



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y
BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Estudio de factores que influyen en la fecundación *in vitro* heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados *in vitro*

Tesis de Máster
Valencia, Octubre de 2009.
RICAURTE LOPERA VÁSQUEZ

Directores:
D.^a EVA MOCÉ CERVERA
D. MIGUEL ÁNGEL SILVESTRE CAMPS



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, por permitirme llegar hasta este punto tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera. De igual manera, agradezco a mis padres Luz y Ricarte, por su cariño, comprensión y apoyo sin condición ni medida.

Agradezco a mi tutor el Dr. Miguel Ángel Silvestre Camps, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Su confianza, su paciencia, sus opiniones y consejos, me sirvieron para dar los primeros pasos en la carrera de investigación. De igual manera, agradezco a mi directora la Dra. Eva Mocé Cervera, por su paciencia, su colaboración y sus muy acertadas correcciones a este trabajo.

Gracias a tí Erika, por tu cariño, tu confianza, tu apoyo y tu comprensión. Sin tí esto no hubiera sido posible. Gracias por acompañarme, por escucharme y por aconsejarme. Gracias por los buenos y los malos momentos. Muchas gracias Doña Cene y Alejandra, por que junto a Erika ustedes fueron mi familia aquí en Valencia, gracias por abrirme las puertas de su casa, por acogerme como un integrante más de su familia y hacer mis momentos difíciles en este país, mucho más llevaderos.

Agradezco a todas las entidades y personas implicadas en la organización del máster interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción, por brindarme la oportunidad de aprender, compartir cosas que parecían inalcanzables y de conocer este gran país.

Gracias a cada uno de los maestros que participaron en desarrollo de este máster, en especial al Dr. Manuel Baselga Izquierdo y la Dra. María Antonia Santacreu, por su cordialidad, ayuda y confianza. Gracias a Dr. Agustín Góngora Orjuela por su apoyo incondicional para mi proyecto profesional.

Gracias a mis amigos del máster, Yulixis, Javier, Coskun, Andrés, Jorge, y Carola, quienes en algún momento hicieron que esta etapa de mi vida fuera amena y con quienes compartimos tantas experiencias. Gracias a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Ignacio y Alberto de quienes aprendí muchas cosas y quienes me colaboraron incondicionalmente durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias España por darme la oportunidad de conocerme, por permitirme conocer personas maravillosas y lugares maravillosos. Gracias por enseñarme como se debe de caminar por la vida, con trabajo, con errores, con triunfos, con decepciones. Para todos los que no nombro aquí, pero que están en mi mente en verdad muchas gracias. Algún día volveré.

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de los factores que influían en el procedimiento de fecundación *in vitro* heteróloga con espermatozoides de origen caprino de la raza Murciano-Granadina y oocitos de bovino madurados *in vitro*. Para este trabajo se desarrollaron cuatro experimentos. En estos experimentos se evaluó la calidad seminal (motilidad y viabilidad espermática) y la fecundación *in vitro* heteróloga (tasas de formación pronuclear).

En el primer experimento se analizó la eficiencia de la fecundación *in vitro* heteróloga utilizando tres sistemas diferentes en función de la presencia la zona pelúcida y/o células del *cumulus*. Sólo se observaron tasas de fecundación elevadas al utilizar oocitos libres de zona pelúcida (78,3%). En el segundo experimento, se evaluaron los parámetros de calidad seminal y capacidad fecundante de cuatro machos cabríos en oocitos bovinos sin zona pelúcida. Se observaron diferencias entre machos en los parámetros de calidad seminal durante el procesado del semen previo y posterior a la fecundación *in vitro* heteróloga. En el tercer experimento se comparó el efecto de la concentración de ionomicina sobre dos machos que presentaban alta y baja fertilidad *in vitro*, respectivamente. Se encontraron diferencias entre los machos tras la capacitación espermática e inducción de la reacción acrosómica reflejado en las tasas de penetración espermática y se observó que la adición 400 nM de ionomicina maximizaba las tasas de formación pronuclear. Por último, se evaluó el efecto del lavado del plasma seminal sobre los parámetros de calidad espermática y de capacidad fecundante en dos machos de alta y baja fertilidad *in vitro*. Se observó un efecto beneficioso del lavado del plasma seminal sobre los parámetros de calidad seminal y formación pronuclear, aunque existió variabilidad entre machos tanto en la respuesta al lavado como en la respuesta a la refrigeración.

Mediante este trabajo se logró estandarizar un protocolo de fecundación *in vitro* heteróloga en oocitos de bovino libres de zona pelúcida, para determinar la capacidad fecundante de espermatozoides de machos cabríos de la raza Murciano-Granadina.

ABSTRACT

The principal objective of this work was to study the effect of the factors influencing the heterologous *in vitro* fertilization procedure with goat spermatozoa of Murciano-Granadino breed and *in vitro* matured bovine oocytes. Four experiments were conducted for this work. In these experiments, sperm quality (sperm motility and viability) and heterologous *in vitro* fertilization (pronuclear formation rates) were evaluated.

In the first experiment, we analyzed the efficiency of heterologous *in vitro* fertilization using three different systems in terms of presence zona pellucida and/or *cumulus* cells. Only zona-free bovine oocytes, provided high fertilization rates (78.3%). In the second experiment, semen from individual bucks was collected to evaluate semen quality and sperm fertilizing ability in zona-free bovine oocytes. Differences were observed between males in the semen quality during processing before and after heterologous *in vitro* fertilization. In the third experiment we compared the effect of ionomycin concentration on two bucks with high and low *in vitro* fertility, respectively. We found differences between bucks after the induction of sperm capacitation and acrosome reaction, reflected in the sperm penetration rates. In addition we observed that ionomycin at a concentration of 400 nM maximized pronuclear formation rates. Finally, we evaluated the effect of washing seminal plasma on sperm quality and fertilizing capacity in two males with high and low *in vitro* fertility. There was a beneficial effect of washing seminal plasma on the semen quality and pronuclear formation, although variability among bucks response to both wash and in the response to cooling was observed.

Through this work, an heterologous *in vitro* fertilization protocol was developed by using zona-free bovine oocytes and buck sperm. This protocol could be used in the future to determine the sperm fertilizing ability from bucks belonging to the Murciano-Granadina breed.

ÍNDICE

1. Introducción.	Pág.
1.1. Inseminación artificial en especies ganaderas	1
1.2. Métodos para la valoración de la calidad seminal	2
1.2.1. Análisis de motilidad espermática	2
1.2.1.1. Análisis subjetivo de la motilidad espermática	3
1.2.1.2. Análisis objetivo de la motilidad espermática	3
1.2.1.3. Análisis de la motilidad espermática por migración en moco cervical	4
1.2.2. Análisis de morfología espermática	5
1.2.3. Pruebas de funcionalidad espermática	5
1.2.3.1. Integridad de la membrana espermática	6
1.2.3.2. Pruebas de funcionalidad mitocondrial	7
1.3. Test de interacción de gametos	8
1.3.1. Test de unión a zona pelúcida	8
1.3.2. Test de fecundación <i>in vitro</i> homólogos y heterólogos	9
1.4. Maduración <i>in vitro</i> de oocitos Bovinos	11
1.5. Fecundación <i>in vitro</i>	12
1.5.1. Capacitación e hiperactivación espermática	13
1.6. Interacción entre gametos	14
1.6.1. Reacción acrosómica	14
1.6.2. Zona pelúcida	15
1.6.3. Interacción entre membranas plasmáticas	15
1.6.4. Activación oocitaria y formación pronuclear	15
2. Objetivo	17
3. Material y Métodos	18
3.1. Obtención, selección y maduración <i>in vitro</i> de los oocitos	18
3.1.2. Recolección de los oocitos	18
3.1.3. Maduración <i>in vitro</i>	18
3.2. Obtención del eyaculado, selección y capacitación espermática	19
3.2.1. Recuperación del eyaculado	19
3.2.2. Dilución, empajuelado y refrigeración del eyaculado	19
3.2.3. Selección y capacitación espermática	20
3.2.4. Cálculo de la concentración inseminante	21
3.3. Fecundación <i>in vitro</i>	21
3.3.1. Eliminación de las células del <i>cúmulus</i> y de la zona pelúcida	22
3.3.2. Fecundación <i>in vitro</i> y cocultivo de gametos	22
3.4. Valoración de los resultados	22

3.4.1. Evaluación de la maduración <i>in vitro</i>	23
3.4.2. Evaluación de la fecundación <i>in vitro</i>	23
3.4.3. Evaluación de la calidad espermática	24
3.5. Experimentos	26
3.5.1. Experimento 1: Procedimientos de Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados <i>in vitro</i> de bovino	26
3.5.2. Experimento 2: Efecto del macho en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática previo a la fecundación <i>in vitro</i> heteróloga y su eficiencia en la formación pronuclear	27
3.5.3. Experimento 3: Evaluación de la respuesta de machos con diferentes fertilidades <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones de ionomicina en un protocolo de capacitación espermática	27
3.5.4. Experimento 4: Efecto del lavado del plasma seminal en los 2 machos de mayor y menor fertilidad <i>in vitro</i> , sobre parámetros de calidad espermática y capacidad fecundante en FIV heteróloga	27
3.6. Análisis estadístico	28
4. Resultados.	30
4.1. Experimento 1: Procedimientos de Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados <i>in vitro</i> de bovino.	30
4.2. Experimento 2: Efecto del macho en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática previo a la fecundación <i>in vitro</i> heteróloga y su eficiencia en la formación pronuclear.	31
4.3. Experimento 3: Evaluación de la respuesta de machos con diferentes fertilidades <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones de ionomicina en un protocolo de capacitación espermática.	32
4.4. Experimento 4: Efecto del lavado del plasma seminal en los 2 machos de mayor y menor fertilidad <i>in vitro</i> , sobre parámetros de calidad espermática y capacidad fecundante en FIV heteróloga.	34
5. Discusión	38
6. Conclusiones	44
7. Referencias bibliográficas	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimaciones (MER) del efecto de distintos procedimientos de Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados <i>in vitro</i> de vacuno sobre las tasas de formación pronuclear.	30
Tabla 2. Estimaciones (MMC) del efecto del macho en los parámetros de motilidad, viabilidad espermática y (MER) formación pronuclear	32
Tabla 3. Significancia estadística de los modelos para los parámetros analizados en el experimento 3	32
Tabla 4. Estimaciones (MMC) de las tasas de motilidad y viabilidad observada en machos de alta y baja fertilidad <i>in vitro</i> durante el procesamiento del eyaculado previo a la fecundación <i>in vitro</i> heteróloga.	33
Tabla 5. Estimaciones (MMC) del efecto del macho, de la concentración de ionomicina (parte superior) y de la interacción macho x concentración de ionomicina (parte inferior), sobre los parámetros de viabilidad espermática durante la capacitación espermática, tras la incubación y (MER) sobre el parámetro de formación pronuclear (Fecundación heteróloga).	34
Tabla 6. Significancia estadística de los modelos para los parámetros analizados en el experimento 4.	35
Tabla 7. Estimaciones (MMC) del efecto del macho, plasma seminal y de la interacción macho x plasma seminal sobre las tasas de motilidad y viabilidad seminal previa y posterior al proceso de fecundación <i>in vitro</i> heteróloga	36
Tabla 8. Estimaciones (MER) del efecto macho, plasma seminal y de la interacción entre macho x plasma seminal sobre las tasas de fecundación heteróloga (formación pronuclear) en machos de alta y baja fertilidad con y sin plasma seminal.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del protocolo general	29
Figura 2. Oocito de bovino fecundado con espermatozoides de caprino (Presencia de dos pronúcleos en su citoplasma)	30
Figura 3. Oocito de bovino fecundado con espermatozoides de caprino (Presencia de tres pronúcleos en su citoplasma)	31

1. Introducción

1.1. Inseminación artificial en especies ganaderas

La inseminación artificial juega un papel importante en los programas de mejora genética, especialmente en los sistemas intensivos de producción. Esta técnica ofrece un incremento en el número de descendientes por macho y en el caso de semen congelado permite una disociación en el tiempo y el espacio entre la colecta de los espermatozoides y la inseminación de la hembra, permitiendo la evaluación y selección de machos de altos índices de fertilidad y genéticos (Leboeuf y cols., 2000). Es común en los centros de inseminación artificial realizar valoraciones del semen para detectar machos que puedan presentar valores de fertilidad reducidos en campo. Sin embargo, en ocasiones se pueden encontrar machos con valores normales de calidad seminal que presentan bajos índices de fertilidad (Gadea, 2001).

A pesar de que la forma más adecuada para evaluar la capacidad fecundante de un macho es realizar pruebas *in vivo*, éstas presentan un elevado costo temporal y económico. Por ello, en la evaluación de la calidad reproductiva del semental tienen especial importancia las pruebas de calidad seminal desarrolladas *in vitro*, gracias a la asociación de los resultados de estas pruebas con la fertilidad del macho. Las pruebas de calidad espermática valoran características generales del espermatozoide, como la motilidad, la integridad de membrana y la integridad del ADN. Sin embargo, algunos estudios han buscado relacionar los parámetros de calidad espermática y de fertilidad *in vivo*, aunque estos resultados no siempre presentan relación (Rodríguez – Martínez, 2003; Gadea, 2005).

Por otra parte, se han desarrollado pruebas de interacción entre gametos para evaluar la capacidad fecundante *in vitro* del macho, en búsqueda de un criterio de valoración complementario a las otras pruebas de calidad espermática, y estas pruebas se basan en las técnicas de fecundación *in vitro*. En este grupo de técnicas destacan los test de penetración espermática en oocitos homólogos o heterólogos, con o sin zona pelúcida. Este tipo de prueba es una alternativa interesante debido a que busca recrear los procesos e interacciones ocurridas *in vivo* entre el espermatozoide y el oocito durante la fecundación.

1.2. Métodos para la valoración de la calidad seminal

Las pruebas de calidad seminal ganan importancia en los programas de inseminación artificial al considerarse un criterio de valoración relevante para determinar el valor reproductivo del macho y al considerar la importancia del efecto del reproductor sobre la eficiencia reproductiva y genética de las explotaciones pertenecientes al programa.

Entre las pruebas existentes para evaluación de la calidad seminal, se consideran de vital importancia el espermograma clásico, las pruebas de funcionalidad y las pruebas de estado de la cromatina, entre otras. Las valoraciones macroscópicas son sencillas de realizar y analizan características como el color y el volumen del eyaculado. El color del eyaculado puede ser indicador de patologías, infecciones en el sistema reproductor del macho, o de contaminaciones (orina) en el momento de la recogida del eyaculado. El volumen es esencial para la determinación del número total de espermatozoides contenido en el mismo eyaculado. Por otra parte, también se pueden realizar pruebas microscópicas en donde se pretende analizar parámetros tales como la concentración, la motilidad, la morfología y la integridad acrosómica, entre otros (Gadea, 2005).

Microscópicamente el primer parámetro a tener en cuenta es la concentración espermática, considerado como el número de espermatozoides por unidad de volumen (Palma y cols., 2001). La concentración espermática adquiere importancia por permitir rentabilizar el número de dosis por eyaculado, y generalmente se expresa en millones de espermatozoides por mL de eyaculado. Entre los métodos más comunes para su determinación, se encuentran el conteo en cámaras de recuento celular, o la espectrofotometría.

1.2.1. Análisis de motilidad espermática

La motilidad espermática se considera un parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado, debido a que los movimientos activos de los espermatozoides son necesarios para su desplazamiento por el tracto reproductor de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Entre las pruebas más importantes para valorar la motilidad espermática se encuentra el análisis subjetivo de la motilidad espermática, el análisis objetivo de la motilidad espermática y la prueba de migración espermática en moco cervical.

1.2.1.1. Análisis subjetivo de la motilidad espermática

La motilidad espermática se considera un buen indicador de la funcionalidad y la integridad de la membrana del espermatozoide, y también se considera un buen indicador de infertilidad o subfertilidad (Gadea, 2005). Además, la motilidad es una de las pruebas más usadas al presentar ventajas como su bajo costo y rapidez. De igual manera, su aplicación permite la oportuna eliminación de eyaculados antes de ser procesados. La motilidad se puede determinar con ayuda de un microscopio detectando el porcentaje aproximado de espermatozoides que presentan un patrón de movimiento progresivo, movimientos rectilíneos o movimientos considerados “normales” (Rodríguez - Martínez y cols., 2008), sin embargo, esta estimación es considerada subjetiva al atribuirse un sesgo a la prueba por ser valorada por personas (Mocé y Graham, 2008).

1.2.1.2. Análisis objetivo de la motilidad espermática

La motilidad también puede ser evaluada objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis espermático “computer assisted sperm analyzer” (CASA) (Gadea, 2005). En los sistemas de análisis espermático CASA, mediante la captura por fotografías y videos de los movimientos espermáticos, se adquiere información con un nivel de objetividad y detalle más alto que la información recogida por el ojo humano (Rodríguez - Martínez y cols., 2008), y de esta forma se obtiene información más precisa sobre los parámetros antes mencionados, y además se obtienen nuevos parámetros como la velocidad, angularidad del espermatozoide, y en algunas ocasiones de la morfología de la cabeza espermática (Verstegen y cols., 2002), reduciendo de esta manera el sesgo atribuido a la motilidad subjetiva (Mocé y Graham, 2008).

La primera parte de la información adquirida por el sistema computarizado de análisis espermático consiste en el porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. La segunda parte consiste en el tipo de velocidad del espermatozoide, representada en velocidad curvilínea, velocidad lineal y velocidad rectilínea. Además, el sistema analiza el tipo de movimiento efectuado como la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y la frecuencia de batida de la cola. En base a estos parámetros antes descritos, el sistema puede calcular índices de linealidad y los índices de rectitud del movimiento (Vergesten y cols., 2000). Kathiravan y cols. (2008) observaron correlaciones positivas entre parámetros de velocidad del

espermatozoides de origen bovino obtenidos por el CASA y los porcentajes de fecundación en oocitos de hámster libres de zona pelúcida.

1.2.1.3. Análisis de la motilidad espermática por migración en moco cervical

Otro tipo de prueba que se relaciona con el análisis de motilidad espermática, es la evaluación del potencial de migración espermática en moco cervical. Esta prueba busca evaluar la capacidad de migración del espermatozoide a través del moco cervical de especies homólogas (Bacinoglu y cols., 2007) o heterólogas (Cox y cols., 2006). El moco cervical es un hidrogel, fisiológicamente secretado por el epitelio del cérvix uterino en función del ciclo ovárico. Durante la fase folicular ovárica este moco es combinado conjuntamente por la presión abdominal y la contractibilidad del tracto genital, adquiriendo de esta forma cierta disposición característica en forma de malla, la cual permite el movimiento del espermatozoide a través de estos espacios interfibrilares del entramado. Esta disposición estructural facilita la orientación del espermatozoide hacia la parte superior del tracto reproductor de la hembra (Cox y cols., 2006).

Estas características han sido imitadas mediante técnicas *in vitro* en las que se coloca moco cervical en tubos capilares, con el fin que los espermatozoides avancen a través de ese tubo (Tas y cols., 2007a). Además, debido a la dificultad para la obtención de moco cervical, se han desarrollado compuestos que permiten el reemplazo del moco cervical, entre estos compuestos se destacan los polímeros sintéticos como poliacrilamida y la metilcelulosa. Los resultados obtenidos en este tipo de polímeros son similares a los resultados de penetración obtenidos en moco cervical (Tas y cols., 2007b). De igual manera, se ha observado que las pruebas de capacidad de penetración del espermatozoide en estos polímeros están estrechamente relacionadas con la capacidad de fusión del espermatozoide – oocito (Bacinoglu y cols., 2008). Además, existe relación entre los parámetros de penetración en moco cervical en humano y bovino con resultados en fecundación *in vitro* (Aitken, 2006).

1.2.2. Análisis de morfología espermática

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. Estos análisis buscan algún tipo de alteración morfológica en la cabeza, pieza media y cola del espermatozoide. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con inmadurez sexual, procesos degenerativos y/o patológicos gonadales. Las desviaciones morfológicas de la estructura normal del espermatozoide son consideradas anomalías (Hafez, 1989). Para el estudio de la morfología espermática se han utilizado tradicionalmente técnicas de tinción entre las que se destacan la eosina – nigrosina y el cristal violeta, entre otras técnicas.

Las anomalías espermáticas se clasifican según la estructura anatómica en donde se generen. Las anomalías espermáticas primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallos en la espermatogénesis (Hafez, 1989), entre estas anomalías se incluyen espermatozoides con poco desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de la cabeza. Por otra parte, las anomalías espermáticas secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo y se deben a fallos en la maduración espermática. Muchas de estas alteraciones impiden el correcto movimiento del espermatozoide, y además, muchas de estas anomalías están relacionadas con la infertilidad (Gadea, 2005) al ocasionar defectos durante la interacción entre gametos (Pesh y cols., 2006).

1.2.3. Pruebas de funcionalidad espermática

En los últimos años, se han venido implementando pruebas *in vitro*, que valoran la funcionalidad, buscando evaluar una mayor cantidad de atributos que determinen la fecundidad del espermatozoide. Entre las pruebas de funcionalidad espermática más utilizadas se encuentra el análisis de integridad de membrana plasmática y los test de funcionalidad mitocondrial.

1.2.3.1. Integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática se considera un requisito imprescindible para el adecuado metabolismo espermático (Gadea, 2005). La membrana plasmática es una estructura que rodea completamente al espermatozoide, y entre sus funciones están la de mantener juntos los organelos y los componentes intracelulares, mantener los gradientes iónicos y de sustancias al interior de la célula, además de facilitar el transporte de diversos nutrientes como la glucosa y la fructosa al interior de la célula. Estas fuentes energéticas son indispensables en la célula espermática madura, debido a que la mayor parte del ATP consumido por la célula es producido por glicólisis. Si la membrana espermática no está intacta, el espermatozoide se considera deteriorado (muerto) y en condiciones *in vivo*, no será capaz de fecundar un oocito maduro (Gillan y cols., 2005).

La integridad de membrana es habitualmente evaluada tras la tinción de las células con colorantes impermeables que sólo atraviesan la membrana en caso que ésta esté dañada. Las células que son capaces de excluir este colorante debido a la integridad de la membrana se consideran como vivas (Silva y Gadella, 2006). Aunque se pueden utilizar tinciones para la evaluación en microscopio de campo claro como la eosina - nigrosina, en la actualidad las tinciones fluorescentes son las más utilizadas. Dentro de ellas, una de las tinciones más utilizadas es la que combina los fluorocromos SYBR-14 y yoduro de propidio (PI) que tienen como objetivo el mismo componente celular (ADN), eliminando la ambigüedad que surge cuando se dirigen a distintos componentes celulares. Con esta tinción el núcleo del espermatozoide se colorea verde en las células que tienen la membrana intacta, ya que es permeable, mientras que en las células con la membrana dañada penetra el yoduro de propidio (PI) y tiñe el núcleo de color rojo, desplazando el SYBR 14 (Gillan y cols., 2005). A pesar de la importancia de la membrana plasmática, no siempre las pruebas de funcionalidad de membrana están estrechamente relacionadas con la fertilidad (Gadea, 2005; Mocé y Graham, 2008).

Una de las ventajas que presentan las tinciones fluorescentes es que permiten el uso de la citometría de flujo. En los últimos años, la citometría de flujo ha adquirido gran importancia gracias a los altos rendimientos alcanzados en la evaluación de células espermáticas, consistiendo su fundamento como su nombre lo indica en medir las células en un sistema de flujo. El citómetro recoge la luz que se dispersa al pasar por las células y el tipo de luz emitida por las células cuando se tiñen con sustancias fluorescentes. Una de las ventajas de este sistema es la capacidad de medida de varios parámetros en grandes cantidades de células en poco tiempo, lo que permite detectar la variabilidad en subpoblaciones de espermatozoides. Este sistema es utilizado para la evaluación de la integridad de

membrana espermática al detectar los picos de fluorescencia emitidos por las tinciones usadas para este fin (Gillan y cols., 2005; Tomás, 2007).

Por otra parte, también se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática mediante el test de endósmosis (HOST - Hipo Osmotic Swelling Test). Este test se basa en las propiedades físicas y químicas de la membrana plasmática para equilibrar el medio externo e interno. La inclusión de células espermáticas en una solución hiposmótica provoca el paso de agua a través de la membrana del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico, observándose evidentes cambios morfológicos en la cola del espermatozoide. Si la membrana se encuentra dañada o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios (Jeyendran y cols., 1994). El test endosmótico es indicativo de la resistencia de la membrana plasmática, estando correlacionada positivamente con fecundación de oocitos homólogos *in vitro* (Hauser, y cols., 1992) y en oocitos heterólogos (Fuse y cols., 1991 y Garde y cols., 1992 obtenidos en test de hámster libre de zona pelúcida).

1.2.3.2. Pruebas de funcionalidad mitocondrial

Existen pruebas para determinar la funcionalidad mitocondrial del espermatozoide. El objetivo de estas pruebas consiste en evaluar la capacidad y el ritmo de respiración de las mitocondrias espermáticas. Entre las funciones de la mitocondria se destaca la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, el ATP se considera necesario para la motilidad espermática (Silva y Gadella, 2006). Para determinar esta función mitocondrial se utilizan sondas fluorescentes como la rodamina 123 y recientemente otro tipo de sonda como la JC 1. Estas sondas determinan el potencial de membrana mitocondrial, al ser bombeadas activamente dentro de la mitocondria. Los espermatozoides que poseen un mayor potencial de membrana mitocondrial (mitocondria activa), bombean mayor cantidad de colorante dentro de su mitocondria (Gillan y cols., 2005; Mocé y Graham, 2008).

A pesar de que estos test evalúan estructuras y funciones en la fisiología espermática, existen otra serie de procesos importantes ocurridos *in vivo* que este tipo de pruebas no pueden evaluar, y que actualmente son evaluados por pruebas de interacción entre gametos.

1.3. Test de interacción de gametos

Los test que implican la interacción entre gametos adquieren importancia por estudiar el comportamiento de los espermatozoides frente a algunas de las barreras que deben superar en condiciones fisiológicas durante el proceso de fecundación. Entre este grupo de pruebas se encuentran el test de unión a la zona pelúcida (Sinowatz y cols., 2003), y los test de fecundación *in vitro* homólogos o heterólogos, que se pueden desarrollar en oocitos con o sin zona pelúcida (Yanagimachi y cols., 1976).

Después de que el espermatozoide es expulsado del reservorio oviductal, la zona pelúcida es la mayor barrera selectiva para entrar al oocito. Se cree que la capacidad fecundante del espermatozoide depende en gran medida de su habilidad para cruzar esta barrera. Se han desarrollado sistemas *in vitro* para evaluar la capacidad de interacción del espermatozoide con la zona pelúcida: test de unión a zona pelúcida, test de penetración y fecundación *in vitro*.

1.3.1. Test de unión a zona pelúcida

Los ensayos de unión a zona pelúcida dependen de las moléculas de superficie en el espermatozoide y su unión a los receptores en la zona pelúcida (Waberski y cols., 2005). El test de unión a zona pelúcida es un buen predictor de sucesos de fecundación *in vitro*. La habilidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida se considera de utilidad para la identificación de machos con fertilidad reducida (Braundmeier y cols., 2003). Sin embargo, puede existir controversia entre estudios de unión a zona pelúcida (Collins y cols., 2008).

Para evitar problemas de variabilidad entre oocitos, se desarrolló el test denominado "hemizona binding assay" (HZA), en donde se utilizan dos mitades de zona pelúcida (o hemizonas), que poseen superficies funcionalmente similares para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Fazeli y cols. (1995) detectaron una correlación significativa entre este test y las tasas de no retorno a celo en bovinos, pudiéndose utilizar para predecir la fertilidad en esta especie. Entre las desventajas, se destaca la sensibilidad del test, los equipos para el corte de la zona pelúcida y la habilidad requerida del técnico para efectuar estos procedimientos (Liu y cols., 2004).

1.3.2. Test de fecundación *in vitro* homólogos y heterólogos

La utilización de oocitos y espermatozoides en un sistema *in vitro* permite analizar con mayor detalle las diferentes fases del proceso de fecundación que no pueden ser exploradas *in vivo*, por consiguiente se considera un método adecuado para medir la fertilidad del macho (capacidad fecundante del espermatozoide) (revisado por Gadea, 2001). La capacidad fecundante de los espermatozoides se define como la capacidad que tienen los espermatozoides para fecundar un oocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi, 1984). Los oocitos utilizados en las técnicas de fecundación *in vitro*, pueden ser de la misma especie que la de los espermatozoides (homólogos) o de distinta especie (heterólogos), requiriendo en ocasiones la eliminación de la zona pelúcida en el caso de los test de fecundación heterólogos.

Los sistemas de fecundación *in vitro* homólogos se desarrollaron inicialmente para la producción de embriones, aunque posteriormente les han dado otra clase de usos como la evaluación de los mecanismos fisiológicos implicados en la fecundación (Cox y cols., 1995). En el caso del espermatozoide, mediante estos test se evalúan la capacitación espermática, la reacción acrosómica, la penetración de la zona pelúcida, la unión a la membrana plasmática del oocito y la descondensación de la cabeza espermática (Yanagimachi, 1984). Este tipo de sistemas implican la maduración *in vitro* oocitaria, la fecundación *in vitro* de oocitos y el cultivo embrionario. Para algunos autores, los resultados obtenidos de estas técnicas pueden ser consideradas como un predictor bastante preciso de la fecundación *in vivo*, al asumir que las condiciones en este tipo de técnicas imitan la situación *in vivo*. En este sentido, en porcino, la penetración de oocitos por espermatozoides de machos fértiles alcanzó el 66%, mientras que en los procedentes de subfértiles sólo fue del 25% (Ivanova y Mollova, 1993). Por otra parte, existen diferencias en la fertilidad *in vitro* entre los machos donantes de semen, y esta diferencia ha despertado interés para conocer si existe una relación entre la fertilidad *in vivo* y la *in vitro* (revisado por Larsson y Rodríguez - Martínez, 2000).

La fecundación *in vitro* heteróloga está ampliamente desarrollada en oocitos de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Esta técnica se emplea principalmente como test de la capacidad fecundante de los machos en diferentes especies, aunque también ha sido utilizada al igual que el sistema homólogo para el estudio de fusión de gametos. Este tipo de fecundación adquiere importancia en especies en donde los oocitos homólogos son difíciles de obtener en grandes cantidades como lo son los casos de la especie humana (Wang y cols., 1991), algunas especies de interés zootécnico como el caprino (Cox y cols., 1995) y el ovino (Slavik y Fulka, 1990), y en especies en peligro de extinción

(Kouba y cols., 2001). La información obtenida de estas pruebas puede ser aplicable a técnicas de reproducción asistida en los grupos de especies anteriormente mencionadas.

El test heterólogo de penetración espermática "Sperm Penetration Assay" (SPA), desarrollado por Yanagimachi en 1972, es uno de los test de fecundación *in vitro* más utilizados. Con este test se demostró que los oocitos de hámster libres de zona pelúcida "Zona - Free Hamster Egg" (ZFHE), podían ser usados como sustitutos de los oocitos humanos en la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides humanos (Yanagimachi, 1984). Desde entonces se han mejorado y optimizado protocolos que generalmente han buscado determinar la capacidad fecundante del espermatozoide (Berger y Parker, 1989), gracias a que permiten evaluar algunos de los procesos fisiológicos necesarios para que el espermatozoide fecunde al oocito. Sin embargo, se considera que este test omite procesos importantes durante la fecundación como es la penetración de la zona pelúcida, debido a que esta estructura es considerada por algunos autores la barrera más importante que debe sortear el espermatozoide para conseguir la penetración del oocito, y en consecuencia se cuestiona la eficiencia de estos test como evaluadores de la fertilidad (García - Álvarez y cols., 2009). Sin embargo, la zona pelúcida es considerada por otros autores como la barrera encargada de brindar especificidad entre especies (Sinowitz y cols., 2003), lo que otorga la relevancia a este tipo de prueba. Aitken, en 1994, concluyó que el test de penetración en oocitos de hámster libres de zona pelúcida provee una medida de la capacidad del espermatozoide para completar los procesos fisiológicos requeridos para una fecundación normal. Algunos autores también han reportado el ZFHE como predictor de infertilidad masculina *in vivo* e *in vitro*, y además lo han relacionado con factores funcionales espermáticos relacionados con la fertilidad espermática (Oh y cols., 2009).

Algunos trabajos en los que se ha utilizado el test de penetración heteróloga en oocitos de hámster libres de zona pelúcida en especies heterólogas son: en ratón (Yanagimachi, 1976), en caprino (Berger, 1989), en ovino (Garde y cols., 1992; Choudhry y cols., 1995), en humano (Wang y cols., 1991), en equino (Wilhem y cols., 1996), en porcino (Oh y cols., 2009), y en bovino (Bousquet y Brackett, 1982).

Por otra parte, cada vez es más frecuente en los test heterólogos la sustitución de oocitos de hámster dorado por oocitos de origen bovino (Slavick y cols., 1990) y porcino (Oh y cols., 2009), especies que de igual manera aportan una cantidad considerable de oocitos para el desarrollo de la prueba, gracias al volumen de ovarios que se pueden recolectar de hembras de estas especies destinadas a sacrificio. (Berger, 1989; Slavick y cols., 1990; Cox y cols., 1994; García - Álvarez y cols., 2009). Para estos test se pueden utilizar oocitos intactos (con células del *cumulus* y zona pelúcida), desnudados (sin células

del *cumulus*) o libres de zona pelúcida. Este tipo de análisis presenta la ventaja de que permite utilizar oocitos de especies filogenéticamente más similares que el hámster. Algunas especies en las que se han utilizado estos sistemas para la evaluación de semen utilizando oocitos intactos han sido en linaje ibérico (uso de oocitos de gato; Gañán y cols., 2009), caprino (uso de oocitos de bovino; Cox y cols., 1995; Slavick y Fulka; 1993) y ovino (uso de oocitos de bovino; García - Álvarez y cols., 2009).

1.4. Maduración *in vitro* en oocitos bovinos

A pesar de que en los test de penetración se pueden utilizar oocitos inmaduros (Rodríguez-Martínez y cols., 2003; Zhao y cols., 2002), si se quiere observar la correcta formación pronuclear es necesario que los oocitos estén maduros, es decir, en estadio de metafase II. Cuando los oocitos se recuperan de los folículos de ovarios de matadero, éstos están inmaduros, y por lo tanto, habrá que terminarlos de madurar en condiciones *in vitro*. En la maduración del oocito se producen una serie de modificaciones tanto en el citoplasma como en el núcleo con el fin de prepararse para la fecundación y dar soporte durante la fase temprana de desarrollo embrionario preimplantacional.

En la maduración *in vitro* se busca recrear mediante distintas técnicas *in vitro* y protocolos, los eventos que suceden fisiológicamente en el ovario. Entre los factores determinantes en los procesos de maduración *in vitro* está la duración y las condiciones de cultivo. En bovino, la duración del cultivo oscila entre 22 a 24 horas, aunque se ha observado que 22 horas son suficientes para completar los procesos de maduración citoplasmática y maduración nuclear. Por otra parte, entre las condiciones de cultivo importantes encontramos la osmolaridad, el pH, la temperatura, el volumen de cultivo, la tensión de O₂ y de CO₂, y el tiempo de cultivo. La osmolaridad en los medios de cultivo debe estar en los rangos fisiológicos (270 - 300 mOsm/Kg), el pH debe estar alrededor de 7,4 (usualmente los medios son tamponados con NaHCO₃ para este fin), la temperatura a 38,5 °C, el volumen debe mantener un rango con el número de oocitos puestos en cultivo y la atmósfera debe estar humidificada y con el 5 % de CO₂ (Gordon, 2003).

Para la maduración de oocitos bovinos, se utiliza en la mayoría de laboratorios el medio (Tissue Culture Medium) TCM 199, el cual está clasificado como un medio complejo por la diversidad de sus componentes. Además estos medios en función de las necesidades hormonales y proteicas del cultivo, necesitan ser suplementados, y en este sentido se destacan el suero fetal bovino (FCS) (Dean y cols.,

1994), el cual tiene efecto estimulante sobre la expansión del *cumulus oophorus*, y el factor de crecimiento epidermal (EGF) que posee funciones reguladoras en el ovario (Harper y Brackett, 1993).

1.5. Fecundación *in vitro*

La fecundación se considera el proceso mediante el cual los gametos interactúan, se unen y tras la activación oocitaria dan origen a un cigoto (Wassarman y cols., 2001). La fecundación *in vitro* se ha definido como la penetración de espermatozoides con capacidad de fecundar en oocitos maduros fuera del tracto genital femenino.

En la fecundación *in vitro* se busca imitar mediante técnicas y protocolos las condiciones y los eventos que suceden fisiológicamente en la región ampular del oviducto, específicamente la interacción entre gametos y la formación de pronúcleos y singamia. En bovino, la duración del cocultivo es aproximadamente de 18 horas, aunque se conoce que a pocas horas de la fecundación ya existe interacción entre gametos. Los factores a controlar durante la fecundación *in vitro* son similares a los descritos en la maduración *in vitro*. Además, otros factores importantes en la fecundación *in vitro*, son la concentración inseminante, la procedencia de los espermatozoides, y los tratamientos previos a la fecundación (Greve y cols., 1991).

En el cocultivo de gametos en bovino y caprino se suele utilizar el Tyrode's albumina - lactato - piruvato (TALP) (Greve y cols., 1991), este medio suele estar suplementado con otras sustancias como la albumina sérica bovina (BSA), por su propiedad surfactante, y por favorecer la pérdida de colesterol de la membrana de los espermatozoides.

1.5.1. Capacitación e hiperactivación espermática

La capacitación espermática se define como el proceso que sufre el espermatozoide para adquirir la capacidad para fecundar un oocito maduro. Este proceso se inicia con la eliminación de algunos factores unidos al espermatozoide procedentes del plasma seminal, y finaliza cuando dicho espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida y se produce la reacción acrosómica (Breitbart y cols., 1997). La capacitación se considera un proceso reversible, en el que se producen una serie de

cambios fisiológicos entre los que se destacan la pérdida de la estabilidad de la membrana plasmática y la hiperactivación espermática (Visconti y Kopf, 1998; Breitbart y cols., 2005).

Mediante diversos procedimientos *in vitro* se puede inducir artificialmente la capacitación en los espermatozoides mediante su incubación durante periodos determinados en medios definidos (Bergqvist y cols., 2006), como el TALP o el mDM (medium Defined Medium); (Izquierdo, 1996). Estos medios están formados por sales, electrolitos, fuentes energéticas, y son usualmente suplementados con factores capacitantes como la BSA (Younis y cols., 1991). Otra sustancia capacitante habitualmente utilizada es la heparina, que está compuesta por un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena recta, el cual desencadena el proceso de capacitación en el espermatozoide (Palma y cols., 2000; Parrish y cols., 1988). Al parecer la heparina favorece la entrada de calcio al espermatozoide y está asociada a todos los procesos característicos de la capacitación, aunque su mecanismo de acción no se ha esclarecido aún.

Entre las técnicas de selección y preparación de los espermatozoides de mamíferos para los procesos *in vitro*, se destacan tanto la técnica de selección por gradientes, como el "Swim Up". Estas técnicas tienen como objeto separar los espermatozoides del plasma o diluyente seminal, para obtener espermatozoides más móviles. Las técnicas de selección en gradientes discontinuos se utilizan para separar diferentes tipos de células. Esta técnica depende del principio de la centrifugación sobre un gradiente de densidad coloidal, en donde las células se moverán hasta un punto en el gradiente correspondiente a su densidad. Los espermatozoides tienen un punto diferente de densidad a otros tipos de células como los leucocitos, las células epiteliales, bacterias y detritos celulares, por lo tanto pueden ser separadas de otros componentes del eyaculado. El plasma seminal permanece en la parte alta del gradiente. Los espermatozoides móviles se orientan en dirección a la fuerza centrífuga y se precipitan más rápido que los inmóviles (Morell, 2006). Por otra parte, el "Swim Up" fue desarrollado por Parrish y colaboradores, en 1984, y se fundamenta en la motilidad que poseen los espermatozoides en mejores condiciones, otorgándole una capacidad migratoria ascendente durante un periodo determinado en un medio definido (Palma y cols., 2000; Morell, 2006).

1.6. Interacción entre gametos

Durante la fecundación es necesario que ocurran una serie de eventos coordinados entre el oocito y el espermatozoide para permitir el desarrollo a un nuevo cigoto. Entre los eventos importantes en este

proceso se encuentran la reacción acrosómica del espermatozoide, la interacción entre membranas plasmáticas, la activación del oocito, la formación pronuclear y la singamia.

1.6.1. Reacción acrosómica

Finalizada la capacitación espermática, tiene lugar la reacción acrosómica (RA), la cual está considerada como un proceso de exocitosis del acrosoma del espermatozoide, consecuencia de la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Este proceso es indispensable para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida. El tiempo requerido para su desarrollo varía en función de la especie y de las condiciones físicas y bioquímicas. Se conoce que un aumento del calcio intracelular desencadena el proceso de exocitosis de la RA (Breitbart y cols., 1997).

La RA *in vivo* sucede cuando el espermatozoide interactúa con la zona pelúcida. En condiciones *in vitro*, la RA puede ser inducida artificialmente por la incubación de los espermatozoides en un medio definido o por la exposición a inductores de la RA. Se conocen numerosos inductores de la RA entre los que se incluyen la progesterona, el fluido folicular, las secreciones de las células del *cumulus*, el sulfato de esterol, los glicosaminoglicanos y el ionóforo de calcio (Gordon, 2003). Este último por sus características hidrofóbicas, es capaz de transportar iones Ca^{++} del medio externo a través de las membranas celulares e inducir un flujo de calcio hacia el interior del espermatozoide, y por consiguiente aumentar el calcio libre dentro de la célula, e inducir directamente la RA (Pereira y cols., 2000).

1.6.2. Zona pelúcida

La zona pelúcida posee receptores específicos para la unión de espermatozoide, otorgando un efecto restrictivo a esta unión. Gracias a esta restricción, se considera a la zona pelúcida como una de las principales barreras que debe atravesar el espermatozoide en el proceso de fecundación, además de convertir esta barrera en infalible en algunos casos de interacción interespecífica (Sinowatz y cols., 2003).

En relación a la especificidad entre especies, se conoce que algunas especies no presentan restricción para su fecundación, pero en la gran mayoría no es posible la fecundación. Se considera que a nivel de interacción de gametos, la zona pelúcida es la principal barrera para esta fecundación interespecífica, tomando como prueba que tras su eliminación este tipo de fecundación es posible. Existen reportes de penetración y/o fecundación heteróloga en diferentes especies en oocitos sin zona pelúcida en la especie humana (Yanagimachi y cols., 1976), caprino (Berger, 1989) y porcino (Zhao y cols., 2002), entre otros.

1.6.3. Interacción entre membranas plasmáticas

Tras atravesar la zona pelúcida, el espermatozoide entra en contacto con el oocito. Durante este proceso ocurre la interacción entre las membranas plasmáticas de los gametos. El proceso de interacción y fusión entre membranas se divide en tres fases. Durante la primera fase o de reconocimiento, se produce el contacto entre las membranas. En la segunda fase, se produce la adhesión entre membranas. En la tercera fase, se mezclan los lípidos entre membranas, otorgando continuidad a la bicapa lipídica dando como resultado la fusión entre gametos (Talbot y cols., 2003).

1.6.4. Activación oocitaria y formación pronuclear

Tras la fusión de los gametos, se desencadena la activación del oocito, que se puede describir como una sucesión de cambios celulares inducidos por el espermatozoide, que preparan al oocito para la transformación en embrión. La activación se puede describir mediante el modelo que hace referencia a los factores espermáticos, ya que tras la fusión entre los gametos se libera en el ooplasma un factor activador oocitario de origen espermático, el cual induce los eventos de la cascada de activación (Williams y cols., 2002). Los gránulos corticales tras el proceso de maduración se encuentran alineados bajo la membrana plasmática, y al activarse el oocito se fusionan a la membrana e inician el proceso de exocitosis liberando su contenido al espacio perivitelino. El contenido de estos gránulos son enzimas hidrolíticas, que ejercen un efecto en la zona pelúcida modificando sus características físicas y químicas, bloqueando la entrada a otros espermatozoides (Crozet, 1993).

En la formación del pronúcleo masculino, el primer acontecimiento es la degeneración y pérdida de la membrana nuclear y la exposición de la cromatina a los componentes del citoplasma del oocito y comienza su descondensación. Por otra parte, en la formación del pronúcleo femenino después de la expulsión del segundo cuerpo polar en el oocito, también se descondensa la cromatina materna y se genera una nueva membrana nuclear. Una vez formados los pronúcleos éstos se desplazan hacia el centro del cigoto hasta que sus membranas están en aposición (Crozet, 1993).

Debido a la importancia que representan las pruebas de fertilidad *in vitro* para evaluar algunos aspectos de la calidad del semen, a la sensibilidad que otorgan los test de interacción entre gametos para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides y a la dificultad que presenta la consecución de oocitos caprino en animales destinados a sacrificio, en este trabajo se desarrolló una prueba de fecundación *in vitro* heteróloga, mediante el uso de oocitos de bovino, aplicable a espermatozoides de caprino.

2. Objetivo

- El objetivo principal del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de los factores que influían en el procedimiento de fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga con espermatozoides de origen caprino de la raza Murciano-Granadina y oocitos de vacuno madurados *in vitro*, para su posible uso, en un futuro, como un test de fertilidad complementario a otros test *in vitro* de los machos de caprino.

3. Material y métodos

3.1. Obtención, selección y maduración *in vitro* de los oocitos

3.1.2. Recolección de oocitos

Para este trabajo se utilizaron ovarios procedentes de novillas sacrificadas en matadero, los ovarios se transportaron en un recipiente isotérmico a 35 °C aproximadamente, con solución salina fisiológica (0,9% NaCl + antibióticos). Al llegar al laboratorio los ovarios fueron lavados 2 ó 3 veces con solución salina fisiológica.

Posteriormente se aspiraron los folículos con un tamaño aproximado de 2 a 8 mm mediante una jeringa de 10 mL con aguja (18G), utilizando para su extracción medio M-199 con HEPES (Sigma M-7528) suplementado con 7% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco 10108065), penicilina / estreptomicina (10000 UI/mL) (AB) y heparina (170 UI/mL). La mezcla Complejos Cúmulo Oocito (COC's), líquido folicular y medio era depositada en placas de petri. A continuación los COC's con las capas de células de la granulosa intactas y homogéneas se recuperaron bajo microscopio - estereoscopio (Nikon® SMZ – 1000). Finalmente, se lavaron 4 veces con medio H M199 compuesto por: M 199 con HEPES suplementado con el 7 % FBS y AB, y se sometieron al proceso de maduración *in vitro*.

3.1.3. Maduración *in vitro*

Para la maduración de los COC's se utilizó medio para maduración *in vitro* (MIV) compuesto por M199 (Sigma M-4530) suplementado con 10% (FCS), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y AB. La maduración se desarrolló en placas Nunc® de 4 pocillos. En cada pocillo se depositaron 500 µL de medio, recubiertos con 400 µL de aceite mineral (Sigma M-8410), la proporción fue aproximadamente de 50 COC's por pocillo. Los COC's se mantuvieron en maduración durante 22-24 horas, a 38,5°C en una atmósfera humidificada y al 5% CO₂.

3.2. Obtención del eyaculado, selección y capacitación espermática

3.2.1. Recuperación del eyaculado

Para la recuperación del eyaculado, se utilizaron machos cabríos adultos de raza Murciano Granadina, pertenecientes a un programa de inseminación artificial. Los eyaculados se obtuvieron mediante una vagina artificial previamente atemperada a 43-46°C, finalizada la recuperación en cada uno de los eyaculados se determinó la concentración espermática con ayuda de un espectrofotómetro calibrado específicamente para caprino (IMV® Accucell 914) mediante dilución de una alícuota del eyaculado (10 µL de eyaculado en 3990 µL de NaCl 0,9%). Luego se realizó una valoración de motilidad subjetiva, diluyendo una alícuota del semen (10 µL de eyaculado en 990 µL de solución tamponada fosfato PBS a 37°C), y se valoraron los movimientos progresivos de los espermatozoides a 400 X, utilizando una escala de 1 – 100, con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fases positivo con una placa termostata a 37°C (Nikon® Eclipse E 200). Durante el desarrollo de estos procesos los eyaculados permanecieron en baño de agua atemperado a 35°C.

3.2.2. Dilución, empajuelado y refrigeración del eyaculado

Con los valores de concentración y motilidad subjetiva, se calculó el número de espermatozoides móviles/mL, y a continuación se añadió diluyente a base de leche (10 gr de leche descremada en polvo + 200 mg de glucosa + 100 mL de agua destilada + antibiótico (0.5 mg penicilina, 0.3 mg estreptomicina/mL); tratada térmicamente a 92°C durante 10 minutos) al eyaculado, ajustando a una concentración final de 550×10^6 espermatozoides/mL. El eyaculado diluido se envasó manualmente en pajuelas plásticas de 0,25 mL (Minitub®) para inseminación artificial, y éstas fueron selladas con polivinilpirrolidona (PVP) obteniendo de este modo las dosis seminales. Los procesos de dilución y empajuelado de las dosis se efectuaron a temperatura ambiente (22-25°C).

A continuación las dosis seminales fueron enfriadas lentamente desde temperatura ambiente (22 - 25°C) hasta la temperatura de almacenamiento (4°C), con ayuda de una máquina programable de descenso controlado de temperatura (Julabo® IMV®), la cual fue programada para un descenso de 0,3

°C/min, desde 20°C hasta 4 °C durante 90 minutos. Finalizado este proceso, las dosis se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico conservando la temperatura, allí se almacenaron de nuevo en un frigorífico a 4 - 5°C hasta el inicio de los procesos de selección y capacitación espermática.

3.2.3. Selección y capacitación espermática

La selección y capacitación espermática se realizó en medio mDM (Izquierdo y cols., 1996), con la siguiente composición: 112 mM de NaCl (Sigma S9888), 4,02 mM de KCL (Sigma P5405), 0,83 mM de NaH₂PO₄ H₂O (Sigma S9638), 2,25 mM Ca₂Cl 2H₂O(Sigma C2661), 0,52 mM de Mg₂Cl 6H₂O (Sigma M0250), 5mL/L de Gentamicina (Gibco 15710-049), 2mL/L de Rojo Fenol (Sigma O-0290), 37 mM de NaHCO₃ (Sigma S5761), 13,90 mM de Glucosa (Sigma D 9559), 1, 56 mM de Piruvato Sódico (Sigma P4562), 6 g/L de BSA (Albumina Sérica Bovina) (Sigma A-8806), H₂O (Sigma W-1503).

Las pajuelas fueron extraídas del frigorífico y se mantuvieron a temperatura ambiente (22 - 25°C) durante 5 minutos. A continuación se lavó y seleccionó a los espermatozoides aprovechando su capacidad migratoria, mediante uso del "Swim Up". Para esta técnica, se distribuyeron 2 mL de medio mDM, en tubos cónicos y luego se depositaron cuidadosamente en el fondo de estos tubos 100 µL del contenido de una mezcla de dos dosis (pajuelas) de un mismo macho o de machos diferentes según el experimento. Estos contenidos se incubaron en un incubador a 38,5°C con 5% de CO₂ durante 1 hora, tiempo durante el cual ascendían los espermatozoides más móviles a la parte superior del medio.

Transcurrido este periodo, se extrajo 1 mL de sobrenadante de cada tubo y a este contenido se añadió a una cantidad igual (1 mL) de medio de capacitación (mDM + 200 µg heparina (Sigma H9399) + 800 nM ionomicina (Sigma IO634)), de forma que la concentración final de sustancias capacitantes en la mezcla fue de 100 µg heparina y 400 nM ionomicina. Los espermatozoides fueron incubados con las sustancias capacitantes durante 15 min a 38,5°C con 5 % de CO₂.

Pasado este periodo se retiraron las muestras del incubador y a este volumen se le añadieron 2 partes más de medio H M199 para diluir y tamponar este medio y a continuación las muestras fueron lavadas mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante dejando en el tubo un volumen mínimo variable de 20 a 60 µL (pellet) y, en función de la cantidad de espermatozoides presentes, se añadió una cantidad variable de medio H M199 (50 µL aproximados).

Posteriormente, se homogeneizó el pellet obteniendo de esta manera el semen para la fecundación *in vitro*, y finalmente se calculó la concentración inseminante.

3.2.4. Cálculo de la concentración inseminante

Para la determinación de la concentración espermática inseminante, se diluyó el semen (dilución 1:50; v:v) con una solución de glutaraldehído al 2% en solución tamponada fosfato "Phosphate Buffered Solution" (PBS, Sigma D8537), se homogeneizó la mezcla, y se colocaron 10 μ L de la dilución en una cámara de recuento celular Thoma[®], efectuando el recuento de espermatozoides a 400 X en microscopio (Nikon[®] E 400) de campo claro. Para el recuento, se contaron los espermatozoides de cuatro recuadros en diagonal más uno aleatorio en la cámara, este número se multiplicó por el factor de la cámara (50), y por el factor de la dilución (50), obteniendo así el número de espermatozoides/ μ L.

Adicionalmente, se colocaron 10 μ L de semen en un portaobjetos y se realizó una valoración de motilidad subjetiva a 100 X en un microscopio de campo claro (Nikon[®] E 400), corrigiendo del número de espermatozoides/mL por el porcentaje de espermatozoides no mótils.

3.3. Fecundación *in vitro*

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron: **a** - Complejos *cumulus* oocito (COC's), **b** - Oocitos sin células del *cumulus* y **c** - Oocitos sin zona pelúcida. En función del experimento, algunos COC's no sufrieron ningún tratamiento previo a la fecundación, mientras que en otros experimentos fueron eliminadas las células del *cumulus* y/o la zona pelúcida.

3.3.1. Eliminación de las células del *cumulus* y de la zona pelúcida

Para retirar las células del *cumulus* adyacentes a los oocitos, éstos fueron tratados en H M 199 con hialuronidasa (1 mg/mL) durante 1 minuto, siendo a la vez pipeteados repetidas veces a través de una

pipeta de vidrio fina. Por otro lado, para la eliminación de la zona pelúcida (ZP), a los oocitos previamente despojados de las células del *cúmulus*, se les efectuó un tratamiento con pronasa diluida al 0,5% en PBS (Sigma D8537) durante 2 minutos o hasta la digestión evidente de la zona pelúcida. Tras estos tratamientos, los oocitos fueron distribuidos y se continuó con el proceso de fecundación *in vitro*.

3.3.2. Fecundación *in vitro* y cocultivo de gametos

La fecundación *in vitro* (FIV) se realizó en medio Tyrode's albumina lactato piruvato modificado (TALP-FIV), con la siguiente composición: 112 mM de NaCl (Sigma W-1503), 3,219 mM de NaH₂PO₄ H₂O (Sigma W-1503), 2,041 mM Ca₂Cl H₂O (Sigma W-1503), 0,492 mM de Mg₂Cl 6H₂O (Sigma W-1503), 5 mL/L de gentamicina (Gibco 15710-049), 2 mL/L de rojo fenol (Sigma O-0290), 992 mL/L de H₂O (Sigma W-1503), 3,1 mL/L de lactato de sodio (Sigma L-4273), 1,2491 mL/L de ácido pirúvico (Sigma P-2256), 23,806 mM de NaHCO₃ (Sigma W-1503), 6 g/L de BSA (Sigma A-8806).

El cocultivo se desarrolló en placas Nunc® de 4 pocillos. En cada pocillo se depositaron 500 µL de medio TALP-FIV, recubiertos con 400 µL aceite mineral (Sigma M-4530), manteniendo una relación de 10 µL de medio por oocito. La concentración inseminante utilizada para la fecundación *in vitro* fue de 1x10⁶ espermatozoides/mL. Los gametos permanecieron en condiciones de cocultivo durante 18 horas a 38,5 °C en una atmósfera humidificada al 5 % CO₂.

3.4. Valoración de los resultados

3.4.1. Evaluación de la maduración *in vitro*

Se evaluó el estado nuclear de los oocitos tras 22 a 24 horas en condiciones de maduración *in vitro*. Para ello, se retiró una cantidad determinada de oocitos de cada uno de grupos en maduración, los cuales se despojaron de las células del *cumulus* mediante tratamiento con hialuronidasa y paso por pipeta fina, y a continuación en estereoscopio se buscó la presencia del primer corpúsculo polar en el

espacio perivitelino del oocito. Por último se determinó la tasa de oocitos que presentaban el corpúsculo polar, del total de oocitos evaluados, descartando aquellos que no presentaban dicho corpúsculo, es decir aquellos que no estuvieran en estado de metafase II, excepto cuando se utilizaron COC's para el experimento.

3.4.2. Evaluación de la fecundación *in vitro*

Finalizadas las 18 horas de periodo de cocultivo, todos los presuntos cigotos se retiraron del medio TALP – FIV y se despojaron de las células del *cumulus* con ayuda de hialuronidasa y por paso en pipeta fina. Luego todos los oocitos se lavaron en medio H M199 y se sometieron a tinción con Hoechst 33342.

La tinción con Hoechst 33342 se efectuó en una solución de Hoechst (25.6 mg/mL) en Etanol, usando placas Nunc® de 4 pocillos. En el primer pocillo se depositaron 600 µL de PBS, y en los pocillos restantes se depositaron 600 µL de Hoechst - Etanol. Los oocitos se retiraron del medio H M199, se lavaron en PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, y finalmente todos se depositaron en Hoechst - Etanol durante un periodo igual o superior a 15 minutos, en condiciones de oscuridad.

Para la valoración al microscopio, los oocitos se retiraron del Hoescht -Etanol y se colocaron en PBS-Glicerol (dilución 1/3; v/v), siendo posteriormente montados en portaobjetos. Los presuntos cigotos fueron evaluados bajo microscopio (Nikon® Eclipse E 400) de fluorescencia (filtro UV) a 1000 X, buscando formación de pronúcleos en los presuntos cigotos. Los oocitos fueron clasificados en dos categorías: **a** - Oocitos No fecundados: cuando en el ooplasma del oocito no se observó ninguna estructura o se diferenció la placa metafásica. **b** - Oocitos fecundados: cuando en el citoplasma del oocito se detectaron dos o más pronúcleos.

3.4.3. Evaluación de la calidad espermática

La calidad del eyaculado de los machos cabríos se evaluó a través de pruebas de motilidad y viabilidad espermática, que se efectuaron en los momentos tras la dilución del eyaculado en leche, tras la refrigeración, tras la capacitación y tras el periodo de cocultivo dependiendo del experimento.

Motilidad espermática

En las pruebas de motilidad seminal se mezclaron dos pajuelas del mismo macho o de diferentes machos en función del experimento, y se realizó un análisis objetivo de la movilidad espermática mediante un sistema computarizado de análisis de motilidad (CASA; ISAS, versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España). Para el análisis se capturaron 25 imágenes en 1 segundo, y se analizaron las partículas con un tamaño comprendido entre 15 y 70 μm . El radio de búsqueda fue de 12 μm y se consideraron como espermatozoides móviles los que presentaban una velocidad de la trayectoria media (VAP) superior a 10 $\mu\text{m/s}$, mientras que los espermatozoides que presentaron un índice de rectitud (STR) superior al 80% se consideraron móviles progresivos.

Para este proceso las muestras fueron diluidas en TRIS 300 + BSA (0.6%) (Tris 30,27 mg – Ácido cítrico 15,94 mg – Glucosa 12,43 mg + 6 mg BSA /mL) a una concentración de 15×10^6 espermatozoides/mL, siendo incubadas durante 10 minutos a 37 °C previamente a su valoración. Para la valoración, se colocaron 5 μL de cada alícuota en una cámara Makler® atemperada a 39 °C, y fue colocada en un microscopio (Nikon® Eclipse 90i). La motilidad fue evaluada a 39 °C mediante un objetivo 10 X de contraste de fases negativo en un microscopio conectado al ordenador mediante una videocámara monocromática (Basler, Alemania), siendo evaluados un mínimo de 200 espermatozoides por análisis (Tomás, 2007). Los parámetros de motilidad utilizados para este trabajo fueron el porcentaje de espermatozoides móviles totales y el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos.

Viabilidad espermática

La viabilidad de cada muestra fue determinada mediante tinciones fluorescentes (Invitrogen, Barcelona, España) y citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito por Purdy y Graham, en 2004. Brevemente, las muestras fueron diluidas hasta una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL con medio TRIS + BSA (0,6 %). Posteriormente, a 550 μL de esta dilución se añadieron 2,5 μL de SYBR 14 (10 μM en dimetilsulfóxido) y 2,5 μL de yoduro de propidio (PI, 1 mg/mL en agua ultrapura). Las muestras fueron a continuación incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se filtraron a través de un filtro de nylon de 40 μm , antes de ser analizadas en el citómetro de flujo (Tomás, 2007).

Para la valoración de viabilidad de los espermatozoides transcurridas 18 horas de incubación (Periodo de cocultivo), se utilizó la misma concentración de espermatozoides aplicado en la fecundación *in vitro*, colocando 1 mL de espermatozoides diluidos en medio FIV-TALP en un tubo cónico que fue incubado en las mismas condiciones que el cocultivo de espermatozoides y oocitos. Una vez finalizado el tiempo de cocultivo, se retiraron 550 μ L de muestra y se añadieron las tinciones a la concentración previamente descrita, por lo que el protocolo de tinción fue ligeramente modificado.

Las muestras fueron analizadas mediante un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España) equipado con un láser de argón a 488 nm y 100 mW. Para cada muestra se recogieron datos de fluorescencia de 10.000 eventos utilizando un filtro de paso largo de 550 nm, un filtro de paso de banda de 525 nm (FL1) para detectar la fluorescencia del SYBR 14, un filtro de paso largo de 600 nm y un filtro de paso de banda de 620 nm (FL3) para detectar la fluorescencia del PI (Tomás, 2007).

Según este protocolo, se obtendrán cuatro subpoblaciones en cada muestra: el porcentaje de espermatozoides teñidos sólo con el SYBR-14 (% de vivos), el porcentaje de espermatozoides teñidos con el PI (% de muertos), porcentaje de espermatozoides teñidos con las dos tinciones (% de moribundos) y partículas no teñidas. En la práctica los moribundos se contabilizan como muertos, pues es sólo cuestión de tiempo el paso de una población a otra (Tomás, 2007).

Un diagrama del protocolo general es detallado en la figura 1.

3.5. Experimentos

Todos los experimentos constan de partes comunes tales como la recuperación del eyaculado, la evaluación de la calidad seminal, la selección espermática, así como la maduración, la fecundación *in vitro*, el periodo de cocultivo y la evaluación de la fecundación *in vitro*. A excepción del experimento 1 en donde no se evaluó la calidad seminal. En general los experimentos se desarrollaron durante el periodo comprendido entre el mes de febrero y el mes de julio del año 2009.

3.5.1 Experimento 1: Procedimientos de Fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados *in vitro* de bovino

El objeto de este experimento fue determinar el efecto de la fecundación heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos de vacuno con células del *cumulus* y zona pelúcida, en oocitos con zona pelúcida, y en oocitos sin zona pelúcida. Para esto finalizada la MIV los oocitos se distribuyeron en el medio TALP – FIV en 3 grupos:

- a) Complejos *cumulus* oocito (COC's).
- b) Oocitos con zona pelúcida y sin células del *cumulus*.
- c) Oocitos sin zona pelúcida.

El proceso de capacitación espermática se modificó para los grupos a y b, ya que al ser oocitos con zona pelúcida y/o células del *cumulus* no se indujo la reacción acrosómica en los espermatozoides. Por ello, en estos dos grupos los espermatozoides no fueron incubados con ionomicina, por lo que a 1 mL de muestra se le añadió 1 mL de medio de capacitación mDM + 200 µg / mL heparina, obteniendo una concentración final de heparina de 100 µg/mL. Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados en medio con la heparina durante 45 min a 38,5°C con 5 % de CO₂. Luego se efectuó el lavado con medio H M199 mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos, se separó el pellet, se añadió medio H M199, y finalmente se calculó la concentración inseminante. Para este experimento se hizo un pool eyaculados de diferentes machos. Además, se hicieron valoraciones únicamente de motilidad subjetiva. Para este experimento se desarrollaron tres réplicas.

3.5.2. Experimento 2: Efecto del macho en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática previo a la fecundación *in vitro* heteróloga y su eficiencia en la formación pronuclear

En este experimento se utilizaron los eyaculados individuales de cuatro machos para comparar los parámetros de viabilidad, porcentajes de espermatozoides móviles y el parámetro de formación pronuclear entre estos machos. En este experimento, y debido a los resultados obtenidos en el experimento previo, se utilizaron oocitos sin zona pelúcida. Para este experimento se desarrollaron seis sesiones, otorgando a cada macho cuatro réplicas.

3.5.3. Experimento 3: Evaluación de la respuesta de machos con diferentes fertilidades *in vitro* a diferentes concentraciones de ionomicina en un protocolo de capacitación espermática

Tomando como partida el segundo experimento, se utilizaron los dos machos que mejor y peor resultados presentaron en los parámetros de calidad espermática y formación pronuclear. Se testaron tres concentraciones de ionomicina diferentes (400 nM/mL, 200 nM/mL, y 100 nM/mL de ionomicina, respectivamente). Para este experimento se desarrollaron tres réplicas.

3.5.4. Experimento 4: Efecto del lavado del plasma seminal en los 2 machos de mayor y menor fertilidad *in vitro*, sobre parámetros de calidad espermática y capacidad fecundante en FIV heteróloga

En este experimento se comparó el efecto del lavado (Retirar el plasma seminal) del eyaculado en los parámetros de calidad seminal y formación pronuclear, para descartar que las diferencias observadas entre los dos machos de alta y baja fertilidad *in vitro* fuesen debidas a la interacción del plasma seminal con el diluyente en lugar de a diferencias entre los espermatozoides de los machos.

Para este experimento se dividió el volumen de eyaculado de cada macho en dos partes iguales, una de éstas fue tratada de la forma descrita en el protocolo general (es decir, el plasma seminal no fue eliminado), mientras que la otra muestra fue lavada para eliminar el plasma seminal. Para el lavado de la muestra se siguió el protocolo descrito por Tomás, (2007). Brevemente, la muestra fue diluida con TRIS 300 y fue centrifugada dos veces a temperatura ambiente a 500 g durante 15 minutos antes de diluir la muestra con el medio de leche descremada y continuar con el protocolo general descrito previamente. Para este experimento se desarrollaron tres réplicas.

3.6. Análisis estadístico

En el análisis de datos, se analizaron el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo, el porcentaje de espermatozoides vivos (Viabilidad), y el porcentaje de oocitos con formación de dos o más pronúcleos. De igual forma, se tabularon las medias mínimo cuadráticas (MMC) de los caracteres normales analizados con un modelo mixto (motilidad y viabilidad), y se tabularon las estimas de las medias en la escala real (MER) al analizar modelos lineales generalizados para variables binomiales (formación de dos o más pronúcleos).

En el primer experimento, el análisis de las tasas de oocitos con formación pronuclear se efectuó mediante un análisis inicial una prueba de X^2 , y luego se efectuó un análisis de regresión logística, utilizando el procedimiento GLIMMIX del programa SAS, al considerarse una distribución binomial de los datos e incluirse la sesión como efecto aleatorio.

En el segundo experimento, el análisis de los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática se efectuó bajo un modelo lineal mixto generalizado, incluyendo como efecto fijo el macho, y como efecto aleatorio la sesión. El análisis de las tasas de formación pronuclear se efectuaron de igual manera que en el experimento uno.

En el tercer experimento, el análisis de los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática se efectuó bajo un modelo lineal mixto, considerando como efectos fijos el macho y la concentración de ionomicina, y como efecto aleatorio la sesión. De igual manera las tasas de formación pronuclear se analizaron inicialmente con una prueba de X^2 y luego con un procedimiento GLIMMIX, comparando el efecto del macho, de la concentración de ionomicina, y la interacción entre el macho y la concentración de ionomicina.

En el cuarto experimento, el análisis de los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática se efectuó bajo un modelo lineal mixto considerando como efectos fijos el macho y el lavado del plasma seminal, y como efecto aleatorio la sesión. Las tasas de formación pronuclear se analizaron de igual manera que el experimento tres, comparando el efecto del macho, la presencia del plasma seminal, y por otra parte la interacción entre el macho y el efecto lavado del plasma seminal.

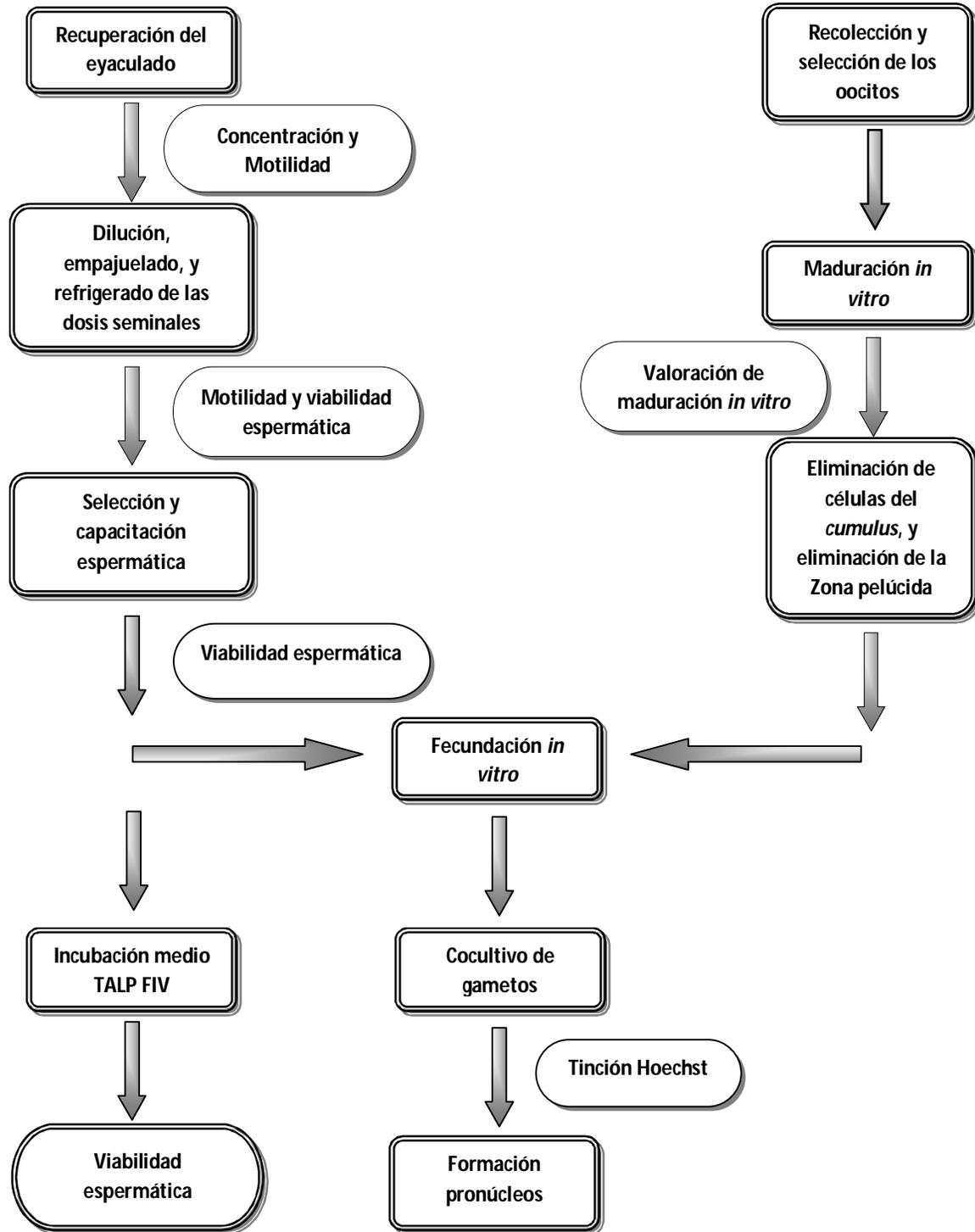


Figura 1. Diagrama del protocolo general

4. Resultados

4.1. Experimento 1: Procedimientos de Fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados *in vitro* de bovino

En la Tabla 1, se presentan las estimas obtenidas de formación pronuclear de tres procedimientos distintos de fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga. Cuando se utilizaron oocitos sin células del *cumulus* y libres de zona pelúcida (procedimiento A), se obtuvieron las tasas más elevadas de oocitos con dos ó más pronúcleos, que cuando se utilizaron oocitos con zona pelúcida (procedimiento B) o con zona y células del *cumulus* (procedimiento C), (A vs. B y C; 78,3% vs. 0,3-1,5%; respectivamente, $P < 0,05$). En las figuras 2 y 3, se observan oocitos de bovino con dos y tres pronúcleos, respectivamente.

Tabla 1: Estimias (MER) del efecto de distintos procedimientos de Fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga de espermatozoides caprinos con oocitos madurados *in vitro* de vacuno sobre las tasas de formación pronuclear.

Procedimientos de FIV heteróloga	Tipo de oocito vacuno		Tratamiento del espermatozoide caprino	Número de oocitos inseminados	% Oocitos ≥ 2 PN (e)
	ZP	CC			
A	-	-	Hep. + Iono.	97	78,3 ^b (19,0)
B	+	-	Heparina	98	0,3 ^a (0,5)
C	+	+	Heparina	104	1,5 ^a (1,8)

MER: Medias en la escala real. ZP: Zona pelúcida; CC: Células del *cumulus*. PN: Pronúcleos. (e): Error estándar; Hep.: Heparina; Iono: Ionomicina. ≥ 2 PN: Oocitos con 2 ó más pronúcleos.

^{a,b}: Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0,05$)

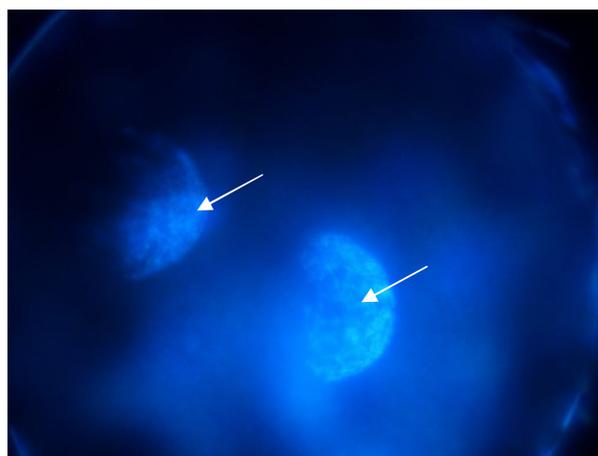


Figura 2: Oocito de bovino fecundado con espermatozoides de caprino (Presencia de dos pronúcleos en su citoplasma)

Vista a 1000 X en microscopio de fluorescencia. Tinción fluorescencia Hoechst 33342. Las flechas indican los pronúcleos.

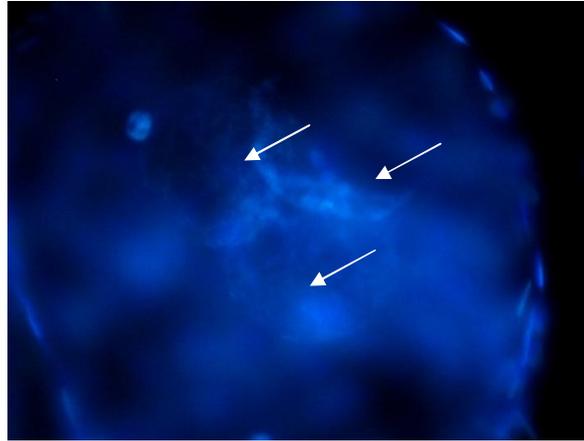


Figura 3: Oocito de bovino fecundado con espermatozoides de caprino (Presencia de tres pronúcleos en su citoplasma)

Vista a 1000 X en microscopio de fluorescencia. Tinción fluorescencia Hoechst 33342. Las flechas indican los pronúcleos.

4.2. Experimento 2: Efecto del macho en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática previo a la fecundación *in vitro* heteróloga y su eficiencia en la formación pronuclear

Las estimas de los resultados de los parámetros de motilidad, viabilidad espermática y formación pronuclear se presentan en la Tabla 2. En este experimento, se encontraron diferencias significativas entre machos en los parámetros de motilidad progresiva espermática tras la dilución del eyaculado, presentando los machos 1 y 2 valores menores que los del 3 y 4 (35,7-40,1% vs. 58,7-52,1% respectivamente, $P < 0,05$). Además, el macho 1 presentó menor viabilidad tras la refrigeración que el resto de machos (37,4% vs. 55,1-55,3-58,6%; respectivamente, $P < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre machos en el resto de los parámetros de motilidad y viabilidad espermática estudiados. Por otra parte, el macho 3 presentó una tasa de formación de 2 o más pronúcleos significativamente más elevada que los machos 1 y 4 (52,2% vs. 25,4-25,5%; respectivamente, $P < 0,05$).

Tabla 2: Estimaciones (MMC) del efecto del macho en los parámetros de motilidad, viabilidad espermática y (MER) formación pronuclear.

Macho	Dilución		Refrigeración			Incubación	Formación PN	
	% Motilidad Progresiva (e)	% Motilidad (e)	% Motilidad Progresiva (e)	% Motilidad (e)	% Viabilidad (e)	% Viabilidad (e)	Oocitos inseminados (n)	% Oocitos \geq 2 PN (e)
M1	35,7 ^a (3,6)	61,7 (7,5)	28,9 (6,9)	47,6 (7,8)	37,4 ^a (5,8)	14,5 (2,8)	136	25,4 ^{ab} (6,1)
M2	40,1 ^a (4,0)	69,2 (8,1)	41,6 (7,7)	56,5 (8,7)	55,1 ^b (6,4)	15,4 (2,9)	110	38,1 ^{bc} (7,7)
M3	58,7 ^b (3,6)	74,2 (7,5)	32,7 (6,9)	59,8 (7,8)	55,3 ^b (5,8)	13,6 (2,8)	128	52,2 ^c (7,7)
M4	52,1 ^b (3,6)	82,4 (7,5)	37,5 (6,9)	56,2 (7,8)	58,6 ^b (5,8)	15,5 (2,8)	123	23,5 ^a (5,9)

^{a,b,c}: Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0,05$)

MMC: Medias mínimo cuadráticas. MER: Medias en la escala real. (e): Error estándar. Dilución: Parámetros tomados tras diluir y empajular las dosis seminales. Refrigeración: Parámetros tomados tras refrigerar las dosis seminales. Incubación: Parámetros tomados tras 18 horas de periodo de cultivo en medio FIV-TALP y en condiciones de FIV. PN: Pronuclear. \geq 2PN: Oocitos con 2 ó más pronúcleos.

4.3. Experimento 3: Evaluación de la respuesta de machos con diferentes fertilidades *in vitro* a diferentes concentraciones de ionomicina en un protocolo de capacitación espermática

En este experimento, se analizó el efecto del macho (macho 1 y macho 3), el efecto de la concentración de ionomicina, y la interacción entre estos dos parámetros, sobre la viabilidad espermática al capacitar los espermatozoides, tras incubarlos durante 18 horas de cocultivo y sobre el parámetro de formación pronuclear. A continuación, en la tabla 3, se presentan los valores de significancia para este experimento.

Tabla 3: Significancia estadística de los modelos para los parámetros analizados en el experimento 3

Parámetro analizado	Factor				Interacción	
	Macho		Concentración de Ionomicina		Macho x [Ionomicina]	
	P		P		P	
Viabilidad - Capacitación	0,0138	*	0,698	NS	0,0986	NS
Viabilidad - Incubación	0,1758	NS	0,6530	NS	0,9698	NS
Formación Pronuclear	0,0001	**	0,0297	*	0,9989	NS

* ($P < 0,05$). ** ($P < 0,01$). NS: No significativo

Antes de estudiar el efecto de la concentración de ionomicina se volvieron a analizar los parámetros seminales de los machos 1 y 3 considerados de baja y alta calidad *in vitro* respectivamente. A pesar de

que la calidad del semen de estos machos era similar tras la dilución, se encontraron diferencias significativas entre las dosis refrigeradas de estos machos, presentando el macho 3 mayor calidad espermática que el macho 1 (motilidad total 79,5% vs. 61%; motilidad progresiva 55,7% vs. 32,0%; y viabilidad espermática 77,9% vs. 49,0%; $P < 0,05$). Los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Estimaciones (MMC) de las tasas de motilidad y viabilidad (MMC) observada en machos de alta y baja fertilidad *in vitro* durante el procesamiento del eyaculado previo a la fecundación *in vitro* heteróloga.

Macho	Dilución			Refrigeración		
	% Motilidad Progresiva (e)	% Motilidad (e)	% Viabilidad (e)	% Motilidad Progresiva (e)	% Motilidad (e)	% Viabilidad (e)
M1	56,2 (8,6)	77,5 (2,1)	71,3 (5,2)	32,0 ^a (7,7)	61,0 ^a (4,2)	49,0 ^a (4,0)
M3	41,3 (9,9)	86,0 (2,4)	81,8 (4,9)	55,7 ^b (7,7)	79,5 ^b (4,2)	77,9 ^b (4,0)

^{a,b}: Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes ($P < 0,05$)

MMC: Medias mínimo cuadráticas. M1: Macho 1. M3: Macho 3. (e): Error estándar. Dilución: Parámetros tomados tras diluir y empajuelar las dosis seminales. Refrigeración: Parámetros tomados luego de refrigerar las dosis seminales.

En la tabla 5, se presentan las estimaciones del efecto del macho, del tratamiento de capacitación y de interacción entre estas dos variables. En el tratamiento de capacitación e inducción de reacción acrosómica con ionomicina se observan diferencias significativas entre machos, presentando el macho 3 un mayor porcentaje de espermatozoides viables tras la capacitación, que el macho 1 (33,7% vs. 19,5% respectivamente $P < 0,05$). Por otra parte, los resultados de viabilidad fueron similares para todas las concentraciones de ionomicina utilizadas y no se observaron diferencias significativas en los parámetros estudiados tras la incubación.

Las estimaciones de los resultados correspondientes a los efectos e interacciones estudiadas en este experimento sobre el parámetro de formación pronuclear también se encuentran en la tabla 5. Se observaron diferencias significativas entre machos, presentando el macho 3 mayores tasas de formación pronuclear que el macho 1 (30,9% vs. 3,9% $P < 0,05$). Además, la concentración de 400 nM de ionomicina presentó los resultados más elevados de formación pronuclear (23,3% vs. 7,7-8,8% $P < 0,05$).

Tabla 5: Estimaciones (MMC) del efecto del macho, de la concentración de ionomicina (parte superior) y de la interacción macho x concentración de ionomicina (parte inferior), sobre los parámetros de viabilidad espermática durante la capacitación espermática, tras la incubación y sobre el parámetro de formación pronuclear (MER) (Fecundación heteróloga).

Macho	Ionomicina [] nM	Capacitación	Incubación	Número de oocitos inseminados	% Oocitos ≥ 2 PN (e)
		% Viabilidad (e)	% Viabilidad (e)		
M1		19,5 ^a (7,6)	20,2 (3,1)	159	3,9 ^a (3,5)
M3		33,7 ^b (7,6)	26,6 (3,1)	151	30,9 ^b (19,0)
	100	23,6 (8,1)	21,7 (5,5)	101	7,7 ^a (6,6)
	200	27,5 (8,1)	22,1 (5,5)	105	8,8 ^a (7,4)
	400	28,7 (8,1)	26,4 (5,5)	104	23,3 ^b (16,0)
	100	24,6 (9,0)	19,0 (4,2)	54	2,5 (2,7)
M1	200	18,5 (9,0)	18,1 (4,2)	54	2,8 (3,1)
	400	15,6 (9,0)	23,5 (4,2)	51	8,4 (7,4)
	100	22,7 (9,0)	24,5 (4,2)	47	21,5 (16,0)
M3	200	36,5 (9,0)	26,1 (4,2)	51	24,4 (17,0)
	400	41,8 (9,0)	29,3 (4,2)	53	50,5 (23,0)

^{a,b}: Valores con distintos superíndices indican diferencias entre machos. (P<0,05)

^{a,b}: Valores con distintos superíndices indican diferencias entre concentraciones de ionomicina (P<0,05)

MMC: Medias mínimo cuadráticas. MER: Medias en escala real. M1: Macho 1. M3: Macho 3. [] Ion: Concentración de ionomicina expresada en nM. (e): Error estándar. Capacitación: parámetros tomados luego de la capacitación espermática con heparina y ionomicina. Incubación: Parámetros tomados tras 18 horas de periodo de cultivo en medio FIV-TALP y en condiciones de FIV. ≥ 2PN: Oocitos con 2 ó más pronúcleos.

4.4. Experimento 4: Efecto del lavado del plasma seminal en los dos machos de mayor y menor fertilidad *in vitro*, sobre parámetros de calidad espermática y capacidad fecundante en FIV heteróloga

De igual manera que en el experimento anterior, en la tabla 6, se describen las variables analizadas y los valores de significancia para este experimento. Los efectos analizados fueron el efecto del macho, el efecto del lavado del plasma seminal, y la interacción entre estos dos parámetros, sobre los parámetros de motilidad, viabilidad espermática y formación pronuclear, al momento de la dilución del eyaculado, de la refrigeración de las dosis, de la capacitación espermática, y de la incubación tras 18 horas de cocultivo.

Tabla 6: Significancia estadística de los modelos para los parámetros analizados en el experimento 4

Parámetro analizado	Factor				Interacción	
	Macho		Lavado		Macho x lavado.	
	P		P		P	
Motilidad Progresiva - Dilución	0,0007	**	0,7838	NS	0,5593	NS
Motilidad -Dilución	0,0001	**	0,0531	NS	0,0386	*
Viabilidad - Dilución	0,0001	**	0,0215	*	0,9148	NS
Motilidad progresiva - Refrigeración	0,0007	**	0,0045	**	0,1619	NS
Motilidad - Refrigeración	0,0002	**	0,0072	**	0,2063	NS
Viabilidad - Refrigeración	0,0001	**	0,0259	*	0,6986	NS
Viabilidad - Capacitación	0,2459	NS	0,2488	NS	0,7645	NS
Viabilidad - Incubación	0,3332	NS	0,8321	NS	0,7691	NS
Formación pronuclear	0,0384	*	0,0069	**	0,0917	NS

*(P<0,05). **(P<0,01). NS: No significativo

Los resultados del efecto del macho, del lavado del plasma seminal y de la interacción entre estos efectos se presentan en la tabla 7. Se observaron diferencias significativas entre el macho de mayor y el de menor fertilidad *in vitro* (macho 3 y macho 1), presentando el macho 3, mayores tasas en la motilidad progresiva y motilidad total, al momento de diluir el eyaculado (66,7 vs. 50,3% P<0,05) (83,2% vs. 69,1% P<0,05) respectivamente, y al momento de refrigerar las dosis (58,2% vs. 36,7% P<0,05) (77,2% vs. 49,1% P<0,05) respectivamente. De igual manera, el macho 3 presentó mejores tasas de viabilidad espermática que el macho 1, tras la dilución el eyaculado (69,8% vs. 45,6% P<0,05), y tras la refrigeración de las dosis (64,4% vs. 31,8% P<0,05). Sin embargo, no se observaron diferencias en la viabilidad espermática tras la capacitación y la incubación.

Por otra parte, se observó un efecto beneficioso del lavado del plasma seminal sobre la viabilidad espermática al momento de diluir el eyaculado (61,7% vs. 53,7% P<0,05), y tras la refrigeración de las dosis sobre la motilidad progresiva (55,3% vs. 39,6% P<0,05) y la viabilidad espermática (53,7% vs. 42,5% P<0,05).

Además, se observó interacción entre el lavado del plasma seminal y el macho en el parámetro de motilidad tras la dilución, ya que el macho 1 presentó mejor motilidad tras el lavado (74,0% vs. 64,2% P<0,05), mientras que en el macho 3 la motilidad tras la dilución fue similar para el semen lavado y no lavado (83,0% vs. 83,5% P<0,05).

Tabla 7: Estimaciones (MMC) del efecto del macho, plasma seminal y de la interacción macho x plasma seminal sobre las tasas de motilidad y viabilidad seminal previa y posterior al proceso de fecundación *in vitro* heteróloga.

Macho - Plasma Seminal	Dilución			Refrigeración			Capacitación	Incubación	
	% Motilidad Progresiva (e)	% Motilidad (e)	% Viabilidad (e)	% Motilidad progresiva(e)	% Motilidad(e)	% Viabilidad (e)	% Viabilidad (e)	% Viabilidad (e)	
M1	50,3 ^a (2,9)	69,1 ^a (2,8)	45,6 ^a (4,7)	36,7 ^a (2,7)	49,1 ^a (2,8)	31,8 ^a (5,6)	39,8(6,0)	25,2(3,5)	
M3	66,7 ^b (2,6)	83,2 ^b (2,7)	69,8 ^b (4,5)	58,2 ^b (2,7)	77,2 ^b (2,8)	64,4 ^b (5,4)	47,5(5,4)	21,8(3,5)	
L	58,4 (2,7)	78,5 (2,8)	61,7 ^b (4,6)	55,3 ^b (4,5)	71,2 ^b (3,7)	53,7 ^b (5,5)	39,5(5,7)	23,9(3,5)	
NL	57,5 (2,7)	73,8 (2,8)	53,7 ^a (4,6)	39,6 ^a (4,5)	55,1 ^a (3,7)	42,5 ^a (5,5)	47,3(5,7)	23,1(3,5)	
M1	L	51,7 (3,7)	74,0 ^{aβ} (3,5)	49,4 (5,2)	47,8 (5,6)	60,4(5,3)	36,5 (6,5)	34,4(7,7)	25,0(4,2)
M1	NL	48,9 (3,7)	64,2 ^a (3,5)	41,8 (5,2)	25,6 (5,6)	37,9(5,3)	27,0 (6,5)	44,3(7,7)	25,5(4,2)
M3	L	65,2 (3,3)	83,0 ^b (3,1)	73,9 (4,9)	62,8 (5,1)	82,0(4,7)	70,8 (6,1)	44,6(6,8)	22,7 (4,2)
M3	NL	66,2 (3,3)	83,5 ^b (3,1)	65,6 (4,9)	53,6 (5,1)	72,4 (4,7)	57,9 (6,1)	50,5(6,8)	21,0(4,2)

^{a,b}: Valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son diferentes (P<0.05)

^{α,β}: Valores con distintos superíndices indican diferencias entre concentraciones de ionomicina (P<0,05)

MMC: Medias mínimo cuadráticas. (e): Error estándar. M1: Macho 1. M3: Macho 3. L: Lavado el plasma seminal; NL: No lavado el plasma seminal; Dilución: Parámetros tomados luego de diluir y empajular las dosis seminales. Refrigeración: Parámetros tomados luego de refrigerar las dosis seminales. Capacitación: parámetros tomados luego de la capacitación espermática con heparina y ionomicina Incubación: Parámetros tomados tras 18 horas de periodo de cultivo en medio FIV-TALP y en condiciones de FIV.

En la tabla 8, se presentan las estimaciones de los resultados el efecto del

macho y del plasma seminal sobre el parámetro de formación pronuclear. Se encontraron diferencias significativas entre machos, presentando el macho 3 mejores tasas de formación pronuclear y que el macho 1 (63,5% vs. 50,8%). De igual manera, se observó que el lavado del plasma seminal tiene un efecto positivo sobre la formación pronuclear (65,7% vs. 48,4%). Finalmente, se observó que el macho 1 con el plasma seminal presenta menores tasas de formación pronuclear que el resto de grupos (37,3% vs. 64,2-67,1-59,7%). Por lo tanto, la eliminación del plasma seminal fue beneficiosa para el macho 1 mientras que en el macho 3 la tasa de formación pronuclear fue independiente del lavado del plasma seminal.

Tabla 8: Estimaciones (MER) del efecto macho, plasma seminal (parte superior) y de la interacción entre macho x plasma seminal (parte inferior) sobre las tasas de fecundación heteróloga (formación pronuclear) en machos de alta y baja fertilidad con y sin plasma seminal.

Macho	Plasma seminal	Número de oocitos inseminados	% Oocitos \geq 2 PN (e)
M1		196	50,8 ^a (8,8)
M3		241	63,5 ^b (7,8)
	Lavado	226	65,7 ^β (7,7)
	No Lavado	211	48,4 ^α (8,6)
M1	Lavado	96	64,2 ^γ (8,9)
	No lavado	100	37,3 ^x (8,9)
M3	Lavado	130	67,1 ^γ (8,0)
	No Lavado	111	59,7 ^γ (8,9)

^{a,b}: Valores con distintos superíndices indican diferencia entre machos ($P < 0,05$)

^{α,β}: Valores con distintos superíndices indican entre el efecto del lavado del plasma seminal ($P < 0,05$)

^{x,y}: Valores con distintos superíndices indican diferencia entre interacción macho x lavado plasma seminal ($P < 0,05$)

MER: Medias en escala real. M1: Macho 1. M3: Macho 3. (e): Error estándar. \geq 2PN: Oocitos con 2 ó más pronúcleos.

5. Discusión

La evaluación de la fertilidad del macho gana importancia en los sistemas intensivos de producción debido a que en este tipo de explotación siempre se buscan índices de fertilidad altos entre los animales. De igual manera, en los programas de mejora genética la evaluación de la fertilidad es importante, gracias a que permite la previa eliminación de machos subfértiles antes de su utilización en campo, al priorizar el papel esencial del macho dentro de los esquemas de inseminación, como herramienta de difusión o de testaje de las características genéticas deseadas.

Por otro lado, la evaluación previa de la capacidad fecundante del macho es muy importante para conocer la fertilidad de un macho, además de considerarse una herramienta útil para el estudio de la eficacia de distintos procedimientos de conservación de semen. La evaluación de la fertilidad más contundente, es una prueba de fertilidad *in vivo*. Sin embargo, estas pruebas presentan un elevado costo temporal y económico.

Entre los análisis *in vitro* de la calidad de los espermatozoides, se destacan la evaluación de la motilidad y la viabilidad espermática. De igual manera, se han desarrollado pruebas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides mediante técnicas de fecundación *in vitro*. Este tipo de pruebas permiten analizar algunos procesos fisiológicos que ocurren en el espermatozoide en momentos previos a la fecundación. Estas pruebas aportan un criterio adicional a las pruebas de calidad espermática mediante las cuales se pueden detectar machos con baja fertilidad o subfertilidad, sin necesidad de las pruebas de campo antes mencionadas. Estas técnicas de fecundación *in vitro* se pueden desarrollar de forma heteróloga en especies donde no es factible la obtención de gametos femeninos de manera regular, como por ejemplo el caprino, especie en la que no se sacrifican muchos animales, y los que se sacrifican suelen ser animales muy jóvenes (alrededor de un mes de vida) (Ruiz de Huidobro y cols., 1998), con la consiguiente dificultad que esto supone.

Por lo tanto, el primer experimento consistió en estudiar la eficiencia de tres sistemas diferentes de fecundación *in vitro* heteróloga en donde variaba la presencia o no, de las células del *cumulus* (CC), de la zona pelúcida (ZP) y del tratamiento de capacitación espermática, evaluándose mediante el parámetro de formación pronuclear. Bajo nuestras condiciones de trabajo, sólo observamos tasas de fecundación elevadas al utilizar oocitos libres tanto de la ZP como del *cumulus* (78,3%), mientras que la presencia de ZP o CC no permitieron prácticamente la fecundación heteróloga (tasas de fecundación menores del 1,5%). Estas diferencias podrían deberse no sólo a la presencia de la ZP, sino también al tratamiento de capacitación del procedimiento A en el que se incluyó ionomicina,

además de la heparina. La razón fue que la ionomicina (un tipo de ionóforo de calcio) es utilizado para provocar la reacción acrosómica (Pereira y cols., 2000), necesaria para fecundar a los oocitos sin la ZP. No obstante, el ionóforo de calcio también ha sido también incluido en protocolos de fecundación *in vitro* en caprino para fecundar oocitos con ZP (Urdaneta y cols., 2004). En este sentido, realizamos una experiencia independiente con tres réplicas (n=44) cuyos datos no hemos adjuntado en resultados, evaluando la capacidad fecundante de estos espermatozoides tratados con heparina y ionomicina con oocitos con ZP, y no se obtuvieron oocitos con dos ó más pronúcleos. Estos bajos porcentajes de fecundación en oocitos heterólogos con ZP son esperables si se tiene en cuenta que la penetración de la ZP se considera como específica de especie (Sinowatz y cols., 2003)

No obstante, nuestros resultados difieren de los obtenidos en trabajos previos, en donde Slavick y Fulka (1992), lograron tasas de penetración (formación pronuclear) más elevadas (19,3- 50,9%) de espermatozoides de caprino en oocitos de bovino con zona pelúcida (intactos) en el lavado (realizan un "Swim up" durante 15 min, luego efectúan un lavado mediante centrifugación durante 10 minutos, y finalmente realizan de nuevo un "Swim Up" durante 150 a 240 minutos) y en suplemento con del medio de cocultivo (50 u.i/mL de heparina). De igual manera, Cox y cols., (1994), también observaron tasas de penetración más elevadas (6-98%) de los espermatozoides de caprino en oocitos de bovino intactos y concluyeron que la zona pelúcida no constituye barrera alguna para la penetración heteróloga por espermatozoides de caprino en condiciones *in vitro*. No obstante, también existen diferencias al comparar los protocolos, tanto en la raza, la capacitación del eyaculado fresco (durante 4 horas a temperatura ambiente 20°C) previo a la fecundación, en el suplemento del medio de cocultivo (2,5 µg/mL con de heparina y suero de oveja en estro), y finalmente en la valoración de la penetración espermática tras 24 a 48 horas de cocultivo.

Por otra parte, no existen reportes de test de penetración heteróloga desarrollados en oocitos bovinos sin zona pelúcida en la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides de caprino. Landim - Alvarenga y colaboradores, (2001), utilizaron oocitos bovinos libres de zona pelúcida para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides de equino y bovino capacitados con líquido folicular, dilauroilfosfatidilcolina (PC12) o ionóforo de calcio A23187. En este trabajo combinaron estas sustancias capacitantes, en donde obtuvieron tasas de penetración para espermatozoides de equino entre el 0% y 26% en función del tratamiento. Estos resultados validan el uso de oocitos bovinos sin zona pelúcida para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides de especies heterólogas.

No obstante, la capacidad fecundante de espermatozoides caprinos sí ha sido evaluada en oocitos de hámster sin zona pelúcida (zona free hámster egg, ZFHE) con resultados similares a los nuestros. Como ejemplos; Kim y cols., (1980), obtuvieron tasas de penetración entre 0 y 54%, de manera similar a Berger y cols., (1989), quienes obtuvieron tasas de penetración entre el 2% y el 98%. De igual manera, Kusonoki y cols., (1989) y Harayama y cols., (1993), evaluaron la inducción de la reacción acrosómica, encontrando tasas bajas y medias de penetración.

En el segundo experimento, se estudió el efecto del macho en los parámetros de motilidad y viabilidad espermática previo a la fecundación *in vitro* heteróloga y su eficiencia en la formación pronuclear, usando el procedimiento más eficiente en el experimento anterior. En consecuencia, en este experimento se encontraron diferencias entre machos en los parámetros de calidad seminal tras la dilución del eyaculado, tras la refrigeración y en las tasas de penetración espermática.

Entre los principales factores que pueden incidir en la calidad seminal del macho cabrío, se encuentran la edad, la estación, la raza y algunas patologías. Se puede disminuir la importancia de los factores como estación, raza y causas patológicas (Cortes, 1997), debido a que los machos pertenecían a la misma raza, y la recolección del eyaculado se efectuó durante la misma estación, y además, estaban clínicamente sanos.

De igual manera, se puede atribuir la variabilidad entre machos durante la refrigeración del eyaculado, a lo propuesto por Barbas y Mascarenhas, en 2009, quienes mencionan que los rangos de descenso de temperatura lentos (menores de 1°C/ min.) causan estrés y éstos a su vez cambios en las membranas celulares, cambios asociados a la bicapa lipídica y a alteraciones funcionales del estado de las membranas. De igual forma, este descenso lento de temperatura pudo permitir que existiera durante más tiempo actividad enzimática en la dilución del eyaculado.

Además, existen algunos trabajos que relacionan la diferencia de fertilidad entre machos tanto en las evaluaciones *in vitro*, en bovino (Henault y cols., 1994, 1995; Kathiravan y cols., 2008) como en las *in vivo*, en ovino (Choudhry y cols., 1995; García - Álvarez y cols., 2008) en equino (Wilhelm y cols., 1996) y en porcino (Selles y cols., 2003).

Otro factor a tener en cuenta para explicar la variación encontrada entre machos tras la refrigeración de las dosis, es la presencia en el plasma seminal de la enzima BUSgp60, la cantidad y actividad de esta enzima en el plasma, influye sobre la viabilidad seminal, debido a su reacción con la leche desnatada (diluyente) a temperaturas fisiológicas, siendo causal de efectos tóxicos para el espermatozoide (Pellicer y cols., 1998). Se discutirá más adelante sobre esta enzima en el cuarto experimento al hablar del efecto del plasma seminal sobre los parámetros estudiados. Este factor

también puede explicar la variabilidad de parámetros entre los machos al diluir el eyaculado, debido a que el tiempo transcurrido entre la dilución y la toma de los parámetros por el sistema CASA, fue de 30 minutos aproximados, tiempo durante el cual el eyaculado estuvo a temperatura ambiente 22 - 25 °C, tiempo y temperatura que se pueden considerar adecuados para que haya actividad enzimática.

En el tercer experimento, se estudió la respuesta de los dos machos de mayor y menor fertilidad, a diferentes concentraciones de ionomicina en un protocolo de capacitación espermática. En este experimento, se encontraron diferencias entre la viabilidad espermática de los machos inmediatamente tras el tratamiento de capacitación e inducción de reacción acrosómica con ionomicina y en las tasas de penetración espermática. De forma general, la concentración de 400 nM de ionomicina presentó los resultados más elevados de formación pronuclear. Se puede deducir que la concentración de 200 nM de ionomicina que se utiliza en los protocolos de fecundación *in vitro* en caprino con oocitos intactos (Urdaneta y cols., 2004), bajo nuestras condiciones sea insuficiente para provocar la reacción acrosómica en la mayoría de los espermatozoides. La ionomicina es un inductor de la reacción acrosómica mediante el transporte de iones a través de las membranas celulares (Turner, 1988), que provoca un aumento del calcio intracelular y desencadena la reacción acrosómica en el espermatozoide (Breitbart y cols., 2005) de caprino (Pereira y cols., 2000). Aunque trabajos sobre el efecto de la concentración de ionomicina con la capacidad fecundante del espermatozoide en caprino no se conocen aún, sí existen trabajos que evidencian el efecto del ionóforo de calcio como inductor de la reacción acrosómica. Bou y Hanada (1985) obtuvieron resultados en oocitos de hámster sin zona pelúcida gracias a la capacitación de los espermatozoides mediante ionóforo de calcio y cafeína.

Es importante resaltar que no se encontró diferencia en la respuesta de cada uno de los machos a las concentraciones de ionomicina utilizadas, caso diferente al encontrado con otros agentes capacitantes como la heparina. En este sentido, en bovino, Marquant-Le Guienne y cols., en 1990, observaron que las tasas de fecundación en un sistema de penetración *in vitro* heterólogo pueden estar influenciadas por el macho, por la concentración de heparina y por su interacción. De igual manera, Cox y cols., en 1994, evaluaron la capacidad de la heparina como agente capacitante de espermatozoides caprinos encontrando patrones comparables entre machos. Adicionalmente, Jiménez Macedo y cols., (2006), observaron que un tratamiento a base heparina más ionomicina mejora las tasas de fecundación *in vitro* en oocitos procedentes de cabras adultas y jóvenes. Sin embargo, no existen estudios que relacionan diferentes concentraciones de ionomicina con parámetros de fertilidad *in vitro*.

Por otra parte, otra posible causa de diferencias entre machos al momento de la capacitación puede ser la respuesta individual de cada macho al tratamiento con heparina más ionomicina, o a que durante

el método de selección espermática "Swim Up" se puedan recoger diferentes concentraciones de espermatozoides desconocidas, las cuales van a una cantidad definida de medio con una concentración definida de sustancias capacitantes, en donde pueden presentarse algunas variaciones en el número de espermatozoides/volumen de medio capacitante.

En el último experimento, los resultados obtenidos evidencian, en general, un efecto beneficioso del lavado del plasma seminal sobre los parámetros de motilidad, viabilidad espermática y formación pronuclear. Esto puede ser debido a que el plasma seminal caprino se considera un medio poco adecuado para mantener la viabilidad espermática tras la eyaculación (Corteel, 1980; Pellicer y cols., 1997). De igual manera, se conoce que la eliminación del plasma seminal mediante el lavado de los espermatozoides incrementa el porcentaje de células viables y su motilidad durante su almacenamiento en diluyentes como la leche desnatada (Leboeuf y cols., 2000).

Respecto al efecto del plasma seminal en el semen fresco o refrigerado hay cierta controversia. Si bien la mayoría de autores recomiendan el lavado de los espermatozoides, otros no encuentran diferencias dependiendo del medio utilizado. Delgadillo, en 2005, sugiere que la fertilidad del semen no lavado y diluido con leche descremada se mantiene de forma adecuada tras 12 a 24 horas de conservación. Sin embargo, Salvador y cols., (2006) observaron que la motilidad y la integridad de membrana de espermatozoides de machos cabríos de la raza Murciano-Granadina, se vio afectada por la presencia del plasma seminal en el semen conservado en medio base de leche durante 24 horas a 4°C.

En nuestro caso, el periodo de conservación de los espermatozoides fue muy corto ya que el tiempo transcurrido entre la dilución y la toma de los datos por el sistema CASA, fue de 30 minutos aproximados, tiempo durante el cual el eyaculado estuvo a temperatura ambiente 22 - 25 °C, tiempo y temperatura que se puede considerar adecuado para que haya actividad enzimática. Además, el proceso entero hasta el tratamiento de selección de los espermatozoides mediante la técnica de "Swim-Up" fue de 2-3 horas aproximadamente. De esta manera, es sorprendente el efecto negativo del plasma seminal en un periodo de tiempo tan corto.

El efecto negativo de la presencia plasma seminal sobre la viabilidad espermática, se debe a la presencia de las secreciones de las glándulas bulbouretrales (BUS) (Corteel y cols, 1980). En estas secreciones se encuentran enzimas del tipo de las lipasas pancreáticas, específicamente una lipasa glicoproteína, denominada BUSgp60. Esta enzima reacciona a la adición de leche descremada al eyaculado y está relacionada con disminución, y deterioro en la motilidad espermática, además, de la ruptura de acrosomas y la muerte del espermatozoide. El mecanismo de acción de la Busgp60 sobre diluyentes como la leche desnatada se considera indirecto, al desencadenar la hidrólisis de triglicéridos

residuales presentes en la leche, y estos consecuentemente liberan ácidos grasos *cis* - insaturados como el ácido oleico, el cual se considera tóxico para el espermatozoide de caprino (Pellicer y cols, 1998).

Mediante este trabajo se logró estandarizar un protocolo para el desarrollo de fecundación *in vitro* heteróloga entre oocitos bovinos sin zona pelúcida provenientes de animales de sacrificio y espermatozoides de machos cabríos de la raza Murciano Granadina. Esto con el fin de en un futuro poder evaluar la capacidad fecundante de dichos machos de manera más frecuente, y así poder contar una nueva herramienta que permita la detección de machos con bajos perfiles reproductivos antes de ser incluidos en un programa de inseminación artificial. De igual forma, se sugiere el lavado del plasma seminal del eyaculado de caprino previo a la dilución en leche del eyaculado, ya que este influye de manera negativa al momento de la preparación de las dosis.

6. Conclusiones

1. Bajo nuestras condiciones de trabajo, la fecundación heteróloga de espermatozoides de caprino en oocitos de origen bovino con zona pelúcida y células del *cumulus* presenta unas tasas de fecundación casi nulas. Por otra parte, sí se logró la fecundación de oocitos libres de zona pelúcida por espermatozoides previamente capacitados con heparina y ionomicina.
2. Existe variabilidad en la calidad del semen y la fertilidad *in vitro* entre machos de raza la Murciano Granadina, cuando son diluidos en medio a base de leche descremada y al no ser eliminado el plasma seminal.
3. La concentración de ionomicina, que maximiza los porcentajes de viabilidad espermática previa a la fecundación y las tasas formación pronuclear en la especie caprina cuando se utilizan oocitos de bovino libres de zona pelúcida, es de 400 nM.
4. La eliminación del plasma seminal ejerce un efecto beneficioso sobre la calidad seminal y sobre las tasas de formación pronuclear, cuando los espermatozoides son conservados en leche descremada como diluyente. No obstante, existe variabilidad en la respuesta al tratamiento del lavado, al igual que existe variabilidad en la resistencia de los machos al proceso de refrigeración.

7. Referencias bibliográficas

- Aitken R. J. Sperm function tests and fertility. *International Journal Of Andrology*. 2006; 29: 69–75.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Review. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:49–62
- Braundmeier AG, Demers JM, Shanks RD, Saacke RG, Miller DJ. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J Androl*. 2002 Sep-Oct; 23(5):645-5.
- Bacinoglu S, Taş M, Cirit U, Ozdaş OB, Ak K. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Anim Reprod Sci*. 2008 Feb 1; 104(1): 38-46.
- Berger T. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology* 1989 Jul; 32(1): 69-77.
- Berger T, Parker K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res*. 1989 Apr; 22(4): 385-97.
- Bousquet D, Brackett BG. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*. 1982 Feb; 17(2): 199-213.
- Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod*. 1997 Sep; 2(3): 165-74.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*. 2005 Mar; 129(3): 263-8.
- Bergqvist AS, Ballester J, Johannisson A, Hernandez M, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* 2006; 14: 259-273.
- Choudhry TM, Berger T, Dally M. In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. *Theriogenology*. 1995 May; 43(7): 1195-200
- Collins ED, Flowers WL, Shanks RD, Miller DJ. Porcine sperm zona binding ability as an indicator of fertility. *Anim Reprod Sci*. 2008 Feb 1; 104(1): 69-82
- Corteel J. M. Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro *Reprod Nutr Dev*. 1980; 20 (4): 1111-1123
- Cortes Gallego S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen de caprino. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1997.
- Cox JF, Ávila F, S María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology*. 1994; 41: 1621-1629.
- Cox JF, Saravia F, Briones M, María AS. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 1995; 44(3): 451-460.
- Cox J.F, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*. 2006; 66: 860–867.
- Cox JF, Alfaro V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod Domestic Anim*. 2007; 42(1): 83-87.

- Crozet N. Chapter 17. Fertilization *in vivo* and *in vitro*. Reproduction in mammals and man. Charles Thibault. Ellipses. 1993.
- Delgadillo.JA. Inseminación Artificial en Caprinos. Ed Trillas S.A. Mexico D.F.
- Fazeli AR, Zhang BR, Steenweg W, Larsson B, Bevers MM, van den Broek J, Rodriguez-Martinez H, Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 1995; 43(2): 473-85
- Gadea J. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión). *Inv agr: Pord. San Anim. Vol 16 (1) 2001*.
- Gadea J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility *Theriogenology*. 2005; 63: 431–444.
- Gañan N, Sestelo A, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Sánchez I, Pérez-Aspa MJ, López-Bao JV, Palomares F, Gomendio M, Roldan E. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction*. 2009 Sep 7. [Epub ahead of print].
- García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Estes MC, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 2009; 71(4): 643-650.
- Gillan Lindsay, Evans Gareth, Maxwell W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenology*. 2005; 63: 445–457.
- Gordon I. Laboratory production of Cattle Embryos. Second Edition. CABI. Publishing 2003.
- Greve T, Madison V. *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev*. 1991; 31(2): 147-157.
- Hafez, E. S. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5 edición. México, D.F. Interamericana, 1989.
- Harper KM, Brackett BG. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod*. 1993; 48(2): 409-416.
- Henault MA, Killian GJ. Effects of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*. 1995; 43(4): 739-749
- Henault MA, Killian GJ. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil*. 1996; 108(2): 199-204.
- Izquierdo i Tugas, M.D. Cultivo de embriones producidos *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma De Barcelona. 1996.
- Ivanova M, Mollova M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*. 1993; 40(2): 397-410.
- Jeyendran R, Van Der Ven, Perez – Pelaez, Crabo B G and Zaneveld Ldj. Development of an assay to asses functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristic. *J reprod Fert* 1984; 70: 219 – 228.
- Jiménez-Macedo AR, Anguita B, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology*. 2006; 66(5): 1065-1072.

- Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science* 2008; 104: 9–17.
- Kouba AJ, Atkinson MW, Gandolf AR, Roth TL. Species-specific sperm-egg interaction affects the utility of a heterologous bovine *in vitro* fertilization system for evaluating antelope sperm. *Biol Reprod.* 2001; 65(4): 1246-1251.
- Kusunoki H, Sakaue, Kato S, Kanda S. Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium. *J Exp Zool.* 1989; 249(3): 322-328.
- Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, Seidel GE Jr, Squires EL, Graham JK. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. *Theriogenology.* 2001; 56(5): 937-953.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61: 327-36
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 113–141
- Liu DY, Garrett C, Baker HW. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in *in vitro* fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril.* 2004; 82(5): 1251-63.
- Marquant-Le Guienne P Humblot M Thibier C Thibault Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization. *Repr Nutr Dev* 1990; 30: 259 – 266.
- Mocé E, Graham J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 2008; 105: 104–118.
- Morrell JM. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim.* 2006; 41(1): 63-67.
- Oh Shin-Ae, Young Ah You, Yoo Jin Park, and Mung-Geol Pang. The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. *International Journal of Andrology* 2009.
- Palma G.A. *Biología De La Reproducción.* Instituto nacional de tecnología agropecuaria Ediciones Machala. 2001. Argentina.
- Palomo MJ, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes *Theriogenology.* 1999; 51(5): 927-40.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology.* 1999; 51(2): 461-72.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988; 38(5): 1171-80.
- Pellicer-Rubio M T, Magallon T, Combarrous Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod* 1997; 57: 1023-1031.
- Pellicer-Rubio M-T. and Combarrous Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of reproduction and fertility* 1998; 11: 95-103.

- Pereira RJ, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa *Theriogenology*. 2000; 54(2): 185-92.
- Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 2006; 37: 597–612.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod*. 2004; 71(2): 522-7.
- Rodríguez - Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim* 2003; 38: 312–318.
- Rodríguez - Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña F.J. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2008; 70: 1242–1250.
- Ruiz de Huidobro, López S, Cantero M. Características instrumentales y sensoriales de la carne de corderos lechales de raza talaverana. *Invest. Agr: Prod. Sanid. Anim*. Vol. 13 (1, 2 y 3) 1998.
- Salvador I, Yániz J, Viudes-de-Castro MP, Gómez EA, Silvestre MA. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 degrees. *Theriogenology*. 2006; 66(4): 974-81.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim*. 2003; 38(1): 66-72.
- Silva P.F.N, Gadella B.M, Detection of damage in mammalian sperm cells *Theriogenology*. 2006; 65: 958–978.
- Slavík T, Pavlok A, Fulka J. Penetration of intact bovine ova with ram sperm in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1990; 25(4): 345-7.
- Slavík T and Fulka J. *In vitro* fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 38: 721-726.
- Sinowatz F, Wessa E, Neumuller C, and Palma G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Rep Dom Anim* 2003; 38: 141-146.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod*. 2003; 68(1): 1-9
- Taş M, Bacinoglu S, Cirit U, Ozgümüş S, Kaşgöz H, Pabuccuoğlu S. Estimation of the potential fertility based upon non-return rates of bulls: using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Anim Reprod Sci*. 2008; 104(1): 38-46.
- Taş M, Bacinoglu S, Cirit U, Ozdaş OB, Ak K. Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws. *Anim Reprod Sci*. 2007; 101(1-2): 18-27
- Tomás C. Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Universidad Politécnica de Valencia. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. 2007.
- Turner P. Recent observations on drugs and human fertility. *Postgraduate Medical Journal* 1988; 64: 578-580.
- Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio MT, Izquierdo D. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 2004; 12(4): 277-84.
- Visconti PE, Kopf GS. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biol Reprod*. 1998; 59(1): 1-6.

- Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers B. J. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1976; 15: 471-476.
- Yanagimachi R. Fertilization in mammals. *Tokai J Exp Clin Med.* 1984; 9(2): 81-5.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, and Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57: 149-179.
- Wang C, Leung A, Tsoi WL, Leung J, Ng V, Lee KF, Chan SY. Evaluation of human sperm hyperactivated motility and its relationship with the zona-free hamster oocyte sperm penetration assay. *J Androl.* 1991; 12(4): 253-7.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(2): 59-64.
- Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology.* 2005; 63(2): 470-84.
- Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology.* 1996; 46(4): 559-78
- Williams CHA. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod* 2002; 8: 313-321.
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MA, Brackett BG. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod.* 1991; 44(6): 1177-82.
- Zhao XM, Songa XX, Kawai Y, Niwa K . Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology.* 2002; 58(5): 995-1006.