la fisiología del espermatozoide. Adicionalmente, los fluidos del tracto reproductor femenino contienen una gran variedad de moléculas bioactivas que pueden afectar la función espermática, pero que no están presentes en los medio de cultivo simples (Florman et al., 2015), como heparina y los glicosaminoglicanos similares a heparina presentes en los fluidos del tracto reproductor femenino, que incluyen al uterino, oviductual y folicular (Matias-Martins et al., 2013).

2.11.3.- Regulación de la fosforilación

La capacitación está asociada a la fosforilación de proteína tirosina, que es modulada a través de una vía dependiente de AMPc en muchas especies, incluyendo ganado bovino y está regulada por varios elementos de transducción de señales que involucran a la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), y la proteína tirosina quinasa (PTK).

El AMPc se genera por la enzima, adenilato ciclasa (AC). La actividad de la AC transmembranal está regulada por proteínas G en respuesta a ligandos extracelulares (Breininger et al., 2010). En contraste, la AC soluble se asocia con diversos organelos intracelulares y está regulado por HCO_3^- y Ca^{2+} no es dependiente de la proteína G, ya que carece de segmentos transmembranales (Nishigaki et al., 2014).

El AMP cíclico es esencial para los eventos que ocurren durante la capacitación. El AMPc y sus blancos regulan una variedad de eventos de señalización que inducen la capacitación, estos incluyen la remodelación de lípidos e hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide, un aumento del pH, así como del Ca^{2+} intracelular; y el aumento en la fosforilación de la proteína tirosina. (Buffone et al., 2014).

2.11.4.- Potencial de membrana

En los espermatozoides, como en la mayoría de las células, las concentraciones iónicas al interior son marcadamente diferentes respecto a las del medio extracelular. Estas diferencias son el resultado de la relativa permeabilidad iónica de la membrana plasmática sobre cada uno de los iones que se encuentran en los medios interno y externo, dado por los canales iónicos, los transportadores específicos presentes en la célula, los gradientes que se establecen y el estado metabólico de la célula (Visconti et al., 2011).

En reposo, el balance de estos gradientes de flujo, y permeabilidades resultan en un potencial eléctrico, conocido como potencial de membrana plasmática del espermatozoide de reposo. Antes de la capacitación los espermatozoides están relativamente despolarizados y llegan a hiperpolarizarse durante capacitación. Estos cambios resultan de una combinación de alteraciones de la permeabilidad ionica electrogénica que cambian el potencial de membrana (Visconti et al., 2011).

Se ha mencionado que la hiperpolarización asociada a la capacitación puede incrementar el pH_i estimulando intercambiadores Na^+/H^+ y consecuentemente CatSper. Sin embargo, el aumento del pH_i desplaza la curva corriente-voltage CatSper hacia valores de potencial de membrana más negativos (Visconti et al., 2011).

Debido a que la capacitación prepara a los espermatozoides para someterse a la reacción acrosomal, se ha propuesto que la hiperpolarización asociada a la capacitación también podría regular la capacidad de los espermatozoides para generar elevaciones transitorias en la $[Ca^{2+}]_i$ durante la reacción acrosomal inducida por agonistas fisiológicos como la ZP (Visconti et al., 2011).

El potencial de membrana afecta o regula una variedad de fenómenos biológicos. La diferencia del potencial de membrana surge del desequilibrio de iones a través de la membrana plasmática. La distribución asimétrica de los lípidos a través de la membrana y el potencial de membrana son fenómenos acoplados. La carga negativa de la superficie celular asociado a externalización de PS ha demostrado activar la hiperpolarización de la membrana celular y la reorganización del citoesqueleto (Fadeel et al., 2009).

2.11.5.-pH

El mantenimiento del pH intracelular (pH citoplasmático o pHi), dentro de los límites fisiológicos es fundamental para el funcionamiento celular. La mayoría de los procesos celulares están influenciados y funcionan dentro de un restringido rango de pHi. Los cambios en el pHi afectan el estado de ionización de los ácidos débiles y bases que están presentes en la mayoría de las proteínas y muchas biomoléculas. Por lo tanto, como la actividad metabólica acidifica al citosol, las células pueden estar expuestas a un variable pH externo (pHe), la falta de regulación del pHi puede tener consecuencias funcionales graves. Las células frenan o aceleran la actividad de una amplia gama de transportadores de iones de la membrana plasmática que movilizan ácidos y/o bases. Los transportadores de HCO_3^- y H^+ se encuentran entre los principales actores en la regulación del pHi (Nishigaki et al., 2014).

Las células pueden presentar cambios drásticos en el tránsito de un estado latente a un estado activo, condición que a menudo conlleva a un repentino cambio en el pH. Los espermatozoides están expuestos a los cambios drásticos en la composición iónica de su entorno durante su tránsito hacia la fertilización del óvulo. Los espermatozoides se encuentran en un medio ácido con una baja concentración de HCO_3^- en el epidídimo, que los mantiene quiescentes, mientras que en el útero y el oviducto el fluido luminal femenino

contiene una alta concentración de HCO_3^- y se vuelve cada vez más alcalino, condición necesaria para la fertilización. Varios transportadores de iones y enzimas espermáticos únicos, cuya eliminación causa infertilidad, son o bien pHi dependientes o de alguna manera están relacionados con la regulación del pHi . Entre ellos se encuentran: el canal de Ca^{2+} CatSper; el canal de K^+ ; Slo3; el intercambiador de Na^+/H^+ específico del espermatozoide y la adenilato ciclasa soluble. Por lo tanto, la regulación del pHi es de suma importancia para el espermatozoide (Nishigaki et al., 2014).

Los intercambiadores Na^+/H^+ (NHEs), también conocidos como Na^+/H^+ antiporters (NHA), son proteínas integrales de membrana que catalizan el intercambio de Na^+ por H^+ a través de la bicapa lipídica y están distribuidos de forma ubicua en casi todos los organismos vivos. Contribuyen a los mecanismos homeostáticos básicos que controlan el pHi , el volumen celular y el pH al interior de los organelos. Los NHEs se componen de 12 segmentos transmembranales que catalizan el intercambio de iones y el dominio regulador en el extremo carboxilo citoplasmático interactúa con varias proteínas incluyendo componentes asociados al citoesqueleto, quinasas y proteínas de unión a Ca^{2+} (Nishigaki et al., 2014).

2.11.6.- Canal dependiente de voltaje H^+

El canal Hv se compone de 4 segmentos transmembranales estructuralmente similares al dominio sensor de voltaje que se encuentra comúnmente en otros canales iónicos dependientes de voltaje. Este canal existe como un homodímero con dos poros H^+ , puesto que cada subunidad conforma un poro permeable H^+ . El canal de Hv es activado por el potencial de despolarización de la membrana, y en un gradiente hacia el exterior el H^+ atraviesa la membrana plasmática. Adicionalmente, ácidos grasos insaturados tales como el ácido araquidónico mejoran la actividad de los canales Hv mientras que el Zn^{2+} potencialmente lo inhibe (Nishigaki et al., 2014).

Los espermatozoides poseen canales Hv en la pieza principal del flagelo, son potencialmente inhibidos por Zn^{2+} . Esta propiedad es particularmente importante pese a la regulación del pHi de los espermatozoides ya que se sabe que el fluido seminal contiene un rango milimolar de Zn^{2+} , que debería bloquear completamente la conductancia del H^+

del canal H_v , esto puede explicar la acción del Zn^{2+} como factor descapacitante (Nishigaki et al., 2014).

Los canales Ca_v , canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, son responsables del incremento del $[Ca^{2+}]_i$ inducida mediante el potencial de membrana (E_m). Los canales Ca_v son fosforilados y regulados por diversas proteínas quinasas tales como proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), y Ca^{2+} /calmodulina (CaM) - dependiente de proteína quinasa II (CaMKII). Los canales Ca_v también están regulados por proteínas G activadas a través de diferentes vías, incluyendo aquellas activadas por neurotransmisores y hormonas. Esta regulación puede ser directa, a través de interacciones físicas entre la proteína G y subunidades del canal o indirecta a través de segundos mensajeros y/o por proteínas quinasas (Darszon et al., 2011).

El canal de potasio SLO3 se expresa sólo en los testículos de mamíferos, es activados por la alcalinización y carecen de los sensores de Ca^{2+} presente en los canales SLO1 el cual es Ca^{2+} - activado (Nishigaki et al., 2014). Su activación por la alcalinización intracelular explica la hiperpolarización que se produce durante la capacitación. El incremento en el pH_i espermático activa dos grandes conductancias, una conductancia de K^+ hacia el exterior transportado por canales SLO3 y una conductancia hacia el interior que permite la entrada de Ca^{2+} por canales selectivos de cationes CatSper (Santi et al., 2010). Contribuyendo a la hiperpolarización que se produce durante la capacitación (Nishigaki et al., 2014).

En los espermatozoides la progesterona activa canales CatSper ya sea mediante la unión al propio canal o a una proteína asociada. CatSper regula la hiperactivación, una forma de motilidad espermática necesaria para la fertilización. Tomando en cuenta la función de la progesterona como quimioatrayente, se ha sugerido que CatSper funciona como un canal de Ca^{2+} tanto para la hiperactivación como para la quimiotaxis. (Strünker et al., 2011)

Estructuralmente de CatSper (canal catiónico de los espermatozoides), es un tipo de canal de Ca^{2+} compuesto principalmente por cuatro subunidades separadas formadoras de poros, CatSper1-4 y tres subunidades auxiliares adicionales, CatSper $_{\beta}$, CatSper $_{\delta}$, y CatSper $_{\gamma}$ (Darszon et al., 2011).

En condiciones fisiológicas, CatSper lleva principalmente corrientes divalentes. A pHi 6, casi todos los canales CatSper están cerrados. A pHi 6, 1 μ M de progesterona, induce considerables corrientes. La alcalinización y progesterona desplazan la curva de activación a voltajes menos positivos. A pHi 8, una fracción significativa de canales CatSper se activa y la progesterona mejora aún más las corrientes. Las corrientes CatSper evocadas por progesterona actúan de manera contraria al mecanismo de activación que implica segundos mensajeros, fosforilación o proteínas G. (Strünker et al., 2011). Una característica es que es potenciado por la alcalinización intracelular. Debido a que el dominio citoplásmico NH₂-terminal de CatSper1 es rico en histidina, se especula que este dominio funciona como un sensor de pH (Darszon et al., 2011).

2.11.7.- Fluidez y permeabilidad membranar

La disposición asimétrica de los fosfolípidos en la membrana no es absoluta, excepto por fosfatidilserina, que es controlada por la actividad de la flipasa. El proceso de la translocación de fosfatidilserina en la membrana, consiste en la translocación desde la capa interna a la capa externa de la membrana, este proceso es reconocido por ser un evento biológico importante dentro de la célula. El aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular inhibe la actividad flipasa, mientras que inducen la actividad escramblasa. La membrana celular de los espermatozoides, muestran asimetría al interior y al exterior de la bicapa lipídica. La topografía de la membrana celular del espermatozoide comprende cinco dominios principales que difieren en relación a la ocurrencia de la translocación de fosfatidilserina. Esta es considerada como un indicador de cambios en la membrana celular de los espermatozoides, que se produce durante la capacitación y reacción acrosomal o durante la eliminación de los espermatozoides patológico (Kotwicka et al., 2013).

Los fosfolípidos espermáticos se distribuyen de forma asimétrica dentro de la membrana plasmática por la actividad concertada de varias transferasas de fosfolípidos: Una transferasa de aminofosfolípidos que desplaza fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la capa externa hacia la interna, una transferasa no específica (flopasa) que transfiere fosfolípidos desde la capa interna a la externa y un escramblasa que desplaza a todos los

fosfolípidos en ambas direcciones. El aumento de la actividad escramblasa es observado durante la capacitación espermática asociada con el *scrambling* de fosfolípidos. Este cambio en la asimetría es estimulada por HCO_3^- a través del ACs y de la vía AMPc / PKA, y promueve una exposición rápida de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina no relacionada con la apoptosis. En cuanto a las implicaciones funcionales de este evento, se ha propuesto que el *scrambling* facilita el eflujo del colesterol, evento requerido para la capacitación (Buffone et al., 2014)

La eliminación del colesterol de la membrana plasmática, probablemente explica los cambios en la fluidez de la membrana. Esta alteración en la fluidez de membrana puede aumentar la afluencia de Ca^{2+} y por consiguiente las proteínas de la membrana pueden sufrir reordenamientos al interior de la membrana, lo que resulta en la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide. Esta modificación aumenta la capacidad de la membrana plasmática de fusionarse con la membrana acrosomal externa, lo que resulta en la reacción acrosomal (Ahmad et al., 2013)

En conjunto, los cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, y posiblemente en la membrana acrosomal externa, resultan en una mayor fluidez y fuseabilidad de estas membranas espermáticas (Sutovsky et al., 2010)

2.12.- Movilidad espermática

Las fibras densas externas son estructuras del citoesqueleto que se encuentran específicamente en la cola de los espermatozoides, son importantes para la estabilidad y el retroceso elástico de la cola de los espermatozoides así como para el apoyo en el bateo flagelar. Constan de nueve fibras ubicadas entre la vaina mitocondrial y el axonema en la pieza media, se extienden longitudinalmente a toda lo largo de la pieza media. Las fibras 3 y 8 están estrechamente adheridas a la pieza del conexión en el extremo proximal, considerando que terminan en la pieza principal como las columnas longitudinales de las vainas fibrosas

Las vainas fibrosas actúan como una estructura mecanoelástica involucrada en la conformación de la onda flagelar. Estas sirven como andamio para enzimas glucolíticas y componentes de las cascadas de señalización mediadas por la fosforilación de tirosina,

que desempeña un papel en la regulación de la motilidad espermática, y también están involucradas, capacitación e hiperactivación del espermatozoide.

La unión de los dobletes axonemales 3 y 8 a las columnas longitudinales de las vainas fibrosas restringen su participación en el deslizamiento de los microtúbulos y unión al axonema durante el movimiento flagelar. Las columnas longitudinales por si mismas también limitan la flexión del flagelo en este mismo plano, mientras que estas características no restringen la flexión perpendicular flagelar a este plano. Aunque parece que los espermatozoides nadan con un golpe plano efectivo y en tanto recuperan el golpe, como los cilios, ellos también giran. Las ondas propagadas tienen un componente tridimensional en la porción distal de la cola cuando se observan en un microscopio.

La vía de señalización del AMPc participa en la regulación de los procesos asociados a la motilidad e hiperactivación. PKA es el blanco predominante del AMPc sintetizado a partir de ATP por la adenilato ciclasa en respuesta a estímulos de HCO_3^- y Ca^{2+} . PKA a su vez fosforila proteínas sobre residuos de serina y treonina. Los objetivos desencadenantes de la PKA en esta cascada son la tirosina quinasas que modifican las proteínas en el flagelo asociadas a estos procesos. La presencia de proteínas de anclaje a proteína quinasa A AKAP's en las vainas fibrosas ancla a la PKA involucrada en tales procesos.

Los espermatozoides sufren dos tipos de motilidad: motilidad progresiva y la motilidad hiperactivada. La forma de bateo del flagelo de los espermatozoides se pueden clasificar en dos tipos diferentes: ondas simétricas y ondas asimétricas. La motilidad progresiva se genera por las ondas simétricas que se propagan por el flagelo con una neta propulsión lineal. La hiperactivación está asociada a ondas asimétricas que se propagan por el flagelo con mayor amplitud, que resulta en trayectorias circulares. Esta se caracteriza por un golpeo de látigo que muestra un vigoroso patrón del flagelo en forma de ocho. La hiperactivación se produce durante el proceso de capacitación que conduce a la reacción acrosomal y se observa en los espermatozoides durante su ascenso por el tracto reproductor femenino.

El Ca^{2+} tiene un papel importante en la motilidad, especialmente en la hiperactivación. CatSper1, CatSper2, $\text{Ca}_v2.3$ y PMCA4 participan en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular, y están implicados en la iniciación de la motilidad espermática. CatSper1 es

un canal de entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje localizado en la pieza principal de los espermatozoides. CatSper2, otro canal iónico dependiente de voltaje, está estrechamente relacionado con CatSper1 y está presente en el flagelo (Toshimori et al., 2015).

2.13.- Inducción de la capacitación

Los espermatozoides responden a medios capacitantes que se asemejan al fluido oviductual pero que son más extremos que el entorno fisiológico normal. Por ejemplo, los espermatozoides están expuestos a temperaturas más altas, 39 °C en lugar de 35 °C y artificialmente a niveles elevados de los agentes capacitante conocidos (Leahy et al., 2011). Medios de alta fuerza iónica (HIS) inducen la capacitación espermática por el desplazamiento de factores descapacitantes de la superficie del espermatozoide. Entre ellos destacan; el medio Bracket-Oliphant (BO), TL-HEPES Sp-TALP, Sp-TALP-H, Fert-TALP, compuestos principalmente por iones como; NaCl, KCl, CaCl_2 , NaH_2PO_4 MgCl_2 , NaHCO_3^- , Acido pirúvico y BSA, alcanzando una osmolaridad 380 mOsmol pero que difieren entre si en el tiempo de incubación, el uso de heparina, de CO_2 o el aire atmosférico (Parrish et al., 2014). Hormonas presentes en el fluido uterino y oviductual en el momento de la fecundación *in vivo* y las que controlan el ciclo estral, tales como progesterona o estrógenos, pueden ser buenos candidatos para la activación de la capacitación espermática *in vitro* (García-Álvarez et al., 2014)

Albúmina sérica y heparina son usadas comúnmente como aceptores de colesterol durante capacitación *in vitro* (Breininger et al., 2010). La heparina induce cambios en las propiedades de la membrana plasmática que estimula el incremento intracelular de Ca^{2+} , pH y AMPc, necesario para iniciar las vías de señalización que conllevan a la capacitación (García-Álvarez et al., 2014)

En capacitación y fertilización *in vitro*, los medios normalmente contienen albúmina para la remoción lipídica. Albúmina actúa eliminando específicamente el colesterol de la superficie espermática, este es un fenómeno específico para las membrana de lípidos no-ordenados, aunque la depleción está acompañada por la agregación de microdominios lipídicos ordenados (balsas) La depleción del colesterol es causada probablemente por la activación de un transportador de esterol reversa dependiente de capacitación que

específicamente retira esteroides libres (colesterol y desmosterol) fuera de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides y así entregar monómeros de esteroles libres hacia el receptor (Gadella et al., 2014).

En el carnero, se considera que el suero de oveja en estro es necesario para la capacitación y fertilización *in vitro*. Sin embargo, el inconveniente principal de su uso es que no es fácil de conseguir dado que requiere de la extracción y purificación de muestras de sangre y por lo tanto su composición puede ser variable de lote a lote (García-Álvarez et al., 2014).

2.14.- Criocapacitación

Los procedimientos de criopreservación, tales como dilución, refrigeración, congelación / descongelación, inducen cambios similares a la capacitación (*capacitation-like*) en los espermatozoides. Se han reportado similitudes entre los cambios asociados a la capacitación y al daño criogénico, tales como la reorganización y la fluidez de la membrana plasmática, y un influxo de Ca^{2+} a los espermatozoides (Cormier et al., 2003).

Durante el proceso de congelación-descongelación pueden ser observados cambios en la arquitectura de los lípidos de la membrana, en su actividad metabólica (Breininger et al., 2010), en el transporte de iones de calcio y cambios similares a la capacitación. La formación de cristales de hielo fuera de las células es el principal factor que afecta físicamente la morfología celular durante este proceso (López-Armengol et al., 2012). De esta manera las modificaciones que se producen en la membrana plasmática por la criopreservación podrían estar condicionadas la expresión superficial de receptores espermáticos, que interactúan *in vivo* con la zona pelúcida (Breininger et al., 2010).

En el semen criopreservado se pueden esperar cambios similares después del desafío osmótico, ya que durante la capacitación, ocurren cambios considerables en el volumen celular, resultando en la pérdida de la regulación de la respuesta osmótica y en una disminución de la capacidad para regular el volumen (Petrunina et al., 2005) .

La excesiva dilución provoca la desestabilización de la membrana espermática y cambios similares a la capacitación, debido a la eliminación de los factores protectores del plasma seminal (Leahy et al., 2010).

Algunas proteínas se someten a la redistribución en respuesta a la criopreservación. La red de actina de los espermatozoides inducida en respuesta a la criopreservación mostró que; La polimerización de la actina-G a actina-F es importante para los cambios membranales durante la capacitación y posteriormente actina-F debe someterse a la despolimerización antes de la aparición de la reacción del acrosoma, estos cambios son parte del mecanismo implicado en la causas potencial de la capacitación inducida observados en espermatozoides congelados-descongelados (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

El deterioro inicial por enfriamiento implica la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, posteriormente componentes entre los que se incluyen fosfolípidos y proteínas migran o se liberan de la membrana plasmática y la absorción de calcio y sodio aumenta considerablemente (Kaneto et al., 2002),

La condición funcional de espermatozoides móviles sobrevivientes a la criopreservación sería similar al estado en que se encuentran previo a la congelación, sin embargo presentan un estado alterado de la membrana que pueden volverse funcionalmente similar a los espermatozoides capacitados y/o con acrosoma reaccionado (Gillan et al., 1997).

2.15.- Reacción Acrosomal

Los espermatozoides descapacitados no pueden interactuar con los óvulos *in vivo* ya que su falta de motilidad hiperactivada les impide el ascenso al sitio de la fertilización. Capas adicionales modulan directamente la interacción de los gametos. Después de la capacitación los espermatozoides desarrollan la capacidad de penetrar el cúmulo oophorus, reflejando el papel de la hiperactivación en el proceso de la penetración debido a una mayor capacidad para adherirse tenazmente a la zona pelúcida y para experimentar la reacción acrosomal (Florman et al., 2015), inducida por la glicoproteína ZP3, que es un

componente de la zona pelúcida (Baltíerrez-Hoyos et al., 2012).

La reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y la liberación de enzimas hidrolíticas que ayudan a los espermatozoides a penetrar a través de la zona pelúcida y llegar al oolemma. Cuando las dos membranas se están preparando para la fusión se forma un anclaje complejo y específico, la actina es polimerizada entre ambas membranas para prevenir el movimiento desordenado de las membranas separadas (Baltíerrez-Hoyos et al., 2012).

El acrosoma contiene varias enzimas que cumplen un papel importante en el proceso de la fertilización en mamíferos. Tras la liberación y la activación de las enzimas acrosomales, los espermatozoides penetran en la zona pelúcida que rodea al ovocito, proceso que puede ser bloqueado por inhibidores de proteasas. Algunas de las enzimas acrosomales parecen asociarse con las proteínas estructurales de la matriz nuclear. Tales como acrosina (proacrosina), proteína de unión a acrosoma y hialinuroidasa espermática. Otras enzimas acrosomales que se han reportado incluyen β -galactosidasa, β -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa, colagenasa similar a peptidasa, una proteasa similar a catepsina D, catepsina H, proteasas de tipo tripsina diferente a acrosina, dipeptidil peptidasa II, calpaína II, neuraminidasa, esterasas no específicas, arilamidasa, aspartilamidasa, arilsulfatasa A, fosfatasa ácida, β -N-acetilglucosaminidasa, una fosfolipasa C, y la fosfolipasa A₂. (Toshimori et al., 2015).

Acrosina, una proteasa serina sintetizada durante la espermatogénesis, está presente desde su formación como espermátidas, como proacrosina, un zimógeno inactivo que se convierte en la enzima activa durante la capacitación y puede ser estimulada por glicosaminoglicanos presentes en el fluido uterino y el líquido folicular (Vijayasaraswathy et al., 2014). El aumento intracelular de Ca²⁺, Na⁺ y la salida de H⁺ con el consecuente aumento del pH intraacrosomal, inducen la activación de la enzima (Arenas et al., 2010), modulando la dispersión de proteína durante la reacción acrosomal y la penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida (Matias-Martins et al., 2013).

Se ha sugerido que el mecanismo para la exposición progresiva del contenido intra-acrosomal durante la capacitación se da a medida que esta avanza. La membrana acrosomal externa evagina para formar vesículas que se agrandan y se anclan a la membrana plasmática a través de vesículas complementarias asociadas a proteínas solubles de unión del factor sensible N-etilmaleimida (SNARE) y proteínas SNARE diana de membrana. Por este mecanismo, las proteínas de unión a la ZP pueden ser llevadas a la superficie espermática de la vesícula acrosomal a través de un proceso de exocitosis, y de esta forma se explica por que muchos receptores candidatos a ZP previamente identificados sobre los espermatozoides, tales como proacrosina y la proteína de unión a ZP2, llegan a ser componentes de la matriz acrosomal (Chiu et al., 2014).

La progesterona presente en las secreciones oviductuales puede ser un factor femenino que participa en la regulación de la capacitación espermática y activador de la membrana de la cabeza espermática para la exocitosis acrosomal (Sutovsky et al., 2010). En el oviducto, las células del cumulus que rodean al ovocito liberan progesterona, esta estimula el aumento de Ca^{2+} mediante un mecanismo no genómico. La señal del Ca^{2+} controla la quimiotaxis, hiperactivación y exocitosis acrosomal del espermatozoide. La progesterona activa canales espermáticos de Ca^{2+} CatSper específicos, sensibles al pH. Tanto la progesterona como el pH alcalino estimulan un rápido influjo de Ca^{2+} (Strünker et al., 2011). La adición del HCO_3^- aumenta la frecuencia de batido de los espermatozoides, gracias a los canales sensibles al potencial de membrana y al pHi . como los canales CatSper y Slo3, que se expresan exclusivamente en los espermatozoides y cuya ausencia produce infertilidad en el macho (Nishigaki et al., 2014).

El influjo de Ca^{2+} evocado de mediante progesterona no implica la regulación clásica de la transcripción por receptores nucleares. Han surgido diversos receptores de membrana candidatos para progesterona, incluyendo un receptor acoplado a proteína G de tipo progestágeno (MPR) y un receptor de un solo paso (receptor de progesterona componente de la membrana, PGRMC). La cascada de señalización del receptor de progesterona no genómico implica al AMPc y GMPc, proteína quinasa A y G, liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, canales de Ca^{2+} con función de reservorio y canales activados por GMPc. (Strünker et al., 2011). Se ha observado que el aumento intracelular de Ca^{2+} , también conduce a una serie de modificaciones en los lípidos como la formación

de segundos mensajeros, que se incorporan a una cascada de acontecimientos que ocurre durante la reacción acrosomal y la activación de determinadas enzimas como una fosfolipasa A₂, específica de la fosfatidilcolina, que generan lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico, sustancias conocidas por sus propiedades de fusión necesarias en la reacción acrosomal (Arenas et al., 2010). El acrosoma, las mitocondrias y posiblemente restos de la envoltura nuclear pueden actuar como depósitos intracelulares de Ca²⁺, puesto que los espermatozoides carecen de un retículo endoplásmico (Darszon et al., 2011).

2.16.- Reconocimiento espermático de la zona pelúcida

Después de pasar por el cumulus oophorus, los espermatozoides se encuentran con la zona pelúcida, último obstáculo antes de encontrarse con el óvulo (Ikawa et al., 2010). La fertilidad espermática en los mamíferos es preparada por la unión de zona y la exocitosis acrosomal tras la capacitación espermática (Sutovsky et al., 2010).

El recubrimiento ovocitario de los mamíferos es la zona pelúcida, su función es la protección de los ovocitos, la unión del espermatozoides, la fertilización específica de especie y defensa antipoliespérmica. El actual modelo de la estructura de la zona del ratón propone una organización de fibras paralelas de heterodímeros de ZP2-ZP3 entrecruzada con moléculas de ZP1 (Sutovsky et al., 2010).

Los componentes principales de la ZP son tres proteínas glicosiladas, Zp1, Zp2, y ZP3. Hay varios informes que indican que ZP3 funciona como receptor espermático primario y que puede inducir la reacción acrosomal. Zp2 se cree que funciona como un receptor secundario para espermatozoides con acrosoma reaccionado. En óvulos fertilizados, Zp2 se convierte en Zp2f por una enzima (s) secretada por el ovocito para evitar una mayor unión de espermatozoides que fertilicen al óvulo. Zp1 se cree que reticula heterodímeros de Zp2/ZP3 y crea la estructura filamentosa de la ZP. ZP4 ha sido identificada en algunas especies, incluyendo los humanos, pero su función (s) específicas de especie queda por determinar (Ikawa et al., 2010).

En la superficie de zona, uno o más receptores en la membrana plasmática del espermatozoide, como ZP3R, proteína de la matriz acrosomal implicada en la unión espermatozoide-ZP3 identificada en ratones desencadenan vías de señalización que median la entrada de Ca^{2+} externo en el acrosoma y movilizan Ca^{2+} interno dentro del acrosoma. La señalización calcio-dependiente a continuación desencadena la vesiculación de la membrana acrosomal externa, que permanece asociada al espermatozoide en forma de un recubrimiento acrosomal. Las proteínas de la matriz acrosomal parecen ser liberadas en etapas en lugar de ser expulsadas al mismo tiempo; posiblemente creando un microambiente para que las enzimas acrosomales actúen en la zona pellucida por debajo de la cabeza del espermatozoide. La exocitosis acrosomal elimina algunas proteínas de la matriz acrosomal mientras que expone otras proteínas sobre la membrana acrosomal interna (IAM). Impulsada por la motilidad hiperactivada del flagelo espermático la cabeza del espermatozoide progresa a través de la ZP, dejando atrás la hendidura de fertilización fuertemente grabada (Sutovsky et al., 2010).

2.16.1.- La membrana espermática durante la reacción acrosomal.

2.16.1.1.- Proteínas G

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas, compuesto de un subunidad $G\alpha$ y un dímero $G\beta\gamma$. La activación de la subunidad α promueve el intercambio del GDP unido por GTP. Posteriormente, la unión del GTP altera la topología dentro de la subunidad $G\alpha$, liberando a ambas, a la subunidad α activa y al dímero $\beta\gamma$ de la anteriormente inactiva proteína G trimérica. Por separado, tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ actúan sobre diferentes efectores, tales como fosfodiesterasas, fosfolipasas, canales iónicos y adenilatociclasas transmembranales. (Buffone et al., 2014)

2.16.1.2.- Inducción de la reacción acrosomal

Se sabe que la RA puede ser inducida *in vitro* por diversos constituyentes del tracto reproductor femenino, que incluyen progesterona, prostaglandinas, péptido natriurético,

factor de crecimiento epidermal (EGF), ouabaína, y otros ligandos (Michailov et al., 2014). La adición de progesterona al medio ejerce un efecto positivo sobre el eflujo de colesterol de la membrana espermática, la hiperactivación, y la reacción acrosomal (García-Álvarez et al., 2015).

2.16.1.3.- Unión y fusión con el oolema

La fertilización ocurre cuando el espermatozoide y el óvulo se reconocen entre sí y se fusionan para formar un nuevo organismo genéticamente distinto. La base molecular del reconocimiento esperma-óvulo requiere de interacciones entre proteínas receptoras mostradas en su superficie. Izumo1 es una proteína esencial de la superficie celular del espermatozoide, el receptor para Izumo1 es el receptor de folato 4 (Folr4) en el óvulo, llamado Juno. El desprendimiento rápido de Juno del oolema después de la fertilización se sugiere como un mecanismo para el bloque membranar de la poliespermia, asegurando de manera normal que el ovocito se fusione con un solo espermatozoide (Bianchi et al., 2014).

Izumo se relocaliza desde el acrosoma anterior, donde se encuentra en espermatozoides intactos, hacia otras regiones en la cabeza, que participan en la fusión con la membrana plasmática de ovocito. La proteína Tssk6, un miembro de la familia de las serina quinatas testículo-específica, es necesaria para el movimiento de Izumo y su papel está mediada por el citoesqueleto de actina (Darszon et al., 2011).

La fertilización es el evento culminante en la reproducción sexual y requiere de la fusión de espermatozoides y óvulos haploides para crear un nuevo, genéticamente distinto, organismo diploide. Una vez fertilizado, tanto el oolema y zona pelúcida son bioquímicamente alterados, haciendo al óvulo poco receptivo a los espermatozoides adicionales y reduciendo así las posibilidades de la creación de embriones poliploides no viables. Izumo1 (nombre del santuario matrimonial japonés) es redistribuido en la superficie de espermatozoides capacitados. Los receptores anclados glicofosfatidilinositol - (GPI) en el ovocito son esenciales para la fertilización. El receptor de folato 4 (Folr4), es una proteína de anclaje GPI expresada en la superficie del óvulo que es esencial para la

fertilidad femenina el nombre a esta proteína 'Juno' diosa romana de la fertilidad y el matrimonio (Bianchi et al., 2014).

Después de la fecundación, los ovocitos se vuelven en gran medida refractarios a otros eventos de fusión espermática para evitar la creación de embriones poliploides no viables debido a poliespermia. Esto se logra a través tanto de un bloqueo de acción relativamente de (> 1 h) por endurecimiento de la zona pelúcida causado por la acción de enzimas liberadas a partir de los gránulos corticales después de la activación del ovocito, y por la despolarización eléctrica del oolemma. En los mamíferos, el bloqueo de la membrana se produce durante un período de tiempo más largo (30 a 45 min)(Bianchi et al., 2014).

Juno se pierde rápidamente de la superficie celular después de la fertilización, Juno no se internaliza después de la fertilización pero está presente en vesículas extracelulares, presumiblemente derivadas del oolemma rico en microvellosidades que sufre cambios arquitectónicos importantes tras la fertilización. El rápido desprendimiento de Juno de la membrana del ovocito en vesículas después de la fertilización proporciona por lo tanto un posible mecanismo para el bloqueo membranar de la poliespermia en ovocitos de mamíferos (Bianchi et al., 2014).

Hipótesis.

Los procesos de capacitación, reacción acrosomal y asimetría fosfolipídica inducidos in vitro en espermatozoides de borrego doméstico (*Ovis aries*) de electroeyaculado y de cola de epidídimo en fresco y descongelado, se presentan de forma diferencial.

Objetivo general.

Estudiar la ocurrencia de cambios en la membrana plasmática de espermatozoides de borrego doméstico (*Ovis aries*) en fresco y al descongelado durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal.

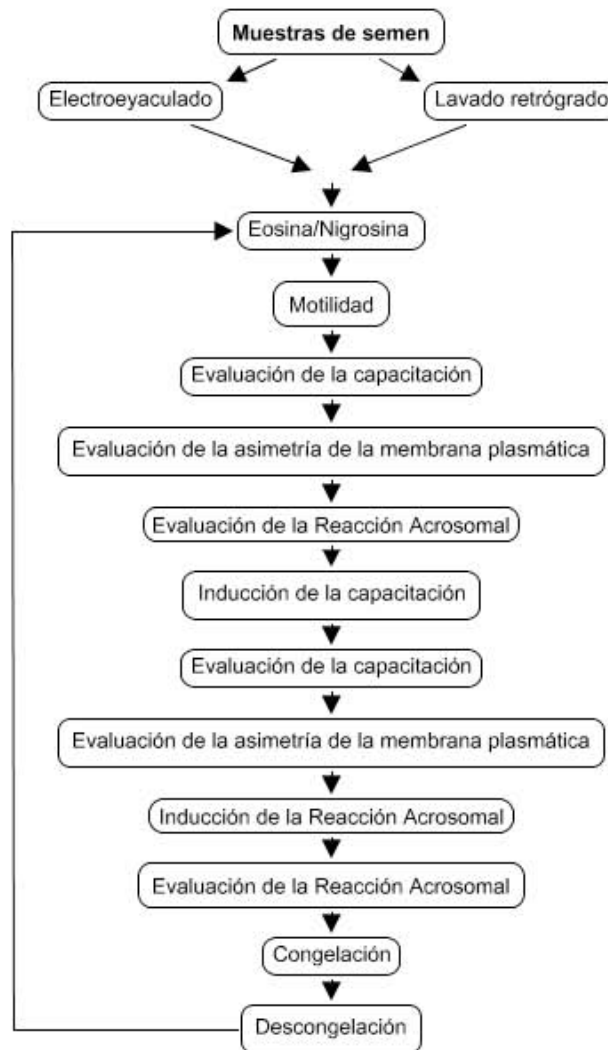
Objetivos particulares.

Detectar la ocurrencia de la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática del espermatozoide de borrego doméstico (*Ovis aries*) durante la capacitación y la reacción acrosomal.

Conocer la distribución topológica de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de borrego doméstico (*Ovis aries*) durante la capacitación y la reacción acrosomal.

3.- Material y Métodos

Para la realización del presente trabajo se utilizó el semen de 14 machos en edad adulta, se dividieron en 2 grupos de 7 individuos para la evaluación de semen obtenido por el método de electroeyaculación y 7 para la evaluación de espermatozoides obtenidos mediante lavado retrógrado de cauda epididimal, en los que se evaluó el estado de capacitación y reacción acrosomal.



Esquema 1. Flujograma del procesamiento de las muestras obtenidas por los diferentes métodos.

3.1.- Obtención de semen por electroeyaculación

Antes de la electroeyaculación, los animales fueron restringidos de alimento y sedados con Xilazina (5 mg/kg) (Borzan et al., 2011), durante la estimulación el animal se mantuvo recostado sobre su lado derecho para facilitar la colección de la muestra de semen y la toma del registro cardiaco y respiratorio (Boussena et al., 2013). El recto se limpió de heces y la zona del prepucio se lavo con solución salina fisiológica (Álvarez et al., 2012), la sonda del electroeyaculador se lubrico, y se inserto suavemente en el recto del animal entre 15-20 cm de profundidad (Nikolovski et al., 2012), en dirección craneal y ligeramente hacia el piso de la pelvis, con movimientos rotatorios para lograr el contacto con las glándulas accesorias (Boussena et al., 2013), se enderezó manualmente la flexura sigmoidea y se extendió el glande del pene fuera del prepucio para fijarse con una gasa estéril (Nikolovski et al., 2012), después de la exteriorización del pene de su vaina, se suministraron entre 3 y 5 pulsos eléctricos de 9 voltios con duración de 2-5 segundos, alternados con períodos de descanso de 5 segundos, de manera consecutiva, hasta que se obtuvo el eyaculado (Boussena et al., 2013), el cual se colectó en un tubo estéril (Nikolovski et al., 2012).

3.2.- Obtención de los espermatozoides epididimales

Para este procedimiento se utilizaron muestras de animales de rastro. Se tomaron los testículo y se les disectó el epidídimo, este fue limpiado de vasos sanguíneos, mediante un corte cerca de la unión del corpus y la cauda proximal. Se aisló del resto de la estructura la cola del epidídimo junto con el conducto deferente. A continuación se llevo a cabo el lavado retrógrado del conducto deferente y la cola del epidídimo, utilizando una jeringa cargada con 3 ml de extensor para semen e introduciendo una cánula en el conducto deferente, usando una aguja roma 21G. Los conductos deferentes y la cola del epidídimo se perfundieron con el extensor, después se inyectó aire, hasta que todos los conductos del la cola del epidídimo se vaciaron. La muestra se colectó en un tubo de plástico, en ocasiones fue necesario hacer cortes adicionales en la cola del epidídimo con el fin de permitir que emergiera mejor el fluido (Martinez-Pastor et al., 2006).

3.3.- Evaluación espermática básica.

Una vez obtenido el eyaculado se evaluó primero el volumen y el color, para posteriormente hacer una dilución de semen 1:1 (v/v semen: extensor) a 37 °C para la posterior evaluación de la concentración y la motilidad. El movimiento de oleadas del semen se clasificó en una escala subjetiva que varía de 1 a 5, donde se considera número uno cuando no hay movimiento en masas y al número cinco para representar el movimiento de los espermatozoides con oleadas vigorosas (Rodrigues et al., 2013). La evaluación del porcentaje de motilidad progresiva se realizó de manera subjetiva tomando una pequeña gota del eyaculado, el cual se colocó en un portaobjetos a 37°C para ser observada en un microscopio óptico, en el que se determinó el porcentaje de motilidad progresiva (Brito et al., 2004). Se utilizaron sólo los eyaculados con motilidad progresiva superior al 80% (Câmara et al., 2011).

La concentración espermática se determinó usando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, para este método se diluyeron 10 µl del semen fresco en 1990 µl de solución de NaCl al 3%, haciendo una dilución con relación 1:200 (Nikolovski et al., 2012). 20 µl de la muestra diluida se colocaron debajo del cubreobjetos con que se cubrió la cámara de Neubauer, y se dejaron reposar por 2 minutos hasta que las células se estabilizaron en los campos para hacer el conteo sobre 5 cuadrados diagonales, o los de las esquinas y el del centro, en el microscopio con el objetivo 40 X. Al número de espermatozoides contados se le agregó un cero y se multiplicaron por 10^6 , ese número correspondió a la concentración de espermatozoides por mililitro de muestra (Pichardo et al., 2004). El número total de espermatozoides eyaculados se calculó multiplicando la concentración espermática por el volumen del eyaculado (Rodrigues et al., 2013).

La evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos se estimó mediante el uso de la tinción eosina/nigrosina recomendada por Swanson, en la cual se mezclaron; 1g de eosina B y 5g de nigrosina en 100 ml de agua bidestilada con 3% de citrato de sodio (deshidratado), esta se mantuvo en refrigeración, pero fue calentada a temperatura ambiente antes de ser utilizada para la tinción (Swanson et al., 1951). Finalmente el portaobjetos se colocó de nuevo en la termoplatina durante algunos minutos y luego se conservó a temperatura ambiente hasta que se realizó la evaluación (Foster et al., 2011).

Se evaluaron al menos 100 espermatozoides (Nikolovski et al., 2012), en un microscopio óptico con el objetivo de 40X, (Hernández et al., 2012). Espermatozoides que se muestran teñidos parcial o completamente en color púrpura se consideran no viables y de manera contraria los que presentan una estricta exclusión de la tinción se cuentan como viables (Najafi et al., 2013).

Patrón de tinción de espermatozoides viables con eosina nigrosina

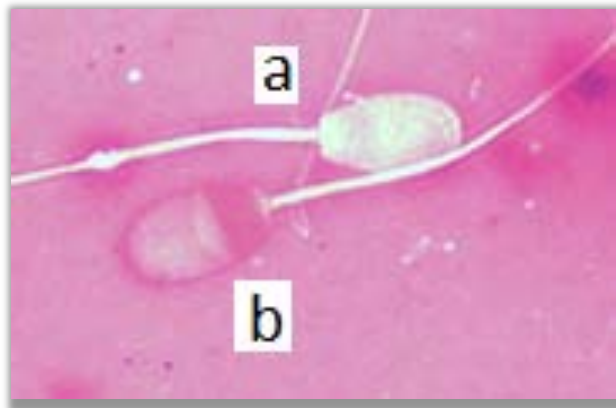


Figura 1.- Se observa el patrón de tinción de espermatozoides vivos (a) y muertos (b).

3.4.- Congelación

Para este proceso se utilizó un medio basado en tris-ácido cítrico, el cual contiene Tris (hidroximetil-metilamina) (2.9 g), Fructuosa (1.25 g), Acido Cítrico (1.32 g), Glicerol 6% (v/v), estreptomycin (1 mg/ml), penicilina (100 UI/ml) y yema de huevo 20% (v/v), diluidos en 100 ml de agua bidestilada, (González-Santos et al., 2013) el cual se calentó en baño maría a 37 °C, para la preservación de semen colectado mediante el método de electroeyaculación. Posteriormente, en función de la concentración espermática que presentaron los eyaculados se determinó, el número de pajillas a congelar a concentración de 100×10^6 espermatozoides por pajilla, las cuales se envasaron en pajillas francesas de 0.5 ml, recomendadas para el caso de ovinos (Cabrera et al., 2011), estas se sellaron con polvo de acetato de polivinilo se enfriaron a 5 °C durante 2 h como periodo de equilibrio. Posteriormente el proceso de congelación se realizó colocando las pajillas de semen sobre vapor de nitrógeno en una hielera de unicel durante 8 min 4 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, aproximadamente a -90 °C y finalmente se

precipitaron en el nitrógeno líquido (Mejia et al., 2009) a -196 °C. Para su almacenamiento durante al menos 2 semanas antes del análisis (Peris et al., 2004).

3.5.- Descongelación

El descongelado de las pajillas se realizó en baño María a 37 °C por 20s (Baspinar et al., 2011), para su utilización en capacitación *in vitro*, mediante la previa evaluación la viabilidad del semen con la tinción de Eosina - Nigrosina (Swanson et al., 1951).

3.6.- Preparación del medio capacitante

El medio capacitante fue preparado sobre la base del medio tris-ácido cítrico más heparina 10 µg/ml y albúmina sérica bovina 3 mg / ml (Kato et al., 2000).

3.7.- Capacitación *in vitro*

Después de la descongelación y evaluación de la viabilidad, se realizó un lavado para separar el plasma seminal y retirarlo de la muestra (Bernardini et al., 2011). En un vial de 1.5 ml se colocaron 150 µl de la muestra de semen con 850 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 3 g/l de BSA a 37.5 °C y se centrifugó a temperatura ambiente a 2000 g por 40 s en una centrifuga (Mini-Centrífuga "SPROUT®" modelo 5020250), se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de la solución con fosfato y nuevamente se centrifugó la muestra. Finalmente se resuspendió el pellet en 1 ml de medio capacitante, precalentado a 38.5 °C y se llevó a incubación a 38.5 °C, bajo una atmósfera humidificada (95%) con 5% de CO₂ en aire (Shokrollahi et al., 2014), por 2 h, considerado como condiciones de capacitación estándar (Perez et al., 1996)

3.8.- Prueba de fluorescencia CTC.

Después de dos horas de incubación en el medio capacitante, se realizó la tinción de Clortetraciclina (CTC), para esto se prepararon 750 µl CTC (Sigma) en medio amortiguados basado en de Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5 mM, pH final 7.8. De la

suspensión de espermatozoides a evaluar se tomaron 5 μ l y se mezclaron con 5 μ l de la solución de CTC en un portaobjetos; después de 30 segundos, se cubrió con un cubreobjetos. Las laminillas se mantuvieron en un contenedor protegidas de luz en un ambiente húmedo hasta que se examinaron mediante el uso de un microscopio equipado con fase de contraste y óptica epifluorescente (Fraser et al., 1990). Esta prueba permitió evaluar fluctuaciones de calcio mediante el uso del antibiótico fluorescente CTC (Sancho 2013), donde se pudieron observar y clasificar en tres patrones diferentes. CTC-F: no capacitados, estos presentaron fluorescencia uniforme en la cabeza, CTC-B: capacitados, en la cabeza estos presentaron una banda libre de fluorescencia en la región post-acrosomal, y CTC-AR: acrosoma reaccionado, estos no presentaron fluorescencia en la cabeza o presentaron una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial (Najafi et al., 2013).

Patrón de tinción de espermatozoides capacitados y no capacitados.

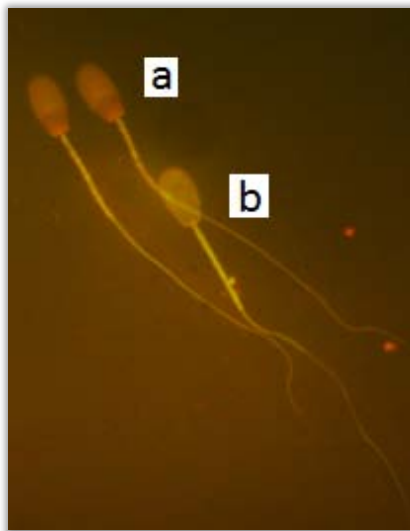


Figura 2- Se observa el patrón de tinción cuando el espermatozoide está capacitado (a) y cuando no lo está (b), es importante resaltar que cuando el espermatozoide no está capacitado presenta una fluorescencia homogénea en toda la cabeza, mientras que cuando esta capacitado presenta un patrón mas oscuro en la región postecuatorial.

3.9.- Inducción de la reacción acrosomal

La reacción acrosomal se indujo agregando a una alícuota de 100 μ l de la muestra

incubada para la capacitación, 10 μ l de progesterona (3.18 mM concentración final en DMSO 0.1%), y se incubó por 60 minutos a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ / 95% de aire y 95% de humedad relativa (Mayren-Mendoza et al., 2012).

3.9.1.-Evaluación de la reacción acrosomal mediante Azul Brillante de Coomassie (BBC)

La evaluación de la integridad acrosomal se realizó por medio de la tinción de Azul de Coomassie. Se colocaron 4 μ l de muestra en un portaobjetos, al cual previamente se le aplicó polilisina al 1%, el frotis se secó al aire y se incubó en la tinción preparada con 0.22%, w/v azul de Coomassie G-250, 50% metanol, 10% ácido acético glacial y 40% de agua, durante 40 min a temperatura ambiente (Ahmad et al., 2013), para su posterior evaluación, en un microscopio a 40 X (González-Santos et al., 2013). El criterio que se empleó en éste método fue la observación de la tinción azul sobre el acrosoma en espermatozoides con acrosoma intacto, en cambio los espermatozoides reaccionados no se tiñeron en la región acrosomal estos últimos fueron considerados como espermatozoides con reacción acrosomal prematura o daño acrosomal, cuando el patrón de tinción se presentó en muestras que no habían sido sometidas a la acción de la progesterona (Feng et al., 2007).

Patrón de tinción de espermatozoides con reacción acrosomal.

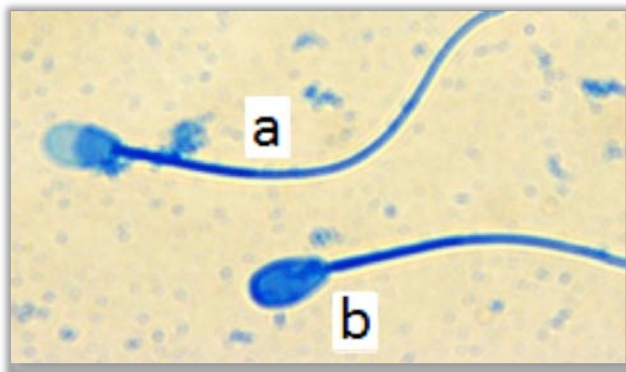


Figura 3.- Se observa el patrón de tinción cuando el espermatozoide está reaccionado (a) y cuando no lo está (b), es importante resaltar que cuando el espermatozoide no está reaccionado se tiñe de azul de manera homogénea, mientras que cuando está reaccionado presenta un patrón más claro en la región acrosomal.

3.10-Prueba de translocación de fosfatidilserina

Para el análisis de translocación de fosfatidilserina se utilizó Anexina – V (Kit de tinción Annexin V FITC A9210 SIGMA) marcada con isotiosanato de fluoresceína. Se tomaron 10 μ l de los espermatozoides capacitados y se les adicionaron 10 μ l de Anexina V y se incubaron durante 15 min a 37 °C en ausencia de luz, se colocaron en el portaobjetos y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica (Leica Microsystem, Alemania) usando un filtro de longitud de onda de 488 nm. Los espermatozoides con desorden en la membrana exhibieron fluorescencia verde, mientras que los espermatozoides intactos permanecieron sin teñir (Lukac et al., 2011),

Patrón de fluorescencia de espermatozoides positivos a Anexina V.

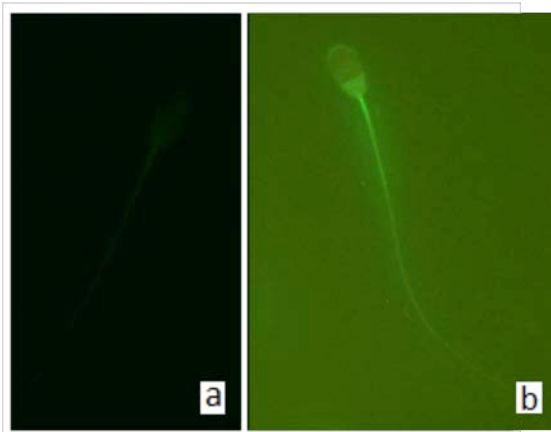
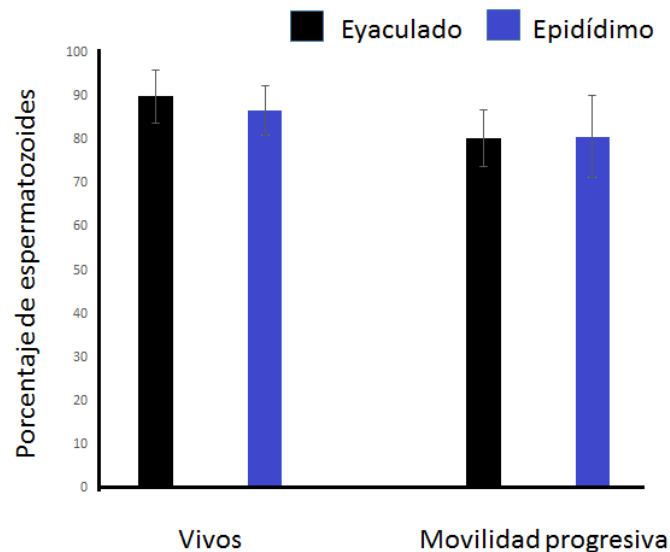


Figura 4.- No se observa el patrón de fluorescencia cuando no está expuesta la fosfatidilserina (a), cuando se presenta el patrón de fluorescencia el espermatozoide expone fosfatidilserina (b), es importante resaltar que cuando el espermatozoide expone fosfatidilserina, la Anexina V unida al isotiocianato de fluoresceína fluoresce y por lo tanto el espermatozoide se ve de color verde, mientras que cuando no se presenta la exposición de la fosfatidilserina no hay fluorescencia.

4.-Resultados

Los resultados que se presentan en todas las gráficas son el promedio y la desviación estándar las replicas n=7.

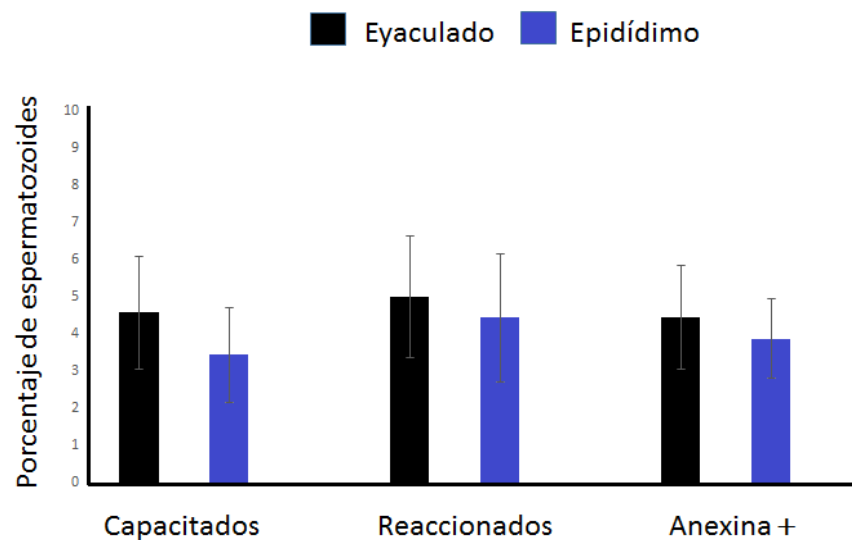
El porcentaje de espermatozoides vivos y movilidad progresiva se representa en la gráfica 1, haciendo la comparación entre muestras en fresco obtenidas de electroeyaculado y de cola de epidídimo. El porcentaje de espermatozoides vivos en electroeyaculado fue de 89.9 ± 5.98 mientras que en muestras de cola de epidídimo de 86.7 ± 5.68 . En cuanto a los porcentajes de movilidad progresiva los resultados fueron: para electroeyaculado 80.3 ± 6.58 y para cola de epidídimo 80.7 ± 9.39 .



Gráfica 1.- Porcentajes de espermatozoides vivos y su movilidad progresiva en muestras frescas de carnero (*Ovis aries*) obtenidas de electroeyaculado y cola de epidídimo (n=7).

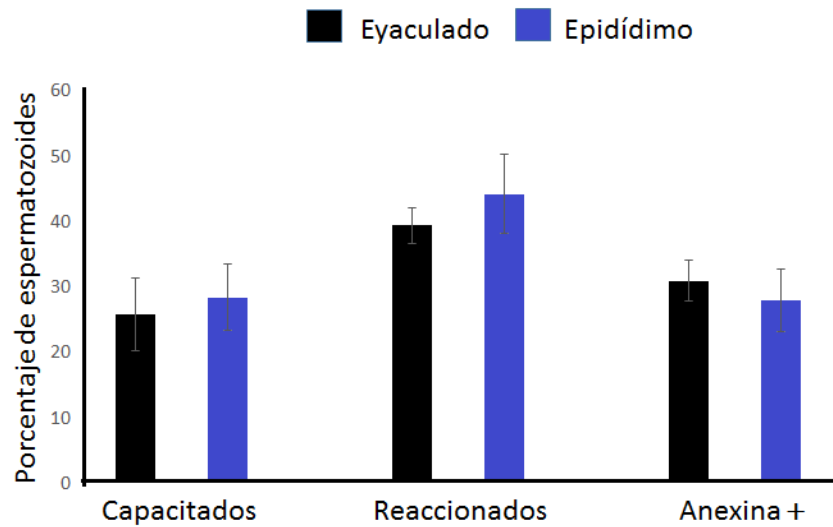
Los porcentajes de los espermatozoides en fresco que presentaron los patrones de fluorescencia (B+AR) como indicativo de para el ensayo de CTC, así como a reacción acrosomal (BBC) y anexina positiva se representan en la gráfica 2, haciendo una comparación entre el tipo de muestra (electroeyaculado y de cola de epidídimo). El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado de 4.6 ± 1.51 mientras que para cola de epidídimo 3.4 ± 1.27 , en cuanto a reaccionados para

electroeyaculado 5.0 ± 1.63 y para epidídimo 4.4 ± 1.72 , finalmente para los espermatozoides positivos a anexina fueron los siguientes: para electroeyaculado 4.4 ± 1.40 y para cola de epidídimo 3.9 ± 1.07 .



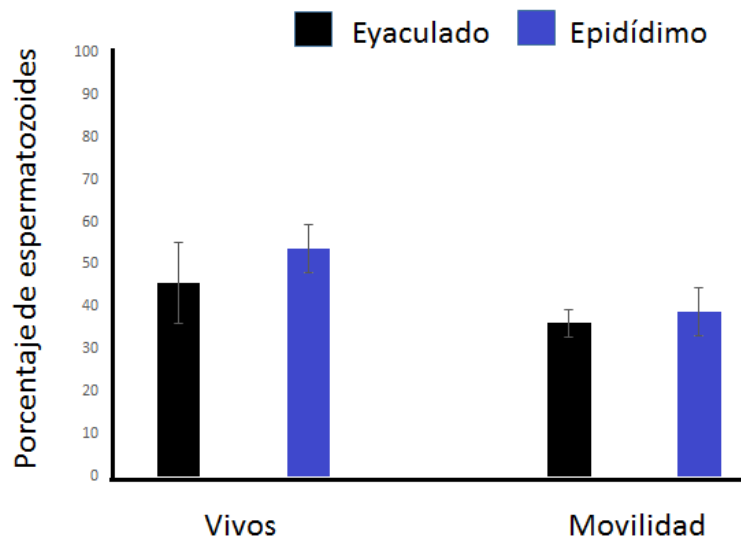
Gráfica 2.- Porcentajes de espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) capacitados (CTC, B+AR), con reacción acrosomal (BBC) y positivos a anexina en muestras en fresco, de eyaculado y cola de epidídimo (n=7).

Los porcentajes de los espermatozoides de muestras en fresco incubados (2 hrs) que presentaron alguno de los patrones de fluorescencia indicativos de capacitación (B+AR), así como reacción acrosomal y anexina positiva se representan en la gráfica 3, haciendo una comparación entre el tipo de muestra (electroeyaculado y de cola de epidídimo). El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado de 25.9 ± 5.55 y para cola de epidídimo 28.4 ± 5.03 , los espermatozoides de electroeyaculado con reacción acrosomal fue de 39.4 ± 2.76 y los de cola de epidídimo 44.3 ± 6.1 , el porcentaje de espermatozoides de electroeyaculado positivos a anexina v fue de 31.00 ± 3.2 y de cola de epidídimo de 28.0 ± 4.76 .



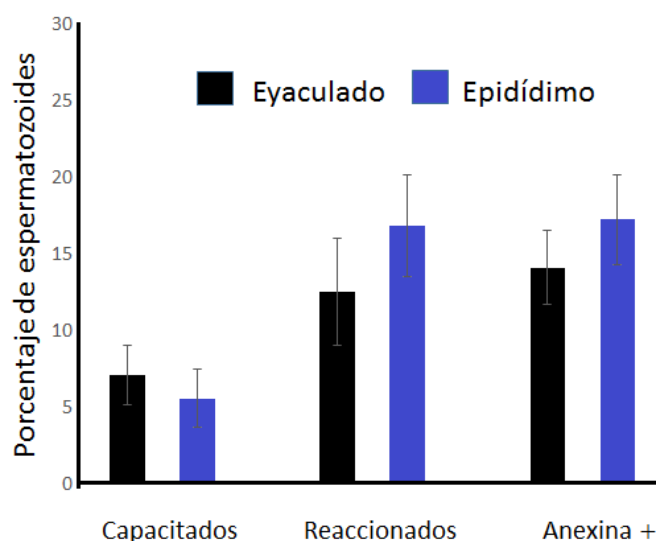
Gráfica 3.- En esta gráfica se representan los porcentajes de espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) capacitados, con reacción acrosomal y positivos a anexina V de muestras de electroeyaculado y cola de epidídimo en fresco e incubados (n=7).

Los porcentajes de espermatozoides vivos y movilidad progresiva se representa en la gráfica 4, haciendo la comparación entre muestras crioconservadas obtenidas de electroeyaculado y de cola de epidídimo. El porcentaje de espermatozoides vivos en electroeyaculado fue de 45.6 ± 9.54 mientras que en muestras de cola de epidídimo de 53.6 ± 5.65 . En cuanto a los porcentajes de movilidad progresiva los resultados fueron: para electroeyaculado 36.1 ± 3.24 y para cola de epidídimo 38.86 ± 5.58 .



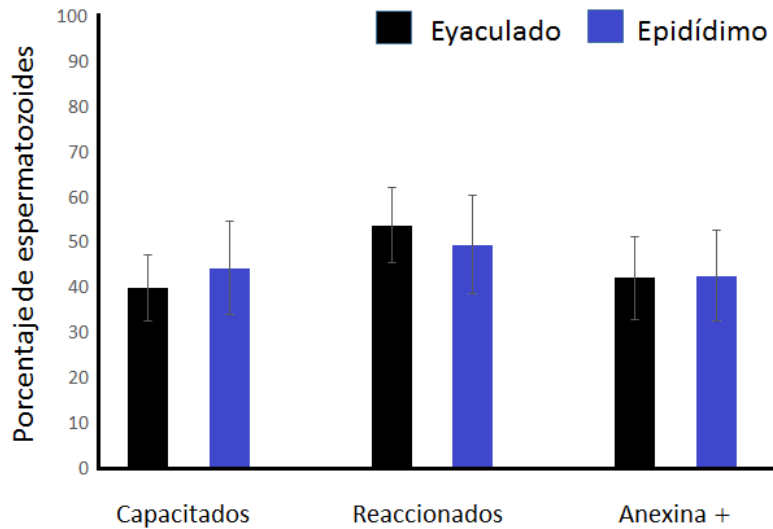
Gráfica 4.- En esta gráfica se representan los porcentajes de espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) vivos y su movilidad progresiva en muestras frescas obtenidas de cola de epidídimo y electroeyaculado crioconservados (n=7).

Los porcentajes de los espermatozoides criopreservados que presentaron patrón de fluorescencia indicativos de capacitación (B+AR), así como a reacción acrosomal y anexina positiva se representan en la gráfica 5, haciendo una comparación entre el tipo de muestra (electroeyaculado y cola de epidídimo). El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado de 7.1 ± 1.95 mientras que para los de cola de epidídimo 5.6 ± 1.90 , en cuanto a reaccionados para electroeyaculado 12.6 ± 3.05 y para los de cola de epidídimo 16.9 ± 3.29 , finalmente para los espermatozoides positivos a anexina fueron los siguientes: para electroeyaculado 14.1 ± 2.41 y para los de cola de epidídimo 17.3 ± 2.93 .



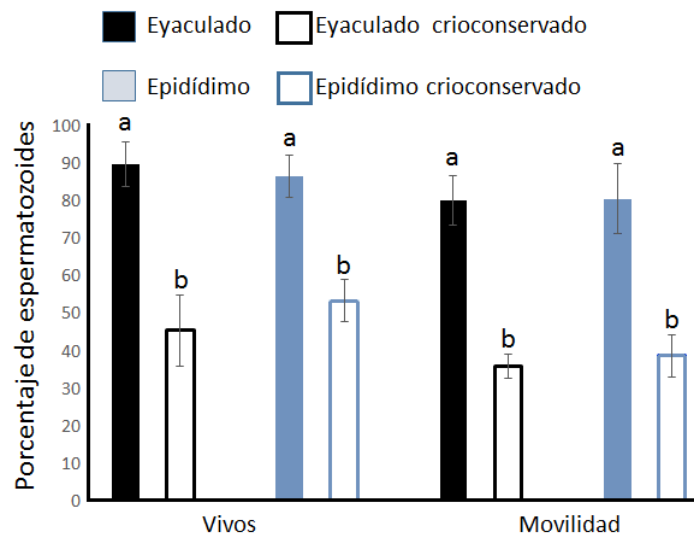
Gráfica 5.- En esta gráfica se representan los porcentajes de espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) capacitados, con reacción acrosomal y positivos a anexina en muestras crioconservadas de eyaculado y cola de epidídimo (n=7).

Los porcentajes de los espermatozoides crioconservados e incubados (2 hrs) que presentaron alguno de los patrones de fluorescencia indicativos de capacitación (B+AR), así como reacción acrosomal y anexina positiva se representan en la gráfica 6, haciendo una comparación entre el tipo de muestra (electroeyaculado y de cola de epidídimo). El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado de 40.0 ± 7.26 y para cola de epidídimo 44.4 ± 10.31 , los espermatozoides de eyaculado con reacción acrosomal fue de 53.9 ± 8.32 y los de cola de epidídimo 49.6 ± 10.91 , el porcentaje de espermatozoides de electroeyaculado positivos a anexina fue de 42.1 ± 9.26 y de cola de epidídimo de 42.7 ± 12.91 .



Gráfica 6.- En esta gráfica se representan los porcentajes de espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) capacitados, con reacción acrosomal y positivos a anexina en muestras crioconservadas e incubadas de eyaculado y cola de epidídimo (n=7).

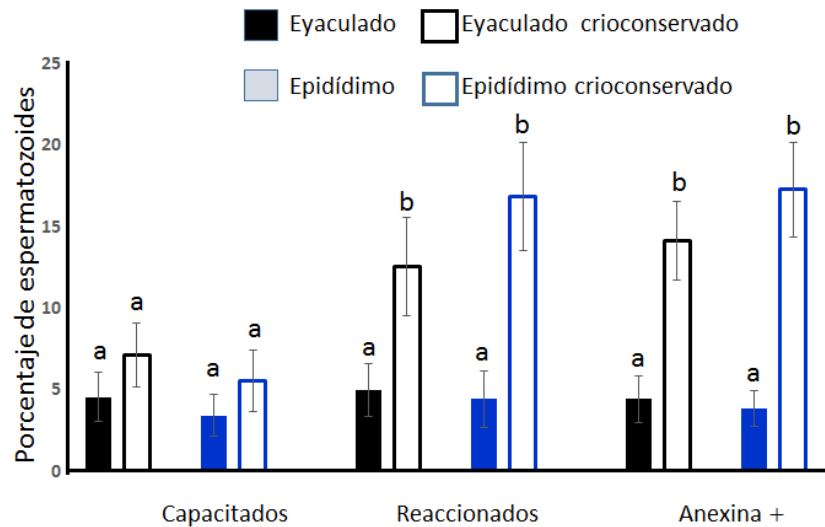
El porcentaje de espermatozoides vivos y movilidad progresiva haciendo la comparación entre muestras en fresco y crioconservadas obtenidas de electroeyaculado y de cola de epidídimo se representa en la gráfica 7. El porcentaje de espermatozoides vivos en electroeyaculado en fresco fue mayor significativamente ($p < 0.05$) que de electroeyaculado crioconservados (89.9 ± 5.98 y 45.6 ± 9.54 respectivamente), de igual forma los espermatozoides de cola de epidídimo en fresco también fueron significativamente mas altos ($p < 0.05$) que los de cola de epidídimo crioconservados (86.7 ± 5.68 y 53.6 ± 5.65 respectivamente). La movilidad progresiva fue mayor en espermatozoides de electroeyaculado en fresco (80.3 ± 6.58) con respecto a los de electroeyaculado crioconservados (36.1 ± 3.24). También se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo en fresco en comparación con los de cola de epidídimo crioconservados (80.7 ± 9.39 y 38.9 ± 5.58 respectivamente).



Gráfica 7.- En esta gráfica se representa el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad y movilidad progresiva de los espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) de eyaculado y de cola de epidídimo, Literales diferentes señalan diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los porcentajes de los espermatozoides de electroeyaculado y de cola de epidídimo que presentaron patrón de fluorescencia indicativos de capacitación (B+AR), así como a reacción acrosomal y anexina positiva se representan en la gráfica 8, haciendo una comparación entre muestras en fresco y criopreservadas. El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado en fresco de 4.6 ± 1.51 mientras que para los de electroeyaculado criopreservados 7.1 ± 1.95 ; en cuanto a los espermatozoides de cola de epidídimo en fresco el porcentaje de capacitados fue de 3.4 ± 1.27 mientras que de los de cola de epidídimo criopreservados de 5.6 ± 1.90 , al hacer la comparación entre espermatozoides de electroeyaculado y de cola de epidídimo en fresco con respecto a criopreservados no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Los espermatozoides de electroeyaculado en fresco con reacción acrosomal fue de 5.0 ± 1.63 siendo menor significativamente ($p < 0.05$) al compararlo con los de electroeyaculado criopreservados 12.6 ± 3.05 . De igual forma los espermatozoides con reacción acrosomal de cola de epidídimo en fresco fue menor ($p < 0.05$) que los de cola de epidídimo criopreservados (4.4 ± 1.72 y 16.9 ± 3.29 respectivamente). Finalmente para los

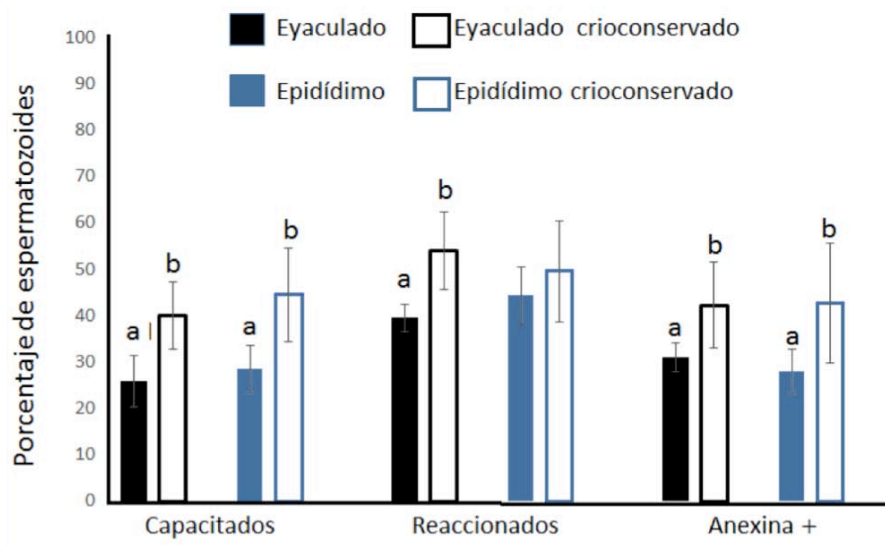
espermatozoides positivos a anexina fueron los siguientes: para electroeyaculado en fresco 4.4 ± 1.40 y electroeyaculado crioconservados 14.1 ± 2.41 presentando diferencia estadística ($p < 0.05$), en los espermatozoides de cola de epidídimo en fresco, el porcentaje de positivos a anexina fue 3.9 ± 1.07 y 17.3 ± 2.93 para los de cola de epidídimo crioconservados siendo diferentes estadísticamente.



Gráfica 8.- En esta gráfica se representa el efecto de la crioconservación sobre la criocapacitación y reacción acrosomal prematura y asimetría fosfolípida, en espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) de electroeyaculado y de cola de epidídimo, literales diferentes señalan diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los porcentajes de espermatozoides de electroeyaculado y de cola de epidídimo incubados que presentaron patrón de fluorescencia indicativos de capacitación (B+AR), así como a reacción acrosomal y anexina positiva se representan en la gráfica 9, haciendo una comparación entre muestras en fresco y crioconservadas. El porcentaje de espermatozoides capacitados fue para electroeyaculado en fresco de 25.9 ± 5.55 mientras que para los de electroeyaculado crioconservados 40.0 ± 7.26 , siendo mas altos estos últimos significativamente ($p < 0.05$); en cuanto a los espermatozoides de cola de epidídimo en fresco el porcentaje de capacitados fue menor ($p < 0.05$) 28.43 ± 5.03 en comparación de los de cola de epidídimo crioconservados 44.4 ± 10.31 . Los espermatozoides de electroeyaculado en fresco e incubados con reacción acrosomal fue de 39.43 ± 2.76 siendo menor significativamente ($p < 0.05$) al compararlo con los de

electroeyaculado crioconservados e incubados 53.9 ± 8.32 . En los espermatozoides con reacción acrosomal de cola de epidídimo en fresco e incubados no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a los de cola de epidídimo crioconservados e incubados (44.3 ± 6.1 y 49.6 ± 10.91 respectivamente). Finalmente para los espermatozoides positivos a anexina fueron los siguientes: para electroeyaculado en fresco e incubados 31.0 ± 3.164 y electroeyaculado crioconservados e incubados 42.1 ± 9.26 presentando diferencia estadística ($p < 0.05$), en los espermatozoides de cola de epidídimo en fresco e incubados, el porcentaje de positivos a anexina fue 28.0 ± 4.76 y de 42.7 ± 12.91 para los de cola de epidídimo crioconservados e incubados siendo diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).



Gráfica 9.- En esta gráfica se representa el efecto de la crioconservación sobre la capacitación y reacción acrosomal prematura y asimetría fosfolípídica, en espermatozoides de carnero (*Ovis aries*) de electroeyaculado y de cola de epidídimo incubados. Literales diferentes señalan diferencia estadística ($p < 0.05$).

5.-Discusión

En este estudio, se evaluó el efecto sobre la calidad espermática, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides de carnero obtenidos mediante electroeyaculación y lavado retrogrado de cola de epidídimo, tras la criopreservación e incubación *in vitro* en un medio capacitante. Tomando en cuenta que la electroeyaculación es una excelente opción para los animales incapacitados para la monta o que no han sido entrenados para eyacular en la vagina artificial, mientras que la colección postmortem es un método de emergencia que puede ser utilizado cuando los machos valiosos mueren repentinamente (García-Álvarez et al., 2009).

La fertilización es el proceso por el cual los espermatozoides y el óvulo se unen para producir un individuo genéticamente distinto a todos los demás (Florman et al., 2015), dicho de otra forma, dos células al borde de la muerte (apoptosis) de las cuales va a surgir una nueva vida (Velayos et al., 2000). Para que esto sea posible deben encontrarse en condiciones específicas dentro de un espacio tiempo específico en el tracto reproductor femenino (Breininger et al., 2010) *in vivo*, o a nivel de laboratorio *in vivo*.

Para que un espermatozoide adquiera su capacidad de fertilizar, es necesario que experimente diferentes procesos fisiológicos, además de contar con ciertas características. Los principales procesos son adquirir su maduración, la cual ocurre durante su tránsito por la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, ya en la región caudal, los espermatozoides adquieren su forma definitiva y la capacidad de movimiento, algunos experimentos *in vitro* también han demostrado su capacidad de penetrar ovocitos desnudos. Una vez madurados, los espermatozoides sólo esperan el proceso de eyaculación para ser depositados en el tracto reproductor femenino donde realizarán la capacitación y posteriormente la reacción acrosomal, los espermatozoides dañados son fagocitados por las células basales, estas son un tipo de macrófagos que se encuentran adyacentes a la lámina basal del epidídimo y exhiben propiedades estructurales y antigénicas típicas de los macrófagos (Hedger 2015). La capacitación espermática se lleva a cabo cuando el semen es depositado en la vagina en ciertas especies como en los ovinos y se mezcla con el moco uterino, lo que hace que los espermatozoides cambien de medio. Se sabe que en el moco uterino se encuentran diversas sustancias, que favorecen la salida del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, entre

las que destaca la albúmina (Sutovsky et al., 2010). Los principales cambios en el espermatozoide durante dicho proceso son la adquisición de una hipermovilidad, alteraciones en la membrana plasmática como la pérdida de glicoproteínas, lipoproteínas, algunos fosfolípidos, activación de diversos canales entre los que destacan los de Ca^{2+} , dependientes de voltaje y otros más, consumo de oxígeno y algunos nutrientes como fructosa (Leahy et al., 2011), así como también se ha reportado la pérdida de la asimetría fosfolípida entre otros procesos. Una vez realizada la capacitación espermática, solo aquellos espermatozoides que pasaron por este proceso podrán llevar a cabo la reacción acrosomal, cuando entran en contacto con la zona pelúcida. La reacción acrosomal se resume como la continuación de los cambios membranales que permiten la unión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa (Baltierrez-Hoyos et al., 2012) en diversos puntos, seguida de la formación de poros y la salida del contenido acrosomal que permitirá la penetración del ovocito.

Uno de las primeras características que debe de cumplir un espermatozoide para tener la posibilidad de fecundar un ovocito, es que esté vivo. La OMS (1999), menciona que en el caso de semen humano normal, debe tener al menos un 75% de espermatozoides vivos; en ovino y carnero se ha reportado que un porcentaje adecuado de espermatozoides vivos debe de ser mayor a 70% (Aguado *et al.*, 1994). En los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que tanto en espermatozoides de electroeyaculado como de cola de epidídimo en fresco los porcentajes de viabilidad están por arriba de lo recomendado en la bibliografía (ambas muestras presentaron un porcentaje mayor al 80%). Es importante resaltar que al hacer la comparación entre espermatozoides de electroeyaculado con respecto a los obtenidos de cola de epidídimo (gráfica 1) no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Otro de los requisitos indispensables que debe de cubrir el espermatozoide para llegar a fecundar, es la movilidad. Existe una gran diferencia entre las especies, referente a la movilidad progresiva normal o aceptable, por ejemplo en ovinos recomiendan el 80% (Cámara et al., 2011), para aprobar un examen de aptitud reproductiva, se recomienda que los eyaculados de toros tengan más de 30% de movilidad progresiva, los toros seleccionados como sementales más del 60% y los perros más de 70% (Larsson, 1996); los seres humanos suelen tener más del 50% (OMS, 1999). Cuando se evaluaron

espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo a diferentes tiempos *postmortem* mantenidos a 5°C, se encontró que a las 24 h el porcentaje de movilidad fue cercana a lo recomendado por la OMS, sin embargo a las 48 y 72 h se observó un drástico descenso (Tamayo-Canul *et al.*, 2011). En las muestras de electroeyaculado y cola de epidídimo que se analizaron en este trabajo, se obtuvieron resultados superiores al 80%, lo que determina que ambas muestras, fueron de muy buena calidad (gráfica 1), y conservan condiciones con potencial fertilizante para su uso en técnicas como inseminación artificial vía vaginal, inseminación intrauterina y fertilización *in vitro*.

Cuando los espermatozoides realizan el proceso de capacitación o reacción acrosomal prematura (espermatozoides con patrones similares a los de los espermatozoides capacitados o reaccionados, sin haber sido sometidos a los fluidos del útero o medios con sustancias inductoras de dichos procesos), no podrán llegar a fecundar, debido a que los capacitados una vez depositados en el tracto reproductor femenino realizarán la reacción acrosomal de manera anticipada (antes de entrar en contacto con la zona pelúcida). Una vez realizada la reacción acrosomal, el espermatozoide se queda sin enzimas acrosomales, lo que les impedirá penetrar al ovocito. Por lo anterior, es importante que las muestras de electroeyaculado y/o de cola de epidídimo recién obtenidas, presenten el menor número de espermatozoide bajo estas circunstancias. De igual forma se ha estudiado que la pérdida de la asimetría fosfolípídica de la membrana plasmática del espermatozoide, es un proceso que se presenta durante la capacitación y es necesaria para desencadenar la reacción acrosomal (Avalos-Rodríguez *et al.*, 2004). La pérdida de la asimetría fosfolípídica se detecta por la exposición de fosfatidilserina hacia la lámina externa de la membrana plasmática. Cuando este fosfolípido de características fusogénicas se expone, desencadena la fusión membranal y facilita la reacción acrosomal (Harrison, 1996). Por lo que en muestras recién obtenidas, debe de haber el menor número de espermatozoides positivos a anexina. Tanto el porcentaje de espermatozoides con patrones de capacitación, como de reacción acrosomal en nuestras muestras de electroeyaculado como de cola de epidídimo estuvieron por debajo del 6% (Gráfica 2) y no se presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre las muestras de electroeyaculado con respecto a las de cola de epidídimo. Es posible que estos espermatozoides estén incluidos en los porcentajes de espermatozoides muertos, ya que la tinción de eosina-nigrosina tiene la facilidad de atravesar las membranas dañadas y tiñe

de rojo a la célula. De igual forma la pérdida de la asimetría fosfolípídica (gráfica 2) se presentó de forma similar en porcentajes menores a 5 tanto en muestras de electroeyaculado como de cola de epidídimo, estos resultados son similares a los publicados por Ávalos-Rodríguez et al. (2004).

Cuando los espermatozoides tanto de electroeyaculado como de cola de epidídimo fueron sometidos al tratamiento de incubación en medio capacitante, se observó un incremento muy marcado con respecto a las no incubadas, sin embargo no encontramos diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre el tipo de muestra (gráficas 2 y 3), a pesar de que existen reportes que argumentan posibles diferencias entre muestras de electroeyaculado con respecto a cola de epidídimo, argumentando que los espermatozoides de cola de epidídimo presentan una ligera ventaja con respecto a los de electroeyaculado, por motivos de que los primeros carecen del plasma seminal rico en sustancias descapacitantes que limitan el proceso de capacitación.

Las principales sustancias presentes en el medio de incubación que favorecieron el proceso de capacitación fueron, albúmina y heparina. La albúmina es una proteína que remueve el colesterol de la membrana plasmática favoreciendo la fluidez y permeabilidad membranal, mientras que la heparina favorece la movilización de Ca^{2+} y el aumento en la fosforilación de proteínas (Breininger et al., 2010) incrementando el pH intracelular (Parris, et al., 2014).

Los componentes fosfolípidicos de la membrana plasmática del espermatozoide al igual que en otros tipos celulares se encuentran de manera asimétrica y la pérdida de dicha asimetría, puede ser una importante evidencia de desestabilidad membranal. Aunque se sabe que este desequilibrio en los componentes estructurales de la membrana, puede terminar con la muerte de la célula, en el caso del espermatozoide, además puede estar involucrado de forma importante en la inducción de capacitación y reacción acrosomal prematura. Lo que disminuirá drásticamente su capacidad fertilizante (Harrison et al., 1996). Por otro lado, en estudios realizados por Ávalos-Rodríguez *et al* (2004), demostraron que cuando los espermatozoides son incubados en un medio capacitante, éstos pierden la asimetría fosfolípídica de manera progresiva con respecto al tiempo de incubación. Lo cual induce al espermatozoide a la fusión de membranas para iniciar la

reacción acrosomal (Gadella et al., 2002). En las muestras de electroeyaculado como de cola de epidídimo sometidas a 2 horas de incubación en el medio inductor de capacitación se encontraron incrementos muy marcados en la exposición de fosfatidilserina en ambos tipos de muestras con respecto a las no incubadas, con lo que se confirma lo reportado por Avalos-Rodríguez et al., (2004) que la exposición de fosfatidilserina se presenta durante el proceso de capacitación.

Para cuestiones de criopreservación de gametos y de inseminación artificial se requiere que la membrana plasmática de los espermatozoides a utilizar mantenga su integridad estructural para garantizar mayormente la capacidad fertilizante. Los espermatozoides son células móviles altamente sensibles al entorno en que se encuentren una vez eyaculados, estos daños pueden verse reflejados principalmente en su membrana, la cual puede desestabilizarse (verse alterada en su fluidez) (Ahmad et al., 2013), y permitir el paso de iones (Sutovsky et al., 2010), lo que podría desencadenar la capacitación de manera fisiológica *in útero*, *in vitro* en el laboratorio o podría experimentar cambios similares a la capacitación tras la descongelación. De cualquier forma este proceso es detrimental para la viabilidad de los espermatozoides de llegar a ocurrir lejos del sitio de fertilización (Mendoza et al., 2012), comprometiendo su funcionalidad al momento de su encuentro con la membrana del ovocito (Gadella et al., 2014).

En el presente estudio se encontró que tanto en espermatozoides de electroeyaculado como de cola de epidídimo después de la congelación la viabilidad de los espermatozoides bajo drásticamente en aproximadamente un 50% (gráfica 4), de la misma forma ocurrió en la movilidad progresiva bajando en más de un (50% Gráfica 4), sin embargo al comparar la viabilidad y movilidad progresiva en espermatozoides congelados y descongelados entre el tipo de muestra no se encontraron diferencias ($p < 0.05$), a pesar de que se utilizó el mismo protocolo de congelación en ambos grupos con la misma concentración de glicerol, el cual favorece la estabilidad de las membranas. Estudios han demostrado que las muestras de electroeyaculado son menos resistentes que espermatozoides de cola de epidídimo cuando se someten a condiciones de estrés criobiológico tales como enfriado, estrés osmótico, y la adición y eliminación de agentes crioprotectores (García-Álvarez et al., 2009). Álvarez et al., 2012 encontraron al descongelado un 34.2 % de daño acrosomal para espermatozoides obtenidos por

electroeyaculado comparado con 11.6% para espermatozoides de cola de epidídimo y recomiendan el 4% de glicerol para la congelación de muestras de espermatozoides eyaculados o electroeyaculados, mientras que para espermatozoides epididimales consideran más adecuado el 8% de glicerol, posiblemente debido a que estas muestras presentan una mayor resistencia a los efectos tóxicos del glicerol, lo que les permiten beneficiarse a partir de sus efectos protectores.

La capacitación espermática se ha evaluado de diferentes maneras, tales como la aglutinación de la región cefálica de los espermatozoides, la capacidad de penetrar ovocitos o tinciones como CTC (Dapino et al., 2006) o Anexina V (Leahy et al., 2015), las cuales pueden poner de manifiesto la movilización de Ca^{2+} , o la pérdida de asimetría de fosfolípidos de la membrana, ambas están relacionadas con la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos que componen la estructura de las membranas biológicas y que conlleva a la reacción del acrosoma, evento que favorece la penetración de la zona pelúcida y la preparación de receptores para la fusión de membranas con el ovocito, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Luna et al., 2015).

La capacitación *in vitro* es utilizada para realizar la fertilización *in vitro*, y producir embriones a nivel de laboratorio, para lo cual pueden utilizarse espermatozoides provenientes de muestras obtenidas de eyaculados, electroeyaculados o directamente de la cola del epidídimo (Breininger et al., 2010). En los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que tanto las muestras crioconservadas de electroeyaculado como las de cola de epidídimo respondieron favorablemente al efecto de la incubación con el medio capacitante encontrándose en ambas muestras un porcentaje superior al 40%, así también el porcentaje de reacción acrosomal fue de aproximadamente del 50% en ambas muestras crioconservadas.

La reacción acrosomal es un evento que aunque requiere previamente de la capacitación, esta también presenta una serie de cascadas de señalización, las cuales *in vitro* requieren de calcio; aunque en ausencia de este, la progesterona favorece la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares, para su participación en la producción de ácido araquidónico a partir de fosfatidilcolina mediante la activación de la enzima fosfolipasa A2, para que se lleve a cabo la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal y

se dé la liberación de enzimas del acrosoma, esta vía no se logra de manera inmediata pues es un evento dependiente de tiempo (Arenas et al., 2010), que *in vivo* requiere de la presencia de receptores de la zona acrosómica. Sería conveniente corroborar mediante la fertilización *in vitro*, si la criocapacitación o la inducción de la capacitación con heparina y albúmina sérica bovina y de la reacción acrosomal mediante progesterona se comportan de la misma manera y tener un mejor panorama sobre el daño criogénico y la criocapacitación.

6.- Conclusiones

Los resultados permiten concluir que es posible obtener espermatozoides de carnero de buena calidad con ambos métodos de recolección, electroeyaculación y lavado retrógrado de cola de epidídimo.

Que en ambas muestras, las condiciones de crioconservación afectan de manera similar la calidad espermática.

Los inductores de capacitación heparina y albúmina sérica bovina y de la reacción acrosomal progesterona, en ambas muestras influyen de manera similar.

La obtención de espermatozoides mediante la técnica de electroeyaculación es una alternativa importante cuando los machos no han sido entrenados para el uso de la vagina artificial para la obtención de espermatozoides para la inseminación artificial y la criopreservación.

La obtención de espermatozoides mediante el lavado retrogrado de la cola de epidídimo es una buena herramienta como último recurso en el caso de machos que han sufrido una muerte súbita.

El proceso de crioconservación influye alterando la asimetría fosfolipídica de la membrana espermática, ocasionando cambios en la arquitectura de los lípidos que la componen.

7.- Bibliografía

- Aguado M.L., Garde J., Pérez-Guzmán M.D., Montoro V. Y Vázquez I. 1994. Variaciones estacionales de la criorresistencia del semen de morueco manchego. *XIX it Científicas S.E.O.C. Burgos (España)*: 507-509.
- Ahmad E., Aksoy M, Serin İ., Küçük N., Ceylan A., Uçan U., 2013. Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction *in vitro*, *Small Ruminant Research*, 115; 77–81
- Álvarez M., Tamayo-Canul J., Martínez-Rodríguez C., López-Urueña E., Gomes-Alves S., Anel L., Martínez-Pastor F., de Paz P. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis) *Animal Reproduction Science* 132, 145– 154.
- Arenas Ríos E., Cambrón R.A., Ambríz G.D., Zúñiga Rubio P.J.P., Rodríguez T.A. y Rosado G.A., 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide, *ContactoS*, 78; 5–11
- Avalos-Rodriguez A. 2004. “Perdida de la asimetría fosfolipídica de la membrana plasmática del espermatozoide de conejo durante la capacitación y la reacción acrosomal”. Tesis de doctorado. México, UAM-Iztapalapa.
- Baltiérrez-Hoyos R., Roa-Espitia A.L. Y Hernández-González E.O., 2012. The association between CDC42 and caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm, *Reproduction* 144 123–134
- Başpınar N., Cöyan K., Bukan M.N., Tuncer P.B., 2011. Effects of dithioerythritol on ram semen after the freeze–thawing process, *Cryobiology* 63; 152–156
- Bernardini A., Hozbor F., Sanchez E., Fornés M.W., Alberio R.H., Cesari A., 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage, *Theriogenology*, 76; 436 – 447
- Bianchi E., Doe B., Goulding D. y Wright G.J., 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization, *NATURE*, 508; 483–487
- Borzan M., Morar I., Pop A.R., Pall E., Groza I., 2011. Research Regarding the Refrigeration of Mouflon Semen During the Non- Breeding Season, *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 68; (2) 63-72
- Boussena S., Bouaziz O., Dehimi M.L., Hireche S., Aimeur R., Kabouia R., 2013. The effects of electroejaculation on some physiological parameters (rectal temperature, respiratory and cardiac rates) in Ouled djellal breed. *Slovak J Anim Sci*, 46, (1): 16-21
- Breining E., Cetica P.D., Beconi MT., 2010. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm, *Theriogenology* 74; 1036 –1049
- Brito, F.I., Valencia, M. J., Balcázar S. A., Angulo M.R. y Mejía V.O. 2004. Freezing of ram semen in pellets with Tris-glucose-yolk and lactose-yolk extenders. *Revista de investigación y difusión científica*, 8 (2) 1-9
- Buffone M.G., Wertheimer E.V., Visconti P.E., Krapf D., 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842; 2610–2620

- Cabrera V.P., Ayulo L.A., Pantoja A.C., 2011. Effect of tris and citrate - quail egg yolk extenders on viability of ovine frozen semen in straws, *Rev Inv Vet Perú*, 22; (2) 105-113
- Câmara D.R. , Silva S.V., Almeida F.C., Nunes J.F., GuerraM.M.P. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen, *Theriogenology* 76; 342–350
- Chiu P.C., Lam K.K., Wong R.C., Yeung W.S., 2014. The identity of zona pellucida receptor on spermatozoa: An unresolved issue in developmental biology, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30; 86–95
- Christie W.W. 2013. *Phosphatidylserine and related lipids*, Lipid Chemistry, Biology, Technology & Analysis, American Oil Chemists' Society (AOCS), U.S.A.
- Colas C., Perez-Pe R., Casao A., Ollero M., Calleja L., Gallego M., Muiño- Blanco T. and Cebrian-Perez J.A., 2012. Remodelling of lipid rafts during *in vitro* capacitation and acrosome reaction of ram spermatozoa, *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, S5-001
- Cormier N., Bailey J.L. 2003. A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation- Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa, *Biology of reproduction* 69, 177–185
- Coy P. García-Vázquez F.A., Visconti P.E., Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization, *Reproduction*, 144; 649–660
- Dapino D.G., Marini P.E., Cabada M.O. 2006. Effect of heparin on *in vitro* capacitation of boar sperm, *Biol Res* 39: 631- 639
- Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., Treviño C.L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa, *Physiol Rev*, 91; 1305–1355
- Druart X. (2012), Sperm Interaction with the Female Reproductive Tract, *Reprod Dom Anim*, 47 (4), 348–352
- Estany J. 2010. *Adapting Animal Production to Changes for a Growing Human Population*, Department of Animal Production, University of Lleida, Spain,
- Fadeel B., and Xue D. 2009. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (5): 264–277
- Fang Y., Zhong R., Chen L., Feng Ch., Sun H., Zhou D. 2015. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage, *Small Ruminant Research*, 130; 178–182
- Feng H.L., Han Y.B., Hershlag A., Zheng L.J. 2007. Impact of Ca²⁺ Flux Inhibitors on Acrosome Reaction of Hamster Spermatozoa, *Journal of Andrology*. 28; (4) 561–564
- Florman H.M. 2015. Chapter 4 Fertilization in Mammals *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Elsevier. USA.
- Foster M.L., Love C.C., Varner D.D., Brinsko S.P., Hinrichs K., Teague S., Lacaze K., Blanchard T.L. 2011. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes, *Theriogenology*, 76; 334–341

- Fraser L.R., Herod J.E. 1990. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate, *Journal of Reproduction & Fertility*, 88; 611-621
- Gadella B.M., Harrison R.A. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67:340–350
- Gadella B.M., Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface, *Theriogenology*, 81; 74–84
- García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Martínez-Pastor F., Garde J.J., Ramón M., Fernández-Santos M.R., Esteso M.C., Pérez-Guzmán M.D., Soler A.J. 2009. Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection, *Theriogenology*, 72; 160–168
- García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Ramón M., del Olmo E., Pilar Jiménez-Rabadán P., Fernández-Santos M.R., Anel-López L., Garde J.J. A and Soler A.J. 2014. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilisation *Reproduction, Fertility and Development*, 26; 725–732
- García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Jiménez-Rabadán P., Ramón M., del Olmo E., Iniesta-Cuerda M., Anel-López L., Fernández-Santos M.R., Garde J.J., Soler A.J. 2015. Effect of different media additives on capacitation of frozen–thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum, *Theriogenology*, 84; (6) 948–955
- Gillan L., Evans G., Maxwell W.M. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.*, 9; 481–487.
- González-Santos J.A., Tadeo-Rosas J.C., Ortega-Camarillo C., Toledano-Olivares A., Vergara-Onofre M., Ávalos-Rodríguez A. 2013. Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos, *Revista de Salud Animal*, Vol. 35 No. 2 : 137-141
- Gutiérrez-Pérez O., Juárez-Mosqueda M.L., Mota D., Trujillo M.E. 2011. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen, *Cryobiology*, 62; 32–39
- Harrison R.A. (1996) Capacitation mechanisms and role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*, 8, 581-594
- Hedger P.M. 2015 Chapter 19, The Immunophysiology of Male Reproduction, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Elsevier. USA.
- Hernández P.J.E., Fernández R.F., Rodríguez S.J.L., Juárez R.E., Soto M.Y.G. , García R.A.D. 2012. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status, *Rev. Salud Anim.* 34; (2) 78-83
- Ikawa M., Inoue N., Benham A.M., Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte, *The Journal of Clinical Investigation*, 120; (4): 984–994

- Jafaroghli M., Khalili B., Farshad A., Zamirid M.J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen, *Small Ruminant Research*, 96; 58–63
- Juyena N.S., Stelletta C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa, *Journal of Andrology*, 33, (4), 536-551
- Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato S. 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins, *Animal Reproduction Science*, 73; 197–209
- Kato H., Braun J., Hollerrieder J., Leidl W. and Iritani A. 2000. Effects of heparin on the time course of sperm penetration during *in vitro* fertilization in sheep, *Memoirs of the Research Institute of B.O.S.T. Kinki University*, 3: 19 -26
- Kotwicka M., Jendraszak M., Skibinska I., Jedrzejczak P., Pawelczyk L. 2013. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique, *Human Cell*, 26; 28–34
- Leahy T., Marti J.I., Mendoza N., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Evans G., Maxwell W.M. 2010. High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 119; 137–146
- Leahy T., Gadella B.M. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage, *Reproduction*, 142; 759–778
- Leahy T., Gadella B.M. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane, *Asian Journal of Andrology* 17; 561–567
- López Armengol M.F., Jurado S.B., Pelufo V., Aisen E.G. 2012. A quantitative ultramorphological approach for systematic assessment of sperm head regions: An example in rams, *Cryobiology* 64; 223–234
- Lukac N., Bardos L., Stawarz R., Roychoudhury S., Makarevich A.V., Chrenek P., Danko J. and Massanyi P. 2011. *In vitro* effect of nickel on bovine spermatozoa motility and annexin V-labeled membrane changes, *J. Appl. Toxicol.* 31: 144–149
- Luna C., Colás C., Casao A., Serrano E., Domingo J., Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J.A., Muiño-Blanco T. 2015. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction, *Theriogenology* 83; 670-678
- Mandal R., Badyakar D., and Chakrabarty J. 2014. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation, *Advances in Andrology*, 2014; 1-9
- Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. 2013. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics, *Animal Reproduction Science*, 138; 25 – 38
- Martinez-Pastor F., Martínez F., García-Macías V., Esteso M.C., Anel E., Fernández-Santos M.R., Soler A.J., de Paz P., Garde J., Anel L., 2006. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology*, 66,1165–1172.

- Matias-Martins J.A., Azevedo-Souza C.E., Albuquerque-Silva F.D., Cadavid V.G., Nogueira F.C., Barbosa-Domont G., Abreu de Oliveira J.T., Moura A.A. 2013. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams, *Small Ruminant Research* 113; (1) 115– 127
- Mayren-Mendoza F. Vergara-Onofre M., Juárez-Mosqueda, M.L., Toledano-Olivares A., Rosales-Torres A.María., Ávalos-Rodríguez A., 2012. Participación de enzimas translocasas en la reacción acrosomal del espermatozoide de conejo, *Revista electrónica de Veterinaria*, 13; (1) 1-13
- Mehr M.R.-A., Mousavi M., Ghadamyari M. 2015. Effect of seminal plasma proteins on membrane cholesterol efflux of ram epididymal spermatozoa, *Small Ruminant Research*, 129 : 88–91
- Mejia M., Medrano A., Gonzalez-Rebeles C., Mejia O. 2009. Capacitation status of frozen–thawed spermatozoa from wild ruminant species, *Eur J Wildl Res* 55:1–6
- Mendoza N., Casao A., Del Valle I., Serrano E., Nicolau S., Asumpção M.E., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Pérez-Pé R. 2012. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system, *Journal of Chromatography B*, 880; (1) 74– 81
- Merino-González R.A. 2003. Estudios preliminares en capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos frescos y congelados. Tesis de licenciatura. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Michailov Y., Ickowicz D., Breitbart H. 2014. Zn²⁺-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation, *Developmental Biology*, 396; 246-255
- Najafi A., Zhandi M., Towhidi A., Sharafi M., Akbari Sharif A., Khodaei Motlagh M., Martinez-Pastor F. 2013. Trehalose and glycerol have adose-dependent synergistic effect on the post- thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender, *Cryobiology* 66; 275–282
- Nikolovski M., Atanasov B., Dovenska M., Petkov V., Dovenski T. 2012. Variations in semen quality parameters of ovchepolian pramenka rams according to the method of colection and the meteorological season, *Mac Vet Rev*, 35; (2): 79-86
- Nishigaki T., José O., González-Cota A.L., Romero F., Treviño C.L., Darszon A. 2014. Intracellular pH in sperm physiology, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450; 1149–1158
- Nts'emelo M. 2010. “*In vitro* embryo production and semen cryopreservation in sheep”. Tesis de maestría. Bloemfontein, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State Bloemfontein.
- Ombelet W., Van Robays J. 2015. Artificial insemination history: hurdles and milestones, *Facts Views Vis Obgyn*, 7, (2): 137-143
- Parrish J.J. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin, *Theriogenology*, 81; 67–73

- Pérez L.J., Valcárcel A., de las Heras M.A., Moses D.F., Baldassarre H. 1996. *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay, *Theriogenology*, 45; 1037-1046
- Peris S.I., Morrier A., Dufour M., Bailey J.L. 2004. Cryopreservation of Ram Semen Facilitates Sperm DNA Damage: Relationship Between Sperm Andrological Parameters and the Sperm Chromatin Structure Assay, *Journal of Andrology*, 25, (2): 224-33.
- Petrunkina A.M., Gröpper B., Töpfer-Petersen E., Günzel-Apel A.R. 2005, Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender, *Theriogenology* 63 1390–1406
- Pichardo Reyes M. 2004. “Características del semen de conejo de una población mexicana de las razas California, Nueva Zelanda y Chinchillas“. Tesis de licenciatura. México, Departamento de enseñanza e investigación en zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo
- Pugh D.G. SHEEP AND GOAT MEDICINE 2nd ed. Saunders, Elsevier Inc. Maryland Heights, Missouri. 2012
- Robaire B. 2015. Chapter 17 The Epididymis, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Elsevier. USA.
- Rodrigues M.A.M., Souza C.E.A., Martins J.A.M., Rego J.P.A., Oliveira J.T.A., Domont G., Nogueira F.C.S., Moura A.A. 2013. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams, *Small Ruminant Research*, 109; 94 – 100
- Rubinstein S. and Breitbart H. 1991. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction, *Biochem. J.* 278; 25-28
- Sancho S. 2013. Chapter 9 The boar ejaculate: Sperm function and seminal plasma analyses. *Boar reproduction fundamentals and new biotechnological trends*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Santi C.M., Martínez-López P., de la Vega-Beltrán J.L., Butler A., Alisio A., Darszon A., Salkoff L. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility, *FEBS Letters* 584; 1041–1046
- Shokrollahi E., Barati F., Gooraninejad S. 2014. Efficacy of Histoprep® gradient for isolating ovine epididymal sperm, *Small Ruminant Research*, 119; 96–99
- Soleilhavoup C., Tsikis G., Labas V., Harichaux G., Kohnke P.L., Dacheux J.L., Guérin Y., Gatti J.L., de Graaf S.P., Druart X. 2014. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa, *Journal of Proteomics*, 109; 245–260
- Strünker T., Goodwin N., Brenker Ch., Kashikar N.D., Weyand I., Seifert R. & U. Kaupp B. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm, *NATURE*, 471; 382-387
- Suarez S.S. 2015. Chapter 5 Gamete and Zygote Transport *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Elsevier. USA.
- Sutovsky P. 2010. Chapter 25, Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertilization, *Reproductive Endocrinology and Infertility*, Springer, Salt Lake City, Utah US.

Swanson E.W. and Bearden H.J., 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa, *J Anim Sci*, 10; 981-987

Toshimori K. 2015. Chapter 3 The Spermatozoon, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Elsevier. USA.

Tamayo-Canul J., Alvarez M., López-Urueña E., Nicolas M., Martinez-Pastor F., Anel E., Anel L., de Paz P., 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim Reprod Sci*. 126: 76 – 82.

Velayos J.L. 2000. Comienzo de la vida humana, *Cuadernos de Bioética*, 1; 29- 36

Vijayasaraswathy S.G., Sudhir C.R., Kuldeep D., Devi G., Valsala R., Bharathan A.P., Kalluvila J.j., Gopalakrishnan A. (2014). Proteases and Proteases Inhibitors of Semen, *Adv. Anim. Vet. Sci*. 2 (8): 447-456

Visconti P.E., Krapf D., de la Vega-Beltrán J.L., Acevedo J.J., Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation, *Asian Journal of Andrology*, 13; 395-405