



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

"PORCENTAJE DE UBIQUITINACIÓN ESPERMÁTICA Y CAPACIDAD  
FERTILIZANTE EN SEMEN DESCONGELADO DE BOVINO"

T E S I S

(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

MVZ. ILIANA RODRÍGUEZ LOZANO

TUTORA: DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

ASESORES: DR. ALEJANDRO ÁVALOS RODRÍGUEZ

DR. FERNANDO BORDERAS TORDESILLAS

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2011

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia (PNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y en el Laboratorio de Embriología Experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Este proyecto contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Rosales Torres por todo el tiempo que dedicó a mi tesis, por su paciencia y por su empeño en enseñarme a hacer las cosas correctamente además de ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Alejandro Ávalos y al Dr. Fernando Bórdedas por su tiempo y apoyo para poder concluir este trabajo.

Al Dr. Juan Jesús Rúa Vidal por haberse comprometido con este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme confianza y amistad. A Micol, Pireni y Bety por su invaluable ayuda y por los momentos divertidos que compartimos.

A la UAM por aceptarme y permitirme crecer en sus aulas.

Al Dr. Luis Arturo García Hernández porque la primera impresión jamás se olvida y gracias a él mi primera visita a esta universidad fue más de lo que esperaba.

A la Dra. Marcela porque siempre estuvo dispuesta a contestar mis preguntas y por brindarme confianza y apoyo.

A todos mis compañeros de laboratorio, algunos por su ayuda y algunos por las risas pero a todos por su compañía.

Y al final pero más importante a Dios.

## DEDICATORIAS

A mi Mamichu porque sin ti nada sería posible, por estar detrás de mis pequeños y grandes logros, por haberme dado la mejor formación con tu ejemplo y sobre todo por tu inmenso amor y paciencia. Eres lo que más agradezco a dios haberme dado.

A mi Papá porque nunca me has dejado sola y has caminado junto a mi y sé que siempre estarás aquí.

A Salvador porque me has aconsejado, apoyado, animado, torturado y divertido; en pocas palabras has sido el mejor hermano.

A Ariadna por tu cariño, apoyo y por la confianza en que lograría alcanzar esta meta ya que sin tu ayuda el camino habría sido más difícil.

A Hansel por tu paciencia, compañía, confianza y complicidad estos quince años, pero sobre todo por tu amor.

A Alejandro por tu confianza, cariño, y a pesar de mis grandes fallas ser de mis mejores amigos.

A Claudia por tu confianza y amistad pero sobre todo por tu paciencia.

A Miky, Pili, Fiona, Juanito, Morris, Princi, Gigi, Regi, Remi, Pucó, Solin Cielo Benito Cuchi-cuchi, Chichu, Naty y Rocko por hacerme saber cuánto soy capaz de amar.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II ANTECEDENTES	7
1. Evaluación de la calidad espermática de los animales de granja	7
1.1. Consecuencias de la falta de técnicas de evaluación de sementales	17
2. Semen	20
2.1. Anatomía del espermatozoide	21
2.1.1. Membrana plasmática del espermatozoide	25
2.2. Capacitación espermática	32
2.3. Eliminación espermática	38
3. Ubiquitinación espermática	39
3.1. Sistema ubiquitina-proteosoma	42
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
IV. HIPÓTESIS	47
V. OBJETIVOS	
GENERAL	47
PARTICULARES	47
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	48
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	48
Clasificación de sementales	49
Espermograma	51
Técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina (SUTI)	52
Capacitación espermática	53
Fertilización <i>in vitro</i>	55

Análisis estadístico	57
VIII. RESULTADOS	58
IX . DISCUSIÓN	66
X . CONCLUSIONES	75
XI. BIBLIOGRAFÍA	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de hipo-osmolaridad	12
Figura 2. Ensayo TUNEL	13
Figura 3. Técnica de análisis de la estructura cromatinica del espermatozoide	14
Figura 4. Ensayo de electroforesis de células individuales	15
Figura 5. Análisis Nick Translation	16
Figura 6. Ensayo de Naranja de Acrídina	17
Figura 7. Prueba de dispersión de la cromatina	17
Figura 8. Morfología del espermatozoide	22
Figura 9. Componentes de la cabeza espermática	24
Figura 10. Componentes y disposición de estos en el flagelo del espermatozoide	25
Figura 11. Estructura de la membrana plasmática	27
Figura 12. Dominios presentes en el espermatozoide maduro	31
Figura 13. Sistema ubiquitina-proteosoma	44
Figura 14. Tinción supravital eosina-nigrosina	51
Figura 15. Técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina	53
Figura 16. Tinción con clortetraciclina	54
Figura 17. Ovocitos de bovino madurados in vitro	56
Figura 18. Embriones de bovino	57

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nombre e identificación de los sementales utilizados.	50
Cuadro 2. Composición del medio de capacitación espermática.	54
Cuadro 3. Promedios $\pm$ desviación estándar de motilidad, viabilidad y normalidad por semental y grupo al momento de descongelar la pajilla seminal.	59
Cuadro 4. Promedios $\pm$ desviación estándar de capacitación y motilidad post-capacitación por semental y grupo.	60
Cuadro 5. Promedios $\pm$ desviación estándar de espermatozoides ubiquitinados por semental y grupo al momento de descongelar la pajilla seminal y después de ser capacitados <i>in vitro</i> .	61
Cuadro 6. Promedios $\pm$ desviación estándar de fertilidad <i>in vitro</i> por semental y grupo.	62
Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables evaluadas.	63
Cuadro 8. Evaluaciones en el SCR.	63

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio de sementales para viabilidad, normalidad y motilidad al descongelar y después de capacitar.	64
Gráfica 2. Fertilización <i>in vitro</i> .	64
Gráfica 3. Ubiquitinación espermática.	65
Gráfica 4. Capacitación espermática.	65

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe una correlación entre ubiquitinación espermática y fertilidad, para lo cual se utilizaron pajillas seminales criopreservadas de toros con dos niveles distintos de fertilidad Normal (promedio) y Alta (altamente fértiles) reportada *in vivo*, a las cuales se les realizaron espermogramas, fertilización *in vitro* y se obtuvo el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados al momento de ser descongelados y después de ser capacitados *in vitro*. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en los espermogramas, porcentajes de ubiquitinación espermática entre los sementales (Normal  $42.97 \pm 3.69$  post-descongelación y  $44.67 \pm 7.59$  post-capacitación; Alta  $49.68 \pm 9.27$  post-descongelación y  $45.05 \pm 7.51$  post-capacitación) ni en los porcentajes de fertilidad *in vitro* (Normal  $29.19 \pm 5.55$  y Alta  $29.10 \pm 5.87$ ). Con estos resultados podemos concluir que no existen diferencias entre los dos grupos de sementales tal como lo afirma SEMEX Alliance por lo que sus grados de fertilidad observada *in vivo* pueden deberse a una combinación de factores ajenos a los espermatozoides; que la ubiquitinación espermática no tiene relación con los parámetros evaluados en el espermograma y no está relacionada con el grado de fertilidad por lo que la detección de espermatozoides ubiquitinados no es una técnica útil para diferenciar sementales bovinos con grados de fertilidad cercanos. Además al detectar un alto porcentaje de espermatozoides ubiquitinados podemos suponer que este proceso no tiene relación con la capacidad fertilizante, y finalmente que la degradación de proteínas que ocurre en la remodelación de la



membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación al parecer no involucra de manera importante al sistema ubiquitina-proteosoma.

Palabras clave: Ubiquitina, espermatozoide, fertilidad.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether a correlation exists between sperm ubiquitination and fertility, for which cryopreserved semen straws were used for bulls with two different fertility levels: Normal (average) and High (highly fertile) reported *in vivo*. Spermograms *in vitro* fertilization were performed, and we obtained the percentage of ubiquitinated sperm at thawing and after *in vitro* capacitation. We found no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in semen analysis, sperm ubiquitination rates between bulls (Normal  $42.97 \pm 3.69$  post-thaw and  $44.67 \pm 7.59$  post-capacitation; High  $49.68 \pm 9.27$  post-thaw and  $45.05 \pm 7.51$  post-capacitation) or *in vitro* fertility rates (Normal  $29.19 \pm 5.55$  and High  $29.10 \pm 5.87$ ). We conclude that (1) there are no differences between the two groups of bulls as claimed by SEMEX Alliance. So that their fertility levels observed *in vivo* may be due to a combination of factors other than sperm, (2) the sperm ubiquitination is not related with any of the parameters evaluated in the semen and (3) is not related to the degree of fertility so that the detection of ubiquitinated sperm is a useful technique for differentiating bovine stallions near degrees of fertility. Moreover detecting a high percentage of ubiquitinated sperm is not related to the fertilizing capacity, and finally the degradation of proteins that occurs in the remodeling of sperm plasma membrane during capacitation process does not appear to involve significantly to the ubiquitin-proteasome system.

Keywords: Ubiquitin, sperm, fertility.

## I. INTRODUCCIÓN

La fecundación en los mamíferos ocurre como consecuencia del encuentro de los gametos masculino y femenino (Johanson *et al.*, 2009), la cual ocurre después de una detallada selección natural que intenta garantizar que la estructura y función de cada uno de ellos sea la adecuada (Yin *et al.*, 1998). En la producción animal, los machos representan un componente fundamental, ya que mientras una hembra en cada ciclo estral produce un número limitado de ovocitos debido a que sufren una dramática reducción en su número (atresia) y sólo algunos logran ser ovulados (Rosales, 2008), los machos son capaces de producir millones de gametos fértiles en cada eyaculado (Bebington *et al.*, 1999). Esta característica dio pie al desarrollo de técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial, cuyo propósito es aprovechar al máximo la producción espermática de los sementales (Yildiz *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, ha sido de fundamental importancia en la implementación de la inseminación artificial desarrollar técnicas de evaluación seminal que en la medida de lo posible garanticen la capacidad fertilizante de cada dosis envasada.

Actualmente, al semen de los sementales trabajados en esta industria se le aplican exámenes macroscópicos y microscópicos, cuyos resultados según Sutovsky *et al.*, (2001a), sólo mantienen una relación moderada con la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Se ha observado que sumado a estas técnicas convencionales, evaluar la integridad y función de la membrana plasmática del espermatozoide es más eficaz (Sánchez *et al.*, 2002).

Sutovsky *et al* (2004) sugirieron que en la eyaculación de un semental, puede ocurrir la eliminación de espermatozoides defectuosos o con alteraciones no visibles al microscopio óptico, que involucra a proteínas de la membrana plasmática por un mecanismo fisiológico que marca a las proteínas alteradas con ubiquitina para su posterior eliminación, y que esto pudiera contribuir a explicar el porqué de los millones de espermatozoides producidos por un macho en cada eyaculado sólo uno logrará fecundar al ovocito y el resto morirá (Albarrán *et al.*, 2005), sin embargo no se tiene claro cuáles son los mecanismos de selección y sólo se ha sugerido que el sistema de ubiquitinación puede estar involucrado (Sutovsky *et al.*, 2001a).

Desarrollar técnicas de evaluación espermática que garanticen la capacidad fertilizante de una dosis de semen evitaría pérdidas económicas por el uso de dosis múltiples por gestación, mantener a sementales de baja calidad reproductiva en la industria de la inseminación artificial y en los hatos de reproductoras, así como disminución de los días abiertos e intervalo entre partos.

Intentando alcanzar mayor confiabilidad en cada dosis seminal las casas comercializadoras han desarrollado evaluaciones basada en datos recogidos de campo que pueden basarse en pruebas generales de producción, salud, longevidad, conformación, ubres, patas y pesuñas, etc; y evaluaciones más especializadas con gran cantidad de datos, por ejemplo: para valores genéticos de producción y gestaciones (GeneFORCE de Accelerated Genetics), genética de alta longevidad y producción (PACE de Accelgen), índices de fertilidad (Repromax de SEMEX Alliance) y producción superior en lactaciones

consecutivas (Serie Maestros de SEMEX Alliance) entre otras (ABS México, 2011; Accelgen, 2011).

## II. ANTECEDENTES

### 1. Evaluación de la calidad espermática de los animales de granja

El espermograma es el examen de diagnóstico más importante y sencillo para iniciar el estudio de la fertilidad de un macho. En él se evalúan los aspectos físicos del semen, como volumen, pH, color y olor, así como los aspectos celulares que indican número, movilidad, morfología y vitalidad de los espermatozoides. También puede ofrecer información valiosa sobre la presencia de otras células como macrófagos, linfocitos, bacterias y hongos (Vásquez y Vásquez, 2007). Se debe tener en cuenta que existen dos tipos de evaluaciones diferentes, la del semen fresco y la del semen congelado-descongelado (Catena y Cabodevila, 1999).

En las muestras de semen fresco se puede evaluar volumen, color, olor y densidad; mientras que en el descongelado los parámetros de estas características se ven alterados por la presencia de diluyentes y criopreservantes. La viabilidad, motilidad masal y progresiva, morfología y concentración se realizan de la misma forma para los dos tipos de muestra seminal.

*Volumen:* Las glándulas sexuales accesorias secretan el líquido seminal, que es indispensable para transportar a los espermatozoides y su producción depende de la testosterona. Un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado no menor a 4 ml, el volumen puede variar entre 2 y 12 ml (Barth, 1994; Manotas *et al.*, 2001).

*Color:* La secreción de las vesículas seminales es opalescente pero puede presentar una coloración amarillenta debido a la flavina. Se

considera normal una coloración blanquecina-lechosa, siendo indicador de patologías los colores rosado, verdoso y rojizo. (Barth, 1994).

*pH:* La secreción de las vesículas seminales también funciona como buffer, además la secreción prostática es alcalina, lo que confiere una protección a los espermatozoides durante su estancia en el tracto reproductor femenino. Se considera normal un valor de pH entre 6.2 y 6.8 (Barth, 1994; Manotas *et al.*, 2001).

*Motilidad Masal:* Se evalúa observando el semen en microscopio óptico, debe ser posible apreciar movimiento en la muestra. La escala ordinal (subjetiva) con la cual se mide es de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formando remolinos. Se considera como valor mínimo de aceptación 3 (Amann y Hammerstedt, 1980; O'Connor *et al.*, 1981).

*Motilidad individual:* Para realizar esta evaluación se debe diluir el semen y se valora de manera subjetiva. Movimientos circulares u oscilatorios se consideran anormales. Puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento.

1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.

2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.

3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= movimiento progresivo, rápido.

5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente (Amann y Hammerstedt, 1980; O'Connor *et al.*, 1981).

*Vigor:* Se evalúa teniendo en cuenta la velocidad con la que los espermatozoides atraviesan el campo. La escala utilizada asigna 0 a los espermatozoides inmóviles y 4 a los que avanzan rápidamente y son difíciles de seguir visualmente. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3 (Den Daas, 1992).

*Vviabilidad:* Para determinar cuáles espermatozoides están vivos se realiza la tinción supravital eosina-nigrosina. Cuando las membranas plasmáticas se encuentran afectadas por daño mecánico o por muerte del espermatozoide, la membrana se vuelve permeable y permite el paso libre de los fluidos, por lo cual los espermatozoides muertos se observarán al microscopio como teñidos de rosado y los vivos estarán sin teñir, la nigrosina proporciona un medio de contraste para permitir la identificación (Vásquez y Vásquez, 2007).

*Morfología:* En el mismo frotis que se hizo para evaluar la viabilidad se puede cuantificar la morfología (Vásquez y Vásquez, 2007). Las morfologías anormales se clasifican como defectos en la cabeza, pieza media o cola de los espermatozoides. Cuando los defectos ocurren en las cabezas éstas pueden observarse grandes, redondas, pequeñas, cónicas, piriformes o amorfas con áreas acrosomales pequeñas. En la pieza media los defectos incluyen "cuello doblado" (donde el cuello y la cola forman un ángulo de más del 90° al eje longitudinal de la cabeza), inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, pieza media gruesa, irregular, anormalmente delgada (sin vaina mitocondrial), así como cualquier combinación de éstas. Los defectos del flagelo se observan cuando es corto, múltiple, roto o doblado, anchura irregular, en espiral y cualquier combinación de éstos (Sun *et al.*, 2006).



*Concentración:* La concentración espermática se calcula diluyendo el semen y depositando 10 µl en la cámara de Neubauer, se contabilizan 5 cuadrantes. Únicamente se cuenta las células que están en el interior de los cuadrantes y las cabezas espermáticas que tocan los bordes derecho y superior. Se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Espermatozoides/ml} = \text{FD} \times \text{Número de células espermáticas} \times 10\,000 \times 5$$

Donde:

FD: Factor de dilución

Número de células espermáticas: Células que fueron contadas en 5 cuadrantes de la cámara

10,000: Está dado por la dimensión de la cámara

5: Es el número de cuadrantes contabilizados (Vidament *et al.*, 2000).

Esta técnica de conteo es válida y confiable debido a que es repetible y en cada ocasión el resultado no presenta variación significativa.

*Schalm Test:* Permite detectar la presencia de leucocitos, pero sólo se realiza cuando se sospecha de enfermedades infecciosas en el tracto reproductor (Eaglesome *et al.*, 1992).

Los parámetros que componen el espermograma tienen una capacidad limitada para predecir el potencial fertilizante de un eyaculado (Guzick *et al.*, 2001). Por lo que se han desarrollado otras pruebas que permiten predecir dicho potencial de forma más eficaz (Sánchez *et al.*, 2002). Estas técnicas son:

Pruebas que evalúan la integridad de la Membrana Plasmática:

a) *Prueba de hipo-osmolaridad* (Hypoosmotic Swelling Testing HOST) es una técnica que puede ser aplicada en forma constante y se ha propuesto su uso para distinguir espermatozoides viables en fracciones inmóviles en muestras usadas para inyección espermática intracitoplasmática (ICSI). La membrana plasmática es la capa más externa del espermatozoide y lo cubre completamente, es una estructura compleja que sufrirá modificaciones durante el transporte del espermatozoide en el tracto reproductor femenino (Albarrán *et al.*, 2005; Baska *et al.*, 2008), y permite el transporte de moléculas de forma selectiva, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en el que se encuentra proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. (Sánchez *et al.*, 2002).

La integridad de la membrana plasmática no sólo es importante para el metabolismo espermático, ya que además se requieren cambios en sus propiedades para que pueda ocurrir la capacitación, reacción acrosomal y la atracción hacia la superficie del ovocito (Neild *et al.*, 1999), por lo que es de vital importancia en el proceso de fertilización. Cuando es expuesta a condiciones hipo-osmóticas el agua puede entrar al espermatozoide en un intento de mantener el equilibrio osmótico y esto induce alteraciones morfológicas visibles en el flagelo (Jeyendran *et al.*, 1984) (Figura 1).

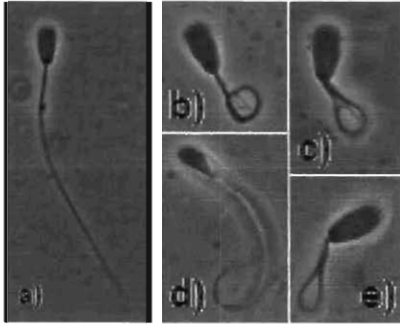


Figura 1. Prueba de hiposmolaridad Espermatozoides vistos en microscopio óptico 100x  
 a) Espermatozoide negativo a la prueba HOST  
 b-e) Espermatozoides positivos a la prueba HOST  
 Laboratorio Bioquímica de la Reproducción UAM-Xochimilco.  
 Rodríguez Lozano, 2010.

b) *Prueba de Resistencia Osmótica* (Osmotic Resistance Test ORT) permite valorar la integridad del acrosoma al someter a los espermatozoides a un medio hipo-osmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones estructurales evidentes a nivel acrosómico (Rubio Guillen *et al.*, 2009).

Pruebas que evalúan la integridad del ADN:

a) *Ensayo TUNEL* (Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick EndLabeling) es uno de los más utilizados para medir las anomalías del ADN que pueden afectar la fertilización y/o la implantación, es capaz de detectar fragmentación, desnaturalización y descondensación del ADN (Agarwal y Allamaneni, 2005). Se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la movilidad, concentración y morfología del eyaculado (Sun *et al.*, 1997; Duran *et al.*, 2002; Carrell., 2003). Este ensayo se basa en el principio de que cuando se agrega desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en presencia de desoxiuridina biotinilada (dUTP) estos se incorporan en rupturas de cadenas dobles o simples del ADN. La biotina actúa como

señal y puede ser detectada fácilmente, a través de técnicas colorimétricas ó fluorescentes. Cuantas más rupturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. En los espermatozoides con ADN normal sólo se detecta fluorescencia de fondo, mientras que los espermatozoides con ADN fragmentado se tiñen con una fluorescencia intensa (Gorczyza *et al.*, 1993). Esta fluorescencia puede detectarse tanto por citometría de flujo como a través de microscopía de fluorescencia (Lopes *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2007) (Figura 2).



Figura 2. Ensayo TUNEL  
Espermatozoides de bovino  
a) ADN fragmentado  
b) ADN intacto  
(Martins *et al.*, 2007).

b) *Técnica de Análisis de la Estructura Cromatínica del Espermatozoide* (Sperm Chromatin Structure Assay SCSA) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. El grado de desnaturalización resultante como consecuencia de un tratamiento mediante calor o ácido se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina (*acridine orange* AO) de fluorescencia verde (AO intercalado) a una fluorescencia roja (AO sin intercalar) (Drazynkiewicz *et al.*, 1975). Los resultados se expresan como el Índice de fragmentación de ADN (DFI) (Spano *et al.*, 1998). El SCSA se ha usado para predecir la capacidad de fertilización, implantación y embarazo tras las técnicas de reproducción asistida (Larson *et al.*, 2000). Los resultados de SCSA

también se han correlacionado con la fertilidad *in vivo* (Evenson *et al.*, 1999) (Figura 3).



Figura 3. Técnica de análisis de la estructura cromatínica del espermatozoide.

Espermatozoides de humano teñidos con naranja de acridina (AO)  
a) Fluorescencia verde (AO intercalado) indicando ADN fragmentado b) Fluorescencia roja (AO sin intercalar) indicando ADN no fragmentado (Larson *et al.*, 2000).

c) *Ensayo de electroforesis de células individuales* (Single Cell Gel Electrophoresis assay) o *Ensayo Cometa*: Fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson, (1984) y fue modificado posteriormente (Singh *et al.*, 1988). Mide el daño al ADN de cada célula basado en la migración del material genético desnaturalizado en un campo de electroforesis. Las células son embebidas en gel de agarosa y lisadas para que se exponga el material genético, posteriormente son tratadas con soluciones alcalinas desnaturalizantes que ayudan a relajar las cadenas de ADN para que posteriormente sean separadas y por acción de un campo eléctrico las moléculas de ADN se desplazan y se generan una imagen en forma de cometa. El ADN puede ser visualizado debido a las tinciones utilizadas que son fluorocromos. Esta prueba detecta daño al ADN pero no es posible distinguir entre fracturas dobles o simples de las cadenas. La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola del cometa; a su vez pueden utilizarse también otras características medibles tales como el "momento de la cola", que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción del total

del ADN de la cola) (Hellman *et al.*, 1995). El ensayo cometa ha sido usado de forma satisfactoria en la evaluación de la presencia de daño en el ADN tras la criopreservación de los espermatozoides (Duty *et al.*, 2002). También se ha descrito que puede predecir el porcentaje de desarrollo embrionario tras fertilización *in vitro* e ICSI, especialmente en parejas de personas con esterilidad de causa desconocida (Morris *et al.*, 2002; Tomsu *et al.*, 2002) (Figura 4).

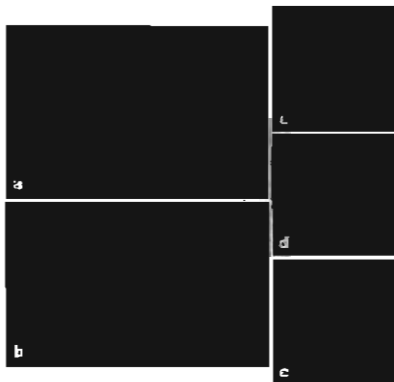


Figura 4. Ensayo de electroforesis de células individuales. Células tratadas con SCGE en las que es posible distinguir diferentes grados de ADN dañado.  
a) Célula sin daño  
b-e) Células con distintos grados de ADN dañado.  
(Dixon *et al.*, 2002).

d) *Análisis Nick Translation (NT)* Cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato) biotinilado a las rupturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo NT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Los resultados del análisis de NT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. Esta prueba evidencia una buena correlación con la movilidad y la morfología espermática y en menor medida con la concentración de espermatozoides en el semen (Irvine *et al.*, 2000; Tomlinson *et al.*, 2001). También se ha utilizado el análisis de NT para demostrar daño en el ADN debido a la presencia

de radicales libres originados por leucocitos en el tracto reproductor masculino (Aitken *et al.*, 1991) (Figura 5).



Figura 5. Análisis Nick Translation  
Muestra de espermatozoides de borrego,  
los que se observan con coloración  
verde indican ADN con rupturas  
presentes en su estructura  
(Parrilla *et al.*, 2003).

e) *Ensayo de Naranja de Acridina (AO)* esta técnica detecta la proporción de espermatozoides muertos dependiendo del grado de desnaturalización del ADN nuclear. Espermatozoides con fluorescencia naranja indican un ADN desnaturalizado, mientras que los que presentan fluorescencia verde tienen su ADN intacto. Sin embargo, la técnica de AO está limitada a estas propiedades metacromáticas, por cuanto nos aporta información limitada del estatus nuclear del espermatozoide. Esta técnica se puede realizar con otros fluorocromos como son el yoduro de propidio y bromuro de etidio. El naranja de acridina puede usarse tanto con el microscopio de fluorescencia como con citometría de flujo (Evenson *et al.*, 1999; Gopalkrishnan *et al.*, 1999) (Figura 6).

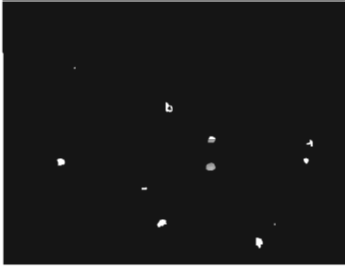


Figura 6. Ensayo de Naranja de Acridina  
Espermatozoides de bovino teñidos con  
naranja de acridina

- a) Espermatozoides con cromatina  
intacta se observan en coloración verde
- b) Espermatozoides con cromatina  
dañada se observan en coloración  
naranja

(Larson *et al.*, 2000).

f) *Prueba de Dispersión de la Cromatina* (Sperm Chromatin Dispersion) cuando los espermatozoides con ADN fragmentado son inmersos en un gel de agarosa y expuestos a soluciones de lisis, resulta la desprotección del núcleo y es posible observar halos de DNA disperso usando fluorocromos específicos para ADN (Fernández *et al.*, 2003) (Figura 7).



Figura 7. Prueba de Dispersión de la  
Cromatina Espermatozoides de humano  
teñidos con 49,6-diamidino-2-Phenylindole  
(DAPI). Mostrando diferentes tamaños de  
halos de dispersión de ADN:

- 1) Halo grande
- 2) Halo mediano
- 3) Halo muy pequeño
- 4) Sin halo

(Fernández *et al.*, 2003).

#### 1.1. Consecuencias de la falta de técnicas de evaluación de sementales.

La inversión que representa llevar a un macho para ser usado como semental por su valor genético predicho es elevada, y su fertilidad tarda en ser medida y evaluada apropiadamente, que en caso de ser



baja implica pérdidas económicas en quienes lo emplean como reproductor. Estos costos deben recuperarse al vender el semen de ese animal; por lo que es de suma importancia contar con pruebas que indiquen de manera confiable el potencial fertilizante de ese macho; ya que la baja eficiencia reproductiva se traduce en mermas económicas directas en la producción láctea y cosecha de becerrada así como pérdidas indirectas en la producción anual de carne por menos becerros destetados, además de que es necesario un mayor número de sementales para mantener las gestaciones con los gastos asociados.

Estos factores no sólo afectan de manera económica a la producción también ocasionan otros problemas igualmente graves ya que una vaca de 650 kg convierte el 8.2 % de su peso en excretas, lo que significan 53.3 kg de los cuales el 70 % corresponde a estiércol; estas excretas al degradarse emiten bióxido de carbono y metano, ambos gases cooperan al efecto invernadero y el segundo también afecta la capa de ozono. Las excretas expuestas al ambiente emiten amonio que es arrastrado hacia las capas más profundas del suelo y puede ser desnitrificado o puede llegar a convertirse en nitritos y posteriormente en nitratos por la acción microbiana de esos estratos. Si este último producto no es captado por las plantas se convierte en contaminante de los mantos freáticos (Méndez *et al.*, 1999).

Otro problema grave lo ha reportado la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL), al informar que 2, 026, 230 hectáreas de suelo en estados como Oaxaca se encuentran totalmente erosionadas. Entre las causas de degradación del suelo se hallan el pastoreo intensivo y

la transformación de áreas de alta biodiversidad en potreros (Cisneros *et al.*, 2004).

Con las técnicas de reproducción asistida se pretende lograr mayor eficiencia en la reproducción animal y dentro de éstas técnicas el manejo del semen ocupa un papel decisivo (Gallardo, 2004); ya que con la tecnología para conservación de semen se pueden seleccionar toros para ser usados en vacas que se encuentran distantes en espacio y tiempo; además los ganaderos no sufren los costos o riegos de criar toros reproductores y pueden tener acceso a varios ejemplares (Yildiz *et al.*, 2007); además se puede disminuir el número de días abiertos en las hembras y el costo que estos representan (\$34.13/día) (French y Nebel, 2003) y se optimiza al máximo el número de células espermáticas producidas por cada semental, ya que por monta natural un toro puede cubrir de 40-50 vacas/año, y con técnicas de reproducción asistida en sistema de monta dirigida puede cubrir de 150-200 vacas/año, y mientras que con inseminación artificial un toro puede producir suficientes espermatozoides para 50,000 vacas/año (Gallardo, 2004; Madrid-Bury, 2005).

La aplicación de técnicas de evaluación de semen que garanticen la calidad y la capacidad fertilizante de cada semental usado en inseminación artificial, es una tarea que debe recibir atención por todas las razones que ya se mencionaron.

## 2. Semen

El semen es la descarga que ocurre durante el proceso de la eyaculación; consiste en espermatozoides (10% del volumen final), elementos celulares y plasma seminal, segregados todos éstos por los túbulos seminíferos, epidídimo, conducto deferente y glándulas anexas; estas últimas varían en desarrollo y en función entre las distintas especies animales (Biswas *et al.*, 1978).

El eyaculado completo en el toro comprende de 2 a 10 ml, con una concentración espermática que varía de 300-2000 células  $\times 10^6$ /ml y un pH de 6.4–6.9. En lo que respecta al plasma seminal del toro la concentración de proteínas alcanza 3.8 mg/100ml, fructosa 120-540 mg/100 ml, sorbitol 10-136 mg/100 ml, ácido cítrico 357-1000 mg/100 ml, inositol 25-46 mg/100 ml, ácido glutámico 35-41 mg/100 ml y glicerilfosforilcolina 110-500 mg/100; en lo que respecta a la concentración de electrolitos estos son sodio 117 mmoles/litro, potasio 44 mmoles/litro, calcio 9.3 mmoles/litro, magnesio 3.4 mmoles/litro, cloruros 49 mmoles/litro y bicarbonato 7,1 mmoles/litro. Finalmente posee 400 unidades/mililitro de alfa-manosidasa y 15 000 unidades/mililitro de beta-N-acetilglucosamina. Las glándulas sexuales accesorias del macho son: vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales ó de Cowper. Estas glándulas secretan buena parte del líquido seminal que es indispensable para transportar a los espermatozoides, este líquido también sirve para la nutrición de los espermatozoides y como amortiguador contra el exceso de acidez del conducto genital femenino y su función es completamente dependiente de la secreción de testosterona por parte del testículo (Biswas *et al.*, 1978; Manotas *et al.*, 2001).

Las vesículas seminales son dos glándulas secretoras, se denominan así porque anteriormente se creía que eran reservorios de semen. La secreción de estas vesículas es líquida, opalescente y pegajosa, contiene alta concentración de potasio, ácido cítrico fructosa y varias enzimas, a menudo esta secreción es de color amarillo debido al alto contenido de flavina, su pH es de 5.7 a 6.2, la secreción de las vesículas seminales en el toro constituye el 50% del volumen de la eyaculación y sirve como buffer al semen. La próstata vierte sus secreciones en el momento de la eyaculación por medio de numerosos conductos que se abren hacia la uretra pelviana; es la única glándula accesoria del macho constante en todas las especies de animales domésticos. La secreción prostática es alcalina y da al semen su olor característico, su función es limpiar y lubricar la uretra. Las Glándulas de Cowper o bulbouretrales se encuentran ubicadas a ambos lados de la uretra pelviana, su función es similar a la de la próstata: limpiar y lubricar la uretra y también incorporan un pequeño volumen de líquido al semen (Biswas *et al.*, 1978; Manotas *et al.*, 2001).

#### 2.1. Anatomía del espermatozoide

El espermatozoide es una célula única con un número haploide de cromosomas, corresponde a la célula germinal masculina y es altamente especializada para el almacenamiento y transporte de material genético con una limitada capacidad de auto-reparación (Aurich, 2005).

Se produce en la gónada (testículo), mediante un proceso permanente de división de las células germinales. Durante la

espermioyénesis ocurren una serie de eventos en el epitelio de los túbulo s seminíferos controlado hormonalmente por el eje hipotálamo hipófisis-gónada, que culminan con la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras, las espermatogonias. Durante la espermioyénesis los organelos de los espermatozoides son modificados morfológica y funcionalmente con la finalidad de tener las características apropiadas de una célula altamente especializada cuya única función es fecundar al óvulo (Albarrán *et al.*, 2005).

El espermatozoide se puede dividir en tres regiones principales: cabeza, pieza media y flagelo (Flesch *et al.*, 2000) (Figura 8).

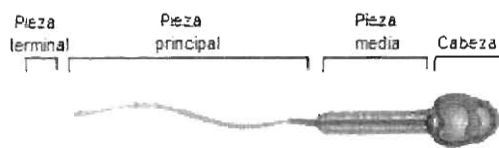


Figura 8. Morfología del espermatozoide (Modificado de Amann y Picket, 1987).

La cabeza (Figura 9) incluye al núcleo delimitado por la membrana nuclear, donde se encuentra la cromatina altamente condensada y la teca perinuclear; es portador de la mitad de la dotación cromosómica normal de las células que constituyen al individuo y de combinaciones únicas de su información genética. En la región apical, se localiza el acrosoma, que es una vesícula altamente especializada que contiene enzimas necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1994). Este organelo debido a su origen

estructura y función ha sido comparado con un lisosoma (Reyes y Chavarria, 1987).

En la composición del acrosoma se han demostrado 17 aminoácidos y seis carbohidratos que son: manosa, fucosa, galactosa, glucosamina, galactosamina y ácido siálico. Algunas de las enzimas contenidas en el acrosoma como la acrosina, son exclusivas del espermatozoide. El contenido enzimático del acrosoma consta de:

Proteasas: acrosina, calpaína, proteasa semejante a la catepsina D y proteasa semejante a la collagenasa.

Glucosidasas:  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, hialuronidasa y neuraminidasa.

Esterasas no específicas.

Fosfolipasa A.

Amidasas: arilamidasa y aspartilamidasa (Bellido, 1997; Albarrán *et al.*, 2005).

La cabeza del espermatozoide puede ser subdividida en cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial (Flesch *et al.*, 2000).

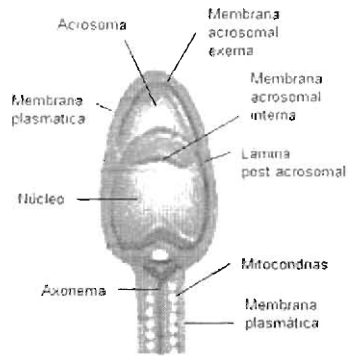


Figura 9. Componentes de la cabeza espermática (Modificado de Amann y Picket 1987; Juhász *et al.*, 2000).

La pieza media forma parte del flagelo, se distinguen el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas; es en esta porción donde se localizan las mitocondrias encargadas de la producción de energía (Flesch *et al.*, 2000).

El flagelo consta de varias regiones: la pieza conectora que lo une a la cabeza, la pieza media cubierta por las mitocondrias, la pieza principal y la pieza terminal; además posee proteínas capaces de utilizar la energía química contenida en el ATP para producir movimiento. El flagelo es recorrido centralmente por el axonema que se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos pares de microtúbulos. En el segmento medio esta disposición está rodeada por nueve fibras gruesas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El segmento principal está formado por el axonema en el centro, las fibras gruesas asociadas y la vaina fibrosa, esta da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola (Reyes y Chavarría, 1987) (Figura 10).

La última porción del flagelo es la pieza que se continúa posterior a la vaina fibrosa, esta contiene sólo el axonema central cubierto por la membrana plasmática (Flesch *et al.*, 2000).

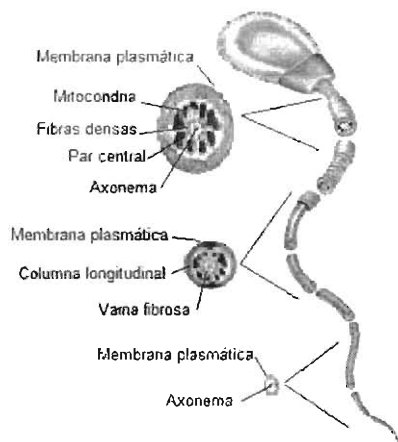


Figura 10. Componentes y disposición de estos en el flagelo del espermatozoide (Modificado de Amann y Picket, 1987; Juhász *et al.*, 2000).

### 2.1.1. Membrana plasmática del espermatozoide

La membrana plasmática es la capa más externa del espermatozoide y lo cubre completamente, el acrosoma queda debajo de ella y por encima del núcleo. La parte más apical del núcleo está en contacto con la membrana acrosomal; a la región de la membrana acrosomal que está en contacto con la membrana nuclear se le conoce como membrana acrosomal interna y la porción más lejana, que está en contacto con la membrana plasmática se le denomina membrana acrosomal externa. La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura compleja consistente en docenas de proteínas, glicoproteínas y lípidos (Figura 11), que sufrirán modificaciones



durante el transporte del espermatozoide por el tracto reproductor femenino (Albarrán *et al.*, 2005; Baska *et al.*, 2008).

Todas las membranas biológicas tienen una estructura general común; se trata de agrupaciones de moléculas lipídicas y proteicas, unidas por interacciones no covalentes capaces de responder a señales ambientales que modifican funciones celulares específicas. Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua, esta bicapa constituye la estructura básica de la membrana y actúa como barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas de proteína están intercaladas en la bicapa lipídica y median diversas funciones, algunas sirven para el transporte de moléculas específicas hacia el interior y el exterior de la célula; otras son enzimas que catalizan reacciones asociadas a la membrana y otras actúan de eslabones estructurales entre el citoesqueleto de la célula y la matriz extracelular, o de receptores que reciben y transducen las señales químicas procedentes del entorno de la célula (Arrazola, 1994) (Figura 11).

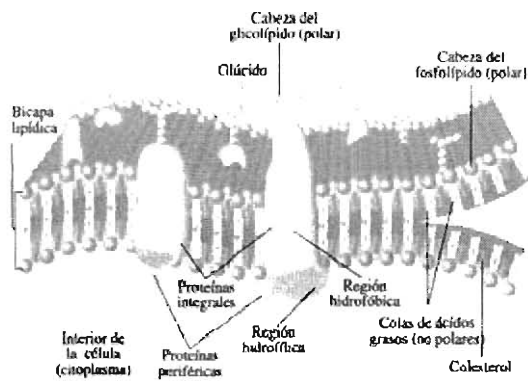


Figura 11. Estructura de la membrana plasmática (Leicach, 2001).

Los tres tipos principales de lípidos de las membranas celulares son el colesterol (los segundos más abundantes), los glucolípidos y los fosfolípidos (los más abundantes, ya que forman dos terceras partes del total de los componentes lipídicos), estos son anfipáticos es decir, tienen un extremo hidrofílico y un extremo hidrofóbico (Arrazola, 1994; Flesch *et al.*, 2000).

La membrana plasmática es una estructura semipermeable similar a un mosaico fluido modelo propuesto por Singer y Nicholson en 1971, que le atribuye una estructura formada por una doble capa de fosfolípidos dispuestos de forma que las cabezas polares se sitúan en los extremos (Mann y Lutwak-Mann, 1982).

La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide varía considerablemente entre las diferentes especies de mamíferos e incluso entre los eyaculados de un mismo individuo (Travis y Kopf, 2002); contiene en promedio 70%

de fosfolípidos, 25% de lípidos neutros y 5% de glicolípidos. Las concentraciones son comparables a las de las demás células somáticas; los fosfolípidos que se encuentran en mayor proporción son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Mann y Lutwak-Mann, 1982; Flesch *et al.*, 2000).

Los componentes fosfolípidicos de la membrana plasmática de los espermatozoides se encuentran asimétricamente distribuidos de manera semejante a como acontece en las células somáticas. Diversos métodos han revelado que la esfingomielina y en menor grado la fosfatidilcolina se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana (Gadella, 1999). Los aminofosfolípidos como fosfatidiletanolamina y especialmente la fosfatidilserina están localizados en la capa lipídica interna; si bien es cierto que en general la fosfatidilserina no se encuentra en grandes proporciones en la membrana plasmática, es importante resaltar que casi el 100% de este fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana y la presencia de éste en la cara externa es considerada como indicador de pérdida de la asimetría membranal (Barroso *et al.*, 2002).

Las membranas son un ensamble dinámico de proteínas y lípidos, dentro de los movimientos más importantes de los fosfolípidos está el que se da de la cara externa hacia la cara interna de la membrana que se denomina "flip" y el de la cara interna hacia la externa "flop" (Kuypers *et al.*, 1996). Bajo la mayoría de las condiciones el mecanismo de "flip-flop" es lento y su tiempo medio se mide en intervalo de horas o semanas (Boon y Smith, 2002). Sin embargo se ha encontrado que el movimiento de proteínas del exterior al interior de la membrana cataliza el paso de algunos fosfolípidos de una

lámina a la otra por el mecanismos de "flip-flop", tanto dependientes de ATP como independientes de él, en un tiempo menor a 5 minutos (Masson *et al.*, 2003).

Se ha observado que otras enzimas, semejantes a las translocasas tienen una función importante en la regulación de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de las membranas. Estas enzimas llamadas "flipasas" regulan una rápida translocación de fosfolípidos (Muller *et al.*, 1996; Masson *et al.*, 2003).

Todas las células eucariotas tienen carbohidratos en sus membranas, la mayor parte de ellos en forma de cadenas laterales de oligosacáridos unidas a las proteínas de la membrana celular (glucoproteínas) o, en menor proporción, unidos a los lípidos (glucolípidos). Las cadenas de oligosacáridos se localizan siempre en la superficie externa de la membrana. La proporción de carbohidratos en las membranas plasmáticas oscila en total entre un 2 y un 10% del peso de la membrana. Es posible que ciertas glucoproteínas transmembranales ayuden a anclar y orientar a las proteínas, impidiendo que se deslicen hacia el citosol o que oscilen a través de la bicapa. También pueden desempeñar un cierto papel en guiar a una glucoproteína hacia su destino adecuado, de una manera semejante a como lo hacen en algunas glucoproteínas de los lisosomas. Sin embargo, éstas no pueden ser las únicas funciones de los carbohidratos de membrana, ya que no explican su presencia en las moléculas glucolípídicas ni su complejidad (Langlais *et al.*, 1981; Fusi *et al.*, 1992). Tanto la complejidad de algunos oligosacáridos, de las glucoproteínas y de los glucolípidos de la membrana plasmática como su posición al descubierto sobre la superficie celular sugieren

que pueden desempeñar un importante papel en los procesos de reconocimiento entre célula y célula (Arrazola, 1994).

Aunque la estructura básica de las membranas biológicas está determinada por la bicapa lipídica, la mayor parte de sus funciones específicas están desempeñadas por las proteínas; por consiguiente, la cantidad y el tipo de proteínas de una membrana reflejan su función (Arrazola, 1994; Yanagimachi, 1994). Las proteínas existen como una cadena lineal de aminoácidos que puede degradarse con el tiempo, a esto se le denomina recambio proteico; la relación entre la degradación de una proteína y su síntesis es lo que determina la concentración de esa proteína dentro de la célula. Algunas proteínas tienen una vida media larga y otras una vida media corta, las primeras constituyen la mayoría de las proteínas celulares, mientras que las de vida corta son típicamente proteínas reguladoras clave y proteínas anormales o defectuosas (Cascales, 2005). Las proteínas de las membranas pueden dividirse en periféricas e integrales; las proteínas periféricas se enlazan a las membranas mediante interacciones polares las cuales pueden romperse por adición de sales o cambio de pH. La mayoría de las proteínas periféricas están unidas a la superficie de las proteínas integrales, ya sea en la cara citosólica o extracelular de la membrana (Langlais *et al.*, 1981; Fusi *et al.*, 1992). Todas las membranas biológicas poseen proteínas en la superficie que actúan como receptores para diversos compuestos exógenos, como enzimas, hormonas, etc. (Reyes *et al.*, 1990; Blackmore, 1993; Baldi *et al.*, 1995).

La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones bien delineadas denominadas dominios, los

cuales difieren en concentración y distribución de sus distintos componentes (fosfolípidos, proteínas, colesterol, carbohidratos, etc.) (Flesch *et al.*, 2000; Ainsworth, 2005).

La membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide está dividida en un dominio acrosomal y en un dominio post-acrosomal (Yanagimachi, 1994). El dominio acrosomal puede subdividirse en tres segmentos: el primero es el segmento marginal (segmento apical, banda anterior y aro periférico), este dominio se encuentra sobre el área acrosómica que sobresale de la región nuclear; el segundo es el segmento principal (segmento acrosomal) localizado sobre la proporción mayor del acrosoma y el tercero es el dominio ecuatorial (acrosomal posterior) entre el acrosoma y la región post acrosomal (Yanagimachi, 1994; Flesch *et al.*, 2000) (Figura 12).

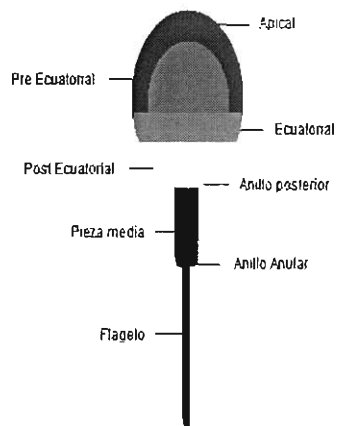


Figura 12. Dominios presentes en el espermatozoide maduro (Modificado de Flesch *et al.*, 2000).

Dentro de los dominios más estudiados están el de la región acrosomal, el cual difiere de los demás porque en este lugar es donde se encuentran más receptores a progesterona; otro dominio importante es el de la región post-acrosomal, lugar donde hay depósitos de calcio necesario en la capacitación espermática (Rathi *et al.*, 2003).

## 2.2. Capacitación espermática

Después de la eyaculación el espermatozoide sufre modificaciones en la superficie de su membrana por la absorción de diversas moléculas glicoproteicas conocidas como factores descapacitantes; estos factores están presentes en las secreciones testiculares y epididimales, funcionan protegiendo a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento en la cola del epidídimo, estabilizando el acrosoma o inhibiendo la unión del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) del ovocito y pueden inhibir actividades enzimáticas que son consideradas indispensables para realizar la fertilización. La inhibición enzimática protege el aparato acrosomal del espermatozoide hasta que éste alcanza el sitio adecuado para interactuar con el gameto femenino, por lo que es importante su remoción antes, pues se ha sugerido que estos factores bloquean receptores de la ZP localizados en la membrana del ovocito (Dacheux, 2003; Marin *et al.*, 2008).

Los espermatozoides epididimarios de toro internalizan calcio rápidamente, mientras que los eyaculados no lo hacen, lo que sugiere que el contacto con el plasma seminal afecta su capacidad para capturar este ion. En el plasma seminal se han aislado varias

proteínas, una de las cuales denominada caltrina actúa como inhibidora de los canales de transporte de calcio, y por tanto, de la capacitación y reacción acrosomal espermática (Jiménez, 2003).

Después de ocurrida la espermatogénesis y espermiogénesis, los espermatozoides del testículo parecen ser maduros en su morfología, pero desde un punto de vista funcional aún son inmaduros. Esto fue observado por primera vez por Austin en 1951, quien demostró que un espermatozoide recién eyaculado no puede fertilizar un ovocito sino hasta que reside en el aparato reproductor femenino por un periodo determinado de tiempo (Fraser, 1994; Yanagimachi, 1994; Travis y Kopf., 2002).

Muchas de las características de la membrana plasmática del espermatozoide, que determinan su capacidad fisiológica para realizar la fertilización del gameto femenino son adquiridas durante el paso del espermatozoide a través del conducto epididimario. Los cambios metabólicos y estructurales ocurren principalmente en la cabeza y cuerpo del epididimo (proceso andrógeno dependiente), tales cambios forman parte del proceso que se conoce como maduración epididimaria (Marín *et al.*, 2008). Dentro de las principales modificaciones que se llevan a cabo en la estructura del espermatozoide se puede observar una migración de la gota citoplasmática hacia la porción final de la pieza media y su posterior desprendimiento y angostamiento del cuello. Los cambios en la membrana plasmática consisten en modificaciones en la distribución de partículas intramembranales, absorción de antígenos, glicoproteínas y ácido siálico, alteraciones en la composición de lípidos, aumento de la carga neta de la superficie, disminución de la



fluidez de la membrana y presencia de factores descapacitantes (García, 2000; Dacheux, 2003).

Los espermatozoides recién eyaculados son móviles y viables no obstante son incapaces de fecundar al ovocito, para lograr esta función es necesario que ocurran los procesos de capacitación y reacción acrosomal, que se produce al interactuar los espermatozoides con las secreciones en el tracto reproductor femenino; ello conlleva a cambios bioquímicos como aumento en la permeabilidad y decremento en la relación colesterol: fosfolípidos en la membrana plasmática, aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y alcalinización citoplasmática, activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na/K}$ , aumento de la fluidez y modificaciones de los patrones de fosforilación de proteínas (Naz y Rajesh, 2004; Risopatrón *et al.*, 2005; Almeida-Rodríguez *et al.*, 2008).

El espermatozoide adquiere la capacidad de fecundar un ovocito al interactuar con los factores capacitantes presentes en el fluido folicular y en la matriz intercelular de las células del cúmulo-zona pelúcida. Entre estos factores se encuentran los glicosaminoglicanos como el condroitín sulfato, ácido hialurónico y la heparina (Risopatrón *et al.*, 2005).

La capacitación ocurre normalmente en el tracto genital femenino, sin embargo, también puede ser inducida con técnicas *in vitro*; de hecho, la mayoría de la información sobre diversos aspectos de la capacitación espermática ha emanado de estudios *in vitro* (Naz y Rajesh, 2004).

Los estudios *in vitro* con espermatozoides han permitido acercarnos al conocimiento de lo que ocurre dentro del tracto femenino. Durante la incubación *in vitro* se producen cambios físicos y bioquímicos en la membrana plasmática de los espermatozoides como es por ejemplo: la presencia de un patrón característico de movilidad espermática (hiperactivación) asociado con la etapa final de la capacitación; activación del metabolismo energético y de todos sus sistemas enzimáticos (Rogers y Perreault, 1990; Aitken *et al.*, 1995); eliminación o modificación de algunos componentes superficiales absorbidos o integrados en la membrana plasmática durante la maduración epididimaria que actúan como factores descapacitantes (Oliphant *et al.*, 1985; Drisdell *et al.*, 1995); disminución de la carga neta negativa superficial por la eliminación de ácido siálico y de algunos compuestos sulfatados (Lasalle y Testart, 1994); modificaciones en la conformación de las proteínas propias de la membrana (Yanagimachi, 1994) y cambios en la permeabilidad membranal a iones, principalmente al  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (Baldi *et al.*, 1991; Fraser, 1994; Chavarría *et al.*, 1996).

En diferentes especies de mamíferos se han identificado cambios característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación, estos cambios se conocen como "hiperactivación", este patrón se caracteriza por un aumento significativo en la frecuencia y amplitud de los movimientos del flagelo, lo que proporciona al espermatozoide un gran impulso para avanzar en busca del ovocito y penetrar la zona pelúcida (DeMott y Suárez, 1992; Gafo y Garde, 1994; Fraser, 1994).

El bicarbonato es uno de los compuestos más importantes para la capacitación ya que la ausencia de éste inhibe la fosforilación proteica (Leclerc y Kopf, 1999) y la activación de la hipermotilidad (Osheroff *et al.*, 1999).

Algunos cambios celulares que ocurren en la capacitación espermática son:

- I. Pérdida de colesterol en la membrana plasmática causado por la albúmina y su papel como secuestrante con lo cual la membrana pierde estabilidad (Flesch *et al.*, 2000; Travis y Kopf, 2002). La reducción del contenido de colesterol resulta en una disminución en la rigidez de la membrana plasmática y reacomodos en los lípidos y proteínas; adicionalmente aumenta el pH intracelular y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  así como la permeabilidad al Potasio (Darszon, 2007).
- II. Fosforilación de proteínas la cual actúa como un mecanismo de control de diversos procesos celulares, tales como el control del ciclo celular y sistema de modulación iónico. En las células eucariotas, uno de los mecanismos más comunes para la actividad de proteínas reguladoras es la adición o eliminación de grupos fosfato de la serina, treonina o residuos de tirosina. La adición o eliminación de los grupos fosfato a las proteínas pueden inducir modificaciones que resultan en cambios conformacionales que las activen o inactiven (Naz y Rajesh, 2004); ésta situación permite que las proteínas de la membrana del espermatozoide que participan en el reconocimiento e interacción con el óvulo no sean

bloqueadas (Albarrán *et al.*, 2005). Los espermatozoides maduros carecen de actividad de transcripción por lo tanto se puede justificar la importancia de modificaciones post-traduccionales tales como la fosforilación de proteínas (Naz y Rajesh, 2004).

- III. Aumento del pH intracelular para lo cual se requiere  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Fraser, 1994). El  $\text{Na}^+$  es el catión más abundante en el medio extracelular normal y al igual que con el  $\text{Ca}^{2+}$  se requiere su entrada desde el medio extracelular (Naz y Rajesh, 2004; Risopatrón *et al.*, 2005; Almeida-Rodríguez *et al.*, 2008).

Son relativamente pocos los espermatozoides que llegan a la ampolla en el tracto reproductor de la hembra, por lo que es muy importante que no lleven a cabo los cambios necesarios para adquirir su capacidad fertilizante demasiado rápido y por lo tanto pierdan la habilidad de interactuar con éxito con el ovocito (Fraser, 1994; Albarrán, 2005).

La capacitación *in vivo* del espermatozoide aparentemente ocurre en la región del istmo del oviducto. Durante la capacitación hay un agotamiento del colesterol en la superficie del espermatozoide, modificación de glucosaminoglicanos y cambios iónicos a medida que avanza por el aparato reproductor femenino, ya que durante el coito el semen es depositado en la vagina y avanza a través del *mucus* del cuello gracias a su motilidad, y posteriormente es transportado por las contracciones uterinas. Se cree que sólo los espermatozoides móviles se alojan en las criptas de la mucosa endocervical y los muertos son eliminados (Hafez y Hafez, 2002).

### 2.3. Eliminación espermática

De los millones de espermatozoides producidos por el macho sólo uno logrará fecundar al ovocito y el resto será eliminado (Albarrán *et al.*, 2005), pero el mecanismo de selección y eliminación espermática no se tiene del todo claro (Sutovsky *et al.*, 2001a). Existen evidencias de que la eliminación de espermatozoides defectuosos y detritus celulares ocurre desde la *rete testis* y durante el trayecto de estos hasta la eyaculación; en el epidídimo ocurre licuefacción intraluminal, y fagocitosis por leucocitos o células epiteliales especializadas (Sutovsky *et al.*, 2004). Por otra parte, el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino es un proceso complejo; ya que están expuestos a diversos daños debidos en primera instancia a las contracciones uterinas y en segunda, a las defensas del sistema inmune (Suarez y Pacey, 2006). Dentro del cérvix el moco representa una barrera para espermatozoides anormales, debido a que presentan un pobre perfil hidrodinámico en comparación con los espermatozoides que tienen una adecuada motilidad. La vagina y el cérvix pueden presentar una respuesta inmune; se ha observado en conejas y mujeres que la inseminación estimula la migración de leucocitos, particularmente neutrófilos y macrófagos, y al haber perdido la protección que le brinda el plasma seminal los espermatozoides son más susceptibles al ataque de los leucocitos, este mecanismo sirve para disminuir de manera dramática el número de espermatozoides que fueron depositados en el tracto femenino (Ebensperger y Barros, 1984; Suárez y Pacey, 2006).

También se ha propuesto que algunas proteínas de la superficie del espermatozoide cuando pierden su estructura normal son detectadas

por la ubiquitina (Sutovsky *et al.*, 2004), una pequeña proteína encargada de señalar proteínas alteradas para que sean degradadas (Hershko y Ciechanover, 1998); por lo que se ha pensado que este proceso puede ser un indicador de alteraciones de la membrana plasmática que tengan que ver con la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Sutovsky *et al.*, 2004).

Las estructuras espermáticas accesorias como la vaina mitocondrial son incorporadas al citoplasma del ovocito en la fertilización (Sutovsky *et al.*, 1996), se piensa que éstas son marcadas para su destrucción por la ubiquitina ya que se ha observado que esta proteína presenta gran afinidad por la prohibitina, un componente de la membrana mitocondrial, este evento puede ocurrir en tres distintos pasos en la vida del espermatozoide: en el testículo, en el epidídimo y en el citoplasma del ovocito en la fertilización, lo que ocasiona degradación proteica en la membrana mitocondrial de los espermatozoides lo cual le otorga un papel a la ubiquitina en la regulación de la herencia mitocondrial en mamíferos (Winston *et al.*, 2003).

### 3. Ubiquitinación espermática

De forma experimental se ha encontrado que la infertilidad en el macho (ratón, caballo, humano, gaur, toro doméstico y mono *Rhesus*) está asociada a un contenido alto de proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide que se unen a ubiquitina (Sutovsky *et al.*, 2001b). La ubiquitina es una pequeña proteína secretada principalmente por las células del epitelio epididimal (Baska *et al.*, 2007); este epitelio está compuesto por varios tipos celulares que

varían a lo largo del órgano, el tipo celular predominante son las células apicales y estereociliares; este epitelio se encarga de degradar espermatozoides muertos o anormales y asegurar la sobrevivencia de otros gracias a la estimulación androgénica que recibe (Jones, 2004). Espermatozoides con proteínas ubiquitinadas en su membrana plasmática pueden ser acarreados fuera del testículo ya que la ubiquitinación ocurre durante su paso por el epidídimo (Sutovsky *et al.*, 2001a; Baska *et al.*, 2007). Basado en estas observaciones Sutovsky *et al.*, 2001a desarrollaron un sistema de marcaje con ubiquitina por inmunoensayo (SUTI), para revelar espermatozoides defectuosos, a pesar de que esos defectos no sean detectados por una evaluación microscópica. Por medio de este sistema niveles altos de espermatozoides ubiquitinados se han encontrado en semen fresco y congelado de toros domésticos, gaur y búfalo; estos espermatozoides invariablemente presentaban defectos visibles en la cabeza y axonema; en el mismo estudio en semen fresco de mono *Rhesus* y semen congelado de hombres fértiles también se observó ubiquitinación en espermatozoides defectuosos, en estas especies se pudo observar un número mayor de espermatozoides ubiquitinados en la fracción inmóvil de la muestra seminal (Sutovsky *et al.*, 2001a).

En un experimento con hombres, Sutovsky *et al.*, (2001b) observaron un alto porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en un paciente con buen porcentaje de motilidad y viabilidad, diagnosticado con infertilidad idiopática; en el mismo experimento en una pareja diagnosticada con infertilidad tubárica primaria el hombre presentó un conteo espermático bueno y motilidad promedio pero un número elevado de espermatozoides ubiquitinados con la prueba SUTI.

Sutovsky *et al.*, (2003), compararon el porcentaje de espermatozoides de 3 caballos fértiles con el de uno subfétil; ellos observaron espermatozoides ubiquitinados en las muestras de los cuatro, pero una mayor ubiquitinación en el macho subfétil, además de un descenso en el porcentaje de ubiquitinación espermática en los sementales fértiles en la época reproductiva ya que se trata de una especie estacional.

Se ha reportado una correlación negativa entre ubiquitinación espermática y concentración, y una correlación positiva entre ubiquitinación espermática y morfología anormal en hombres infértiles y hombres fértiles fumadores, y fértiles expuestos a solventes; por lo que en ese estudio concluyeron que la ubiquitinación elevada estuvo inversamente asociada con concentración, motilidad y morfología normal, validando la ubiquitinación como un biomarcador de fertilidad en hombres (Sutovsky *et al.*, 2004).

Muratori *et al.*, (2005), realizaron un experimento con hombres y concluyeron que las correlaciones negativas encontradas entre ubiquitinación espermática y parámetros seminales está dada por otros componentes como cuerpos residuales no absorbidos, citoplasma residual y espermatozoides fragmentados presentes en el eyaculado.

Ozanon *et al.*, (2005), realizaron SUTI únicamente con microscopia (excluyendo la citometría de flujo) en hombres que fueron clasificados en cuatro grupos: 1) hombres infértiles con anomalías morfológicas, 2) hombres con infertilidad idiopática (no explicada), 3) hombres normales (sin hijos) con parejas infértiles y 4) hombres normales (con hijos) con parejas infértiles. Reportaron porcentajes de espermatozoides ubiquitinados en los cuatro grupos de hombres



trabajados, pero el mayor porcentaje de espermatozoides ubiquitinados se observó en el grupo 1 y el menor porcentaje en el grupo 4; por lo que concluyeron que el uso de este ensayo es útil en la medicina reproductiva humana. Además reportaron que no hubo un cambio significativo en la ubiquitinación espermática antes y después del proceso de criopreservación.

### 3.1 Sistema ubiquitina-proteosoma

La señalización para desencadenar el sistema proteolítico vía ubiquitina-proteosoma comienza con la ubiquitina, una pequeña proteína aislada por primera vez por Goldstein a partir de timo bovino (Lippert *et al.*, 1993; Cascales, 2005), y posteriormente se encontró en diferentes tejidos. Está compuesta por 76 aminoácidos, un peso molecular de 8.6 kDa, elevada estabilidad y está conformada por cinco láminas beta y una gran hélice alfa (Cascales, 2005; Hodjat *et al.*, 2008).

En general, los sustratos ligados a las cadenas de poliubiquitina son marcados para la degradación, en donde las cadenas de ubiquitina son partidas por enzimas específicas para el reciclado de ésta (Hershko y Ciechanover, 1998; Bebington *et al.*, 2001).

Los dos grupos de proteínas propias (extracelulares e intracelulares), se degradan por mecanismos diferentes (Ciechanover *et al.*, 2000). La vía de la ubiquitina-proteosoma es el principal mecanismo en las células para el catabolismo proteico, interviniendo en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras; se encuentra involucrada en el control del ciclo celular, reparación de DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación

de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de antígenos, biogénesis de ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural, degeneración muscular y diferenciación celular (Cascales, 2005; Baska *et al.*, 2008). Una disfunción en alguno de los mecanismos mediados por la ubiquitina causa condiciones patológicas, incluyendo malformaciones (Hershko y Ciechanover, 1998). Mediante la degradación proteica es posible eliminar rápidamente una proteína que a su vez regulaba otra función; esta forma de control es muy efectiva ya que la eliminación de una proteína reguladora asegura que el proceso regulador efectuado por ella sea detenido (Ciechanover *et al.*, 2000; Cascales, 2005).

Los pasos bioquímicos para la unión ubiquitina-proteína son tres; es necesaria la acción de enzimas y hay consumo de energía a partir de ATP. El residuo glicina en el carboxilo terminal de la ubiquitina es activado en un paso que requiere ATP por una enzima específica conocida como E1 (enzima activadora), este paso consiste en la formación de una ubiquitina adenilada, con la liberación de PPI, seguida por la unión de la ubiquitina al residuo cisteína de E1 con un enlace tioéster y la liberación de AMP; la ubiquitina activada es transferida al residuo cisteína de la E2 (enzima conjugadora), el tercer paso es catalizado por E3 (enzima unidora), la ubiquitina es unida por un enlace isopeptídico a un grupo amino del residuo lisina de la proteína sustrato. La enzima E3 parece ser la responsable de la ligadura a las proteínas sustrato (Hershko y Ciechanover, 1998; Baarends *et al.*, 1999; Bebington, 2001) (Figura 13).

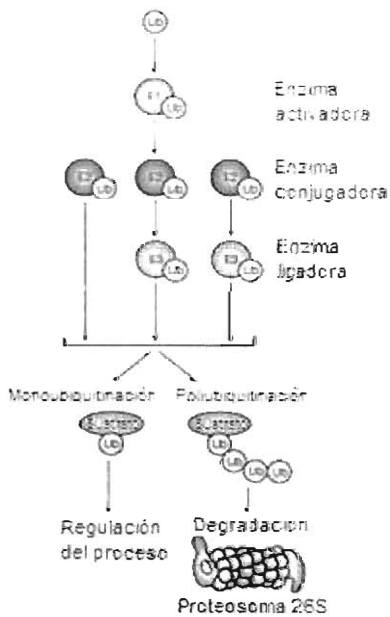


Figura 13. Sistema ubiquitina-proteosoma.

La ubiquitina libre es activada por la E1 en un paso dependiente de ATP, subsecuentemente es transferida a E2, en algunos casos se requiere E3 para ubiquitinar a la proteína sustrato. Usualmente varias moléculas de ubiquitina en forma de cadena son conjugadas con la proteína sustrato. La multiubiquitinación sirve principalmente, pero no exclusivamente para marcar al sustrato para ser degradado, mientras que la monoubiquitinación regula varios procesos como endocitosis, reparación de ADN y regulación transcripcional (Modificado de Jesenberger y Jentsch, 2002).

La ubiquitina actúa a modo de etiqueta para que la proteína pueda ser reconocida por el proteosoma para su degradación (Cascales, 2005).

El proteosoma cataliza el paso final de la degradación de las proteínas; existe en múltiples formas en las células eucariotas, es una gran molécula de 720 kDa, de forma cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete subunidades diferentes cada una que están presentes en dos copias y en una sola localización, de forma que la partícula presenta una simetría doble; reconoce y se une a las proteínas ubiquitinadas y las destruye en su interior consumiendo energía; antes de que esto tenga lugar, las unidades de ubiquitina se liberan para ser reutilizadas (Hershko y Ciechanover, 1998).

Cuando el proteosoma 20S se asocia con el activador proteosomal 19S (sitios reguladores), constituyen el proteosoma 26S y este contiene los sitios catalíticos y algunas subunidades de ATPasas que están involucradas en la acción específica del proteosoma (Hershko y Ciechanover, 1998; Morales *et al.*, 2003).

La proteólisis por el proteosoma no es arbitraria, el modo de acción preferido es por rupturas sucesivas comenzando cerca del N-terminal y produciendo fragmentos de 4 a 25 aminoácidos. El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es:

- 1) Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S.
- 2) Despliegue mecánico de la proteína sustrato dependiente de ATP.
- 3) Introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas.
- 4) Ruptura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos.
- 5) Salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto (Hershko y Ciechanover, 1998; Cascales, 2005).

La secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal determina la vida media de la mayoría de las proteínas, otras señales que incluyen dominios hidrofóbicos de proteínas superficiales y secuencias de cajas de destrucción son implicadas en el marcaje del sustrato por la ubiquitina (Hershko y Ciechanover, 1998; Sutovsky *et al.*, 2001a; Cascales, 2005).

La ubiquitina desempeña ciertas funciones en el espacio extracelular y se sabe que influye en la diferenciación de linfocitos B y T (Lippert *et al.*, 1993; Cascales, 2005).

Sixt *et al* (2008) observaron que la ubiquitina extracelular parece tener un efecto pleiotrópico en células hematopoyéticas, actividad antimicrobiana, inducción de apoptosis y supresión de respuesta proliferativa en células B inducida por IgG.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Inseminación Artificial (IA) es la técnica biotecnológica de mayor uso en la reproducción animal; en México ha sido usada en ganado bovino por lo menos desde hace 5 décadas (Yildiz *et al.*, 2007); pero un punto fundamental para que sea exitosa consiste en la evaluación eficiente del semen que va a ser utilizado; y aún cuando se han integrado nuevos métodos de evaluación espermática no se ha logrado predecir el potencial fertilizante del semen de manera 100% confiable (Sutovsky *et al.*, 2004).

Erróneamente la mayoría de las veces los problemas de infertilidad son atribuidos a las hembras (siendo ésta una de las principales causas de desecho), sin considerar que la causa de baja fertilidad reflejado en hembras repetidoras puede ser ocasionado también por el semen con baja fertilidad utilizado en la inseminación, esto toma gran importancia económica ya que un eyaculado puede ser usado hasta en 500 vacas inseminadas artificialmente (Vitela *et al.*, 2004). Debido a lo anterior es de vital importancia desarrollar técnicas de evaluación seminal que permitan predecir de manera acertada la capacidad fertilizante de un semental; por lo anterior con este trabajo

se pretende determinar si la proporción de espermatozoides ubiquitinados presentes en una muestra seminal está relacionada con su capacidad fertilizante, de manera que esta prueba pudiera ser integrada para diferenciar sementales con diferentes grados de fertilidad.

#### IV. HIPÓTESIS

En semen descongelado de toro, el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados está inversamente relacionado con la fertilidad.

#### V. OBJETIVOS

##### GENERAL

Determinar si existen correlaciones entre ubiquitinación espermática, calidad espermática determinada por espermograma y fertilidad en semen descongelado de bovino.

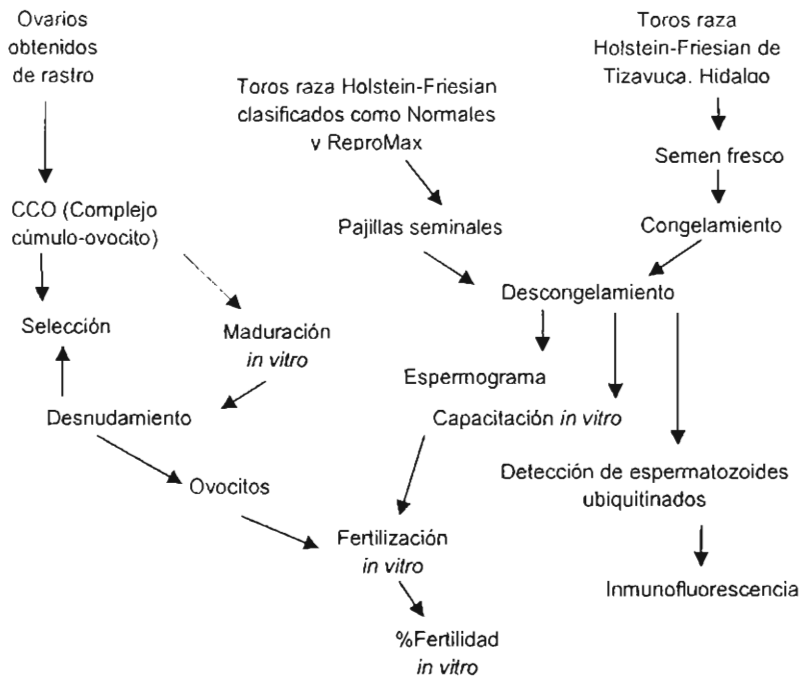
##### PARTICULARES

Estudiar las asociaciones entre viabilidad, motilidad, normalidad y ubiquitinación espermática.

Obtener el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados al ser descongelados y después de ser capacitados *in vitro*.

Establecer si existen relaciones entre fertilidad *in vitro*, Tasa Relativa Estimada de Concepción, Análisis Agri-Tech y Tasa Porcentual de No Retorno en muestras seminales evaluadas con diferentes grados de fertilidad *in vivo*.

## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron sementales de una compañía comercial de semen con base en su capacidad fertilizante observada *in vivo*. De los 8 toros seleccionados se compraron 4 pajillas seminales de cada uno, a las cuales se les realizó espermograma clásico, detección de espermatozoides ubiquitinados (post-descongelamiento y post-capacitación) con técnicas de inmunofluorescencia y posteriormente de cada muestra se realizó fertilización *in vitro*. De los resultados obtenidos se realizaron comparaciones entre los dos grupos de

sementales seleccionados para determinar si existían relaciones entre estos parámetros y la fertilidad.

Con el propósito de determinar si la congelación del semen le confiere diferencias en el porcentaje de ubiquitinación comparado con el semen fresco y ante la imposibilidad de conocer este dato en los sementales incluidos en el experimento, se evaluaron cuatro muestras de semen fresco y post-descongelado de toros activos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. Además se evaluó el porcentaje de espermatozoides capacitados y sin capacitar en cada una de estas muestras.

#### Clasificación de sementales

Semex Alliance es una empresa canadiense dedicada a la producción y comercialización de semen; clasifica a los sementales según sus mejores características en producción lechera, conformación, longevidad, reproducción, etc. Los sementales mejor evaluados en cuanto a capacidad reproductiva reciben la clasificación ReproMax.

ReproMax es un Índice de fertilidad con la combinación de la Tasa Porcentual de No Retorno (NRR) de Canadá, el Análisis Agri-Tech (ATA) de 12 estados de EUA y la Tasa Relativa Estimada de Concepción (ERCR) calculado por EUA (Pace. ABS).

Los datos NRR son proporcionados por la Agencia Canadiense del Centro de Datos (CDN) y refleja el porcentaje de las primeras inseminaciones que se realizaron con éxito sin que se repitiera la inseminación en los 56 días posteriores a la primera. Los datos del Análisis Agri-Tech (Tasa de Gestación Relativa) se basan en las



pruebas de gestación realizadas dentro de los 75 días después de la última inseminación. El centro de datos de América USDA-AIPL, incluye la información ATA en el cálculo de la prueba de Tasa de Concepción de Toro (SCR) (Norman. ABS).

Las tres fuentes de datos (NRR, ATA, ERRCR) son incluidas en el índice ReproMax con valores definidos; sin embargo estos no son publicados y permanecen en Semex para uso interno.

De Semex Alliance se eligieron 4 sementales clasificados como ReproMax y 4 sementales Normales (Cuadro 1), y se utilizaron 4 pajillas de semen de cada semental.

SEMENTALES UTILIZADOS			
ReproMax		Normales	
Bacculum Dudoc	0200HO04484	Bonaire Karon	0200HO05139
Diamond-Oak Frosty	0200HO01584	Rubens STBVQ FR	0070HO00969
Comest Lheros	0072HO01758	Silky Costeau	071HO01469
Littoral Comest	0200HO05156	Dolman Regancrest	0200HO01677

Cuadro 1. Nombre e identificación de los sementales utilizados en el experimento

Se utilizaron cuatro pajillas del mismo eyaculado de cada uno de los sementales elegidos: 2 pajillas para realizar la fertilización *in vitro* (FIV) y 2 pajillas para realizar los espermogramas y la detección de ubiquitina. Esto se realizó así debido a la complejidad metodológica que representaba hacer todos los conteos en una misma pajilla, ya que los tiempos de incubación en las técnicas utilizadas debían ser estrictamente respetados.

Las pajillas se mantuvieron en Nitrógeno líquido hasta que fueron procesadas, la descongelación de la pajilla se realizó sumergiéndolas en agua a 37°C durante 60 segundos (De Jarnett *et al.*, 2000).

### Espermograma

La evaluación post-descongelamiento de las pajillas seminales tuvo como finalidad determinar si los espermatozoides soportaron el proceso de descongelación y fueron capaces de mantener características esenciales como viabilidad, morfología normal y motilidad.

Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos mediante la tinción supravital eosina-nigrosina. Cuando las células mueren o las membranas plasmáticas se encuentran dañadas pierden su capacidad de permeabilidad selectiva y permiten el paso libre de los fluidos, por lo cual los espermatozoides muertos se observan al microscopio teñidos de rosa y los vivos sin teñir, la nigrosina proporciona un medio de contraste para permitir su identificación (Figura 14). En este mismo frotis se evaluó la morfología (Yunes *et al.*, 2000; Vásquez y Vásquez, 2007).

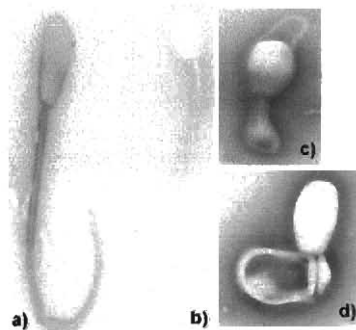


Figura 14. Tinción supravital eosina-nigrosina. Espermatozoides de bovino con tinción supravital.  
a) Espermatozoide muerto con morfología normal  
b) Espermatozoide vivo con morfología normal  
c) Espermatozoide muerto con morfología anormal  
d) Espermatozoide vivo con morfología anormal. Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción UAM-Xochimilco.

Se valoró la motilidad masal y progresiva de cada muestra mediante microscopía óptica (40 X); la concentración espermática se calculó en la cámara de Neubauer con la siguiente fórmula:

$$\text{Espermatozoides/ml} = \text{FD} * \text{Número de células espermáticas} * 10\,000 * 5$$

donde:

FD: Factor de dilución

Número de células espermáticas: Células que fueron contadas en 5 cuadrantes de la cámara.

10 000: Está dado por la dimensión de la cámara.

5: Es el número de cuadrantes contabilizados (Vidament *et al.*, 2000).

Técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina (SUTI por sus siglas en inglés).

La detección de ubiquitina se realizó por la Técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina (SUTI) propuesta por Sutovsky *et al.*, (2000) modificada (en nuestro laboratorio de acuerdo a lo siguiente: nosotros usamos un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ubiquitina conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (Hodjat, 2008), a diferencia de Sutovsky *et al.*, (2000) que utilizaron un anticuerpo anti-ubiquitina y un anticuerpo secundario marcado con FITC. Del semen descongelado se tomaron alícuotas de 5 µl que se colocaron en tubos Ependorf de 200 µl junto con 5 µl de anticuerpo monoclonal anti-ubiquitina (P4D1) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) Santa Cruz, (Biotechnology, Inc.), y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (25°C), posteriormente se realizó un lavado de tres tiempos con solución salina isotónica y se

centrifugaron a 3000 rpm por 60 segundos; se tomaron alícuotas de 5 µl de la pastilla que se formó y se colocaron en un portaobjetos al que se fijó un cubreobjetos con laca de uñas transparente e inmediatamente se observaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus Evolution VF BX51 equipado con filtro de excitación de 590 nm) (Figura 15).

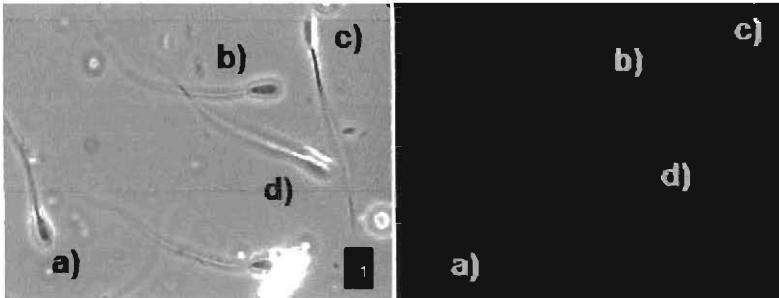


Figura 15. Técnica de inmunoensayo de marcaje espermático con ubiquitina: 1. Espermatozoides ubiquitinados observados con microscopio óptico (100x). 2. Mismos espermatozoides ubiquitinados observados con microscopio de fluorescencia(100x). Laboratorio Bioquímica de la Reproducción UAM-Xochimilco. Rodríguez Lozano, 2010.

El mismo procedimiento se realizó a los espermatozoides después de ser capacitados *in vitro*.

#### Capacitación espermática

Para inducir la capacitación *in vitro* los espermatozoides se lavaron para retirar restos de criopreservantes y posteriormente se colocaron en medio Sperm-Talp (Cuadro 2) durante 20 minutos a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> (Parrish *et al.*, 1986).



TALP		SPERM TALP	
NaCl	107 x 10 <sup>-4</sup> mM	Talp	38 ml
KCl	15 x 10 <sup>-5</sup> mM	BSA Fract V	240 mg
NaHCO <sup>3</sup>	624 x 10 <sup>-5</sup> mM	Piruvato de sodio	2 ml
NaH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> O	85 x 10 <sup>-7</sup> mM	Gentamicina	0.4 mg
C <sup>3</sup> H <sup>17</sup> N <sup>2</sup> O <sup>4</sup> SNa	228.58 mM	Heparina	25 mg/ml
CaCl <sup>2</sup>	49 x 10 <sup>-6</sup> mM		
MgCl <sup>2</sup>	64 x 10 <sup>-6</sup> mM		
H <sup>2</sup> O	39.616 ml		
descarbonizada			

Cuadro 2. Composición del medio de capacitación espermática (Parish *et al.*, 1986).

El porcentaje de espermatozoides capacitados se cuantificó por la tinción de clortetraciclina (CTC) (Figura 16) (Green *et al.*, 1994), en un microscopio de fluorescencia (Olympus Evolution VF BX51 equipado con filtro de excitación de 590 nm). Se realizó SUTI después de la capacitación espermática para obtener el número de espermatozoides capacitados ubiquitinados (Sutovsky *et al.*, 2000).

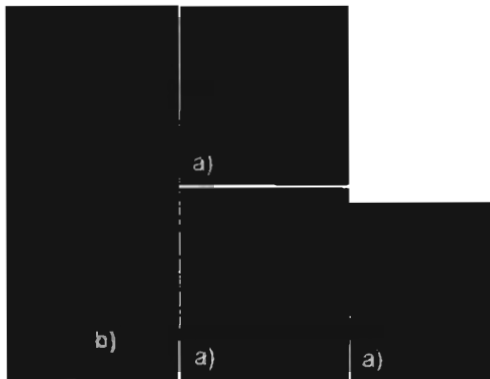


Figura 16. Tinción con CTC en espermatozoides de bovino. a) Espermatozoides CTC positivos: La banda oscura en la región post-ecuatorial indica que se ha llevado a cabo la remoción de Ca<sup>+</sup> en esa zona evidenciando el proceso de capacitación espermática. b) Espermatozoides CTC negativos. Laboratorio Bioquímica de la Reproducción UAM-Xochimilco. Rodríguez Lozano, 2010.

## Fertilización *in vitro*

La fertilización *in vitro* se realizó en el "Laboratorio de Embriología Experimental" del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Los procedimientos que se llevaron a cabo para esta técnica están basados en el seguimiento de protocolos establecidos para su estandarización (Parrish *et al.*, 1986; Hernández-Ledezma *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Monterroso *et al.*, 1995; Brocas *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1997; Paula-Lopes *et al.*, 1998).

Se obtuvieron 546 ovarios recuperados directamente de la canal de hembras sacrificadas en rastro, se colocaron en solución de NaCl al 0.9% adicionada con penicilina y estreptomycinina a 32°C. Al llegar al laboratorio los ovarios fueron lavados y se seleccionaron para el experimento sólo los que presentaban actividad folicular (501 ovarios aptos), desechándose los estáticos o con patologías. Se aspiraron los folículos que presentaban un diámetro de 2-8 mm, del líquido obtenido se recuperaron bajo microscopio estereoscópico (40x) los complejos cúmulo-ovocito (CCO's), alcanzando un total de 1496 CCO's, de los cuales se utilizaron únicamente los CCO's calidad 4 y 5 (1240); la selección se realizó con base en las características de las células del cúmulo que rodeaban a los ovocitos, ya que los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocisto que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiada (Momozawa y Fukuda, 1995). Los ovocitos seleccionados fueron colocados en medio de

maduración (TCM-199) con 5 % de CO<sub>2</sub> a 39°C y 90% de humedad durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se evaluaron los ovocitos y se eligieron los que presentaban una maduración óptima con base en la apariencia de las células del *cumulus* (expandidas) y a la expulsión del primer cuerpo polar (Figura 17).

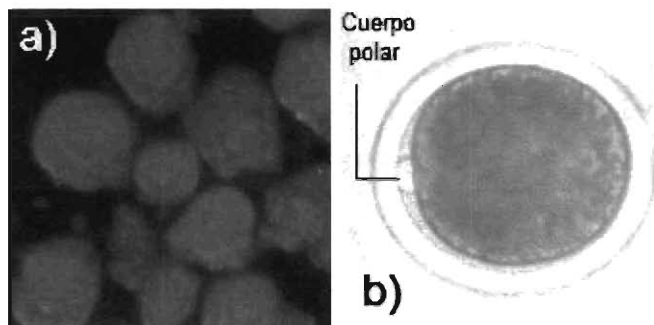


Figura 17. Ovocitos de bovino madurados *in vitro*. a) Expansión de las células que rodean al ovocito. b) Ovocito que ha expulsado el primer cuerpo polar. Laboratorio de embriología experimental U de G, Rodríguez Lozano y Roa Vidal, 2010.

Estos ovocitos fueron transferidos a medio de fertilización y se pusieron en contacto con los espermatozoides a una concentración de 100,000 espermatozoides/ovocito. Los espermatozoides utilizados se obtuvieron al descongelar las pajillas seminales de toros Normales y ReproMax, que fueron capacitados *in vitro* previamente.

Los ovocitos junto con los espermatozoides se incubaron en condiciones de 5 % de CO<sub>2</sub>, 39°C, 90% de humedad durante 8 horas, pasado el tiempo de incubación los ovocitos fueron lavados para retirar medio y espermatozoides.



Se transfirieron a medio Embriomax y se incubaron en 5 % de CO<sub>2</sub>, 39°C, 90% de humedad durante 48 horas, a este tiempo se llevó a cabo la primer evaluación para constatar que no hubiera contaminación en los medios, está evaluación se realizó por observación con microscopio estereoscópico para determinar si existía presencia de bacterias u hongos que hubieran causado alteraciones en la características visibles de los medios y embriones. A las 72 horas post-fertilización se realizó el conteo de embriones obtenidos de cada pajilla seminal utilizada (Figura 18).

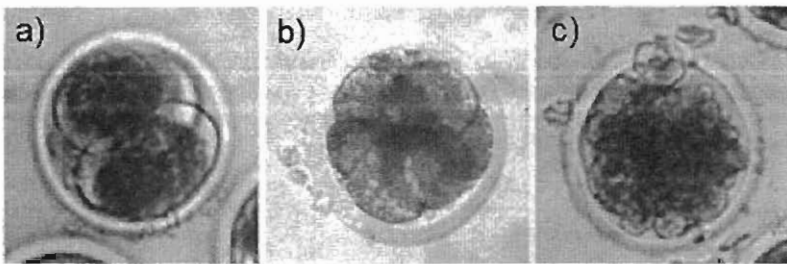


Figura 18. Embriones de bovino. a) Embrión 4 células b) Embrión de 8 células c) Mórula temprana. Laboratorio de embriología experimental. U de G, Rodríguez Lozano y Roa Vidal, 2010.

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con un ANOVA para un modelo lineal general (ProcGLM; SAS, 2007), en el cual se definió como variable dependiente el grado de fertilidad, y como variables independientes: FIV, motilidad post-descongelamiento, motilidad post-capacitación, espermatozoides vivos y muertos, normales, anormales, ubiquitinación post-descongelamiento, ubiquitinación post-

capacitación, capacitados y no capacitados; y se realizó una comparación de medias con la Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) en el casos del SCR.

Las variables que no presentaron normalidad en la distribución de los residuos del modelo fueron transformadas logarítmicamente (concentración y ubiquitinación post-capacitación) y exponencialmente (normales) (Handelsman, 2002).

## VIII. RESULTADOS

A cada muestra de semen descongelada se le realizó un conteo de viabilidad, normalidad, motilidad post-descongelamiento y post-capacitación, porcentaje de espermatozoides ubiquitinados al descongelar y después de ser capacitados y porcentaje de espermatozoides capacitados.

En el Cuadro 3 se muestran los promedios  $\pm$  desviación estándar por semental y por grupo al momento de descongelar la pajilla seminal. Se puede observar que no se encontraron diferencias en motilidad, viabilidad y normalidad entre los sementales evaluados.

Promedios $\pm$ desviación estándar de motilidad, viabilidad y normalidad por semental y grupo al momento de descongelar la pajilla seminal.				
Sementales Normales				
Identificación	Nombre Corto	Motilidad post-descongelación %	Vivos %	Normales %
0200HO05139	Bonaire	80.00 <sup>a</sup> $\pm$ 14.14	72.50 <sup>dc</sup> $\pm$ 4.95	90.50 <sup>a</sup> $\pm$ 2.12
0070HO00969	Rubens	85.00 <sup>b</sup> $\pm$ 7.07	79.00 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.24 <sup>b</sup>	80.00 <sup>b</sup> $\pm$ 8.49
071HO01469	Costeau	80.00 <sup>a</sup> $\pm$ 14.14	74.00 <sup>ac</sup> $\pm$ 1.41	91.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71
0200HO01677	Dolman	77.50 <sup>a</sup> $\pm$ 3.54	76.50 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.71	91.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71
Sementales ReproMax				
0200HO04484	Baculum	85.00 <sup>b</sup> $\pm$ 7.07	73.00 <sup>c</sup> $\pm$ 11.31	88.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71
0200HO01584	Frosty	75.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71 $\pm$	78.00 <sup>b</sup> $\pm$ 1.41	88.50 <sup>a</sup> $\pm$ 2.12
0072HO01758	Lheros	75.00 <sup>a</sup> $\pm$ 7.07	85.00 <sup>a</sup> $\pm$ 5.66	90.00 <sup>a</sup> $\pm$ 4.24
0200HO05156	Littoral	70.50 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71	77.50 <sup>b</sup> $\pm$ 6.36	85.50 <sup>b</sup> $\pm$ 2.12
Promedios por grupo	Normales	80.63 <sup>a</sup> $\pm$ 3.15	75.50 <sup>a</sup> $\pm$ 2.86	88.38 <sup>a</sup> $\pm$ 5.60
	ReproMax	76.50 <sup>a</sup> $\pm$ 6.10	78.38 <sup>a</sup> $\pm$ 4.96	88.13 <sup>a</sup> $\pm$ 1.89

Cuadro 3. Promedio de las dos pajillas utilizadas de cada semental y promedios por grupo Normales y ReproMax, para viabilidad, morfología y motilidad masal al ser descongelados. Medias con literales diferentes son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

No se encontraron diferencias entre los sementales evaluados en el porcentaje de espermatozoides que llevaron a cabo la capacitación; en cuanto a la motilidad después de la capacitación *in vitro* tampoco se observaron diferencias (Cuadro 4).

Promedios $\pm$ desviación estándar de capacitación y motilidad post-capacitación por semental y grupo.			
Sementales Normales			
Identificación	Nombre Corto	Capacitación %	Motilidad post-capacitación %
0200HO05139	Bonaire	83.77 <sup>a</sup> $\pm$ 1.85	92.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.54
0070HO00969	Rubens	78.17 <sup>b</sup> $\pm$ 7.30	92.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.54
071HO01469	Costeau	76.43 <sup>b</sup> $\pm$ 0.34	92.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.54
0200HO01677	Dolman	90.00 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00	84.93 <sup>a</sup> $\pm$ 3.64
Sementales ReproMax			
0200HO04484	Bacculum	88.08 <sup>a</sup> $\pm$ 7.16	92.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.54
0200HO01584	Frosty	81.65 <sup>b</sup> $\pm$ 6.45	92.50 <sup>b</sup> $\pm$ 3.54
0072HO01758	Lheros	88.87 <sup>a</sup> $\pm$ 6.71	87.50 <sup>a</sup> $\pm$ 3.54
0200HO05156	Littoral	83.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.32	87.50 <sup>a</sup> $\pm$ 3.54
Promedios por grupo	Normales	80.82 <sup>a</sup> $\pm$ 4.16	91.88 <sup>a</sup> $\pm$ 1.25
	ReproMax	85.54 <sup>a</sup> $\pm$ 3.50	90.00 <sup>a</sup> $\pm$ 2.89

Cuadro 4. Promedio de las dos pajillas utilizadas de cada semental y promedios por grupo Normales y ReproMax, para motilidad masal después de ser capacitados y porcentaje de espermatozoides que fueron capacitados *in vitro*. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados no se encontraron diferencias entre los sementales después de descongelar la pajilla seminal y tampoco después de la capacitación espermática (Cuadro 5).

Promedios $\pm$ desviación estándar de espermatozoides ubiquitinados por semental y grupo al momento de descongelar la pajilla seminal y después de ser capacitados <i>in vitro</i> .			
Sementales Normales			
Identificación	Nombre Corto	Ubiquitinación post-descongelación %	Ubiquitinación post-capacitación %
0200HO05139	Bonaire	46.20 <sup>b</sup> $\pm$ 0.32	49.55 <sup>a</sup> $\pm$ 6.20
0070HO00969	Rubens	38.40 <sup>a</sup> $\pm$ 15.60	39.01 <sup>b</sup> $\pm$ 9.76
071HO01469	Costeau	45.73 <sup>b</sup> $\pm$ 7.82	37.41 <sup>b</sup> $\pm$ 6.20
0200HO01677	Dolman t	41.56 <sup>a</sup> $\pm$ 27.65	52.70 <sup>a</sup> $\pm$ 11.67
Sementales ReproMax			
0200HO04484	Baculum	42.76 <sup>a</sup> $\pm$ 10.85	43.12 <sup>a</sup> $\pm$ 1.59
0200HO01584	Frosty	54.84 <sup>b</sup> $\pm$ 2.51	55.51 <sup>b</sup> $\pm$ 14.63
0072HO01758	Lheros	41.02 <sup>a</sup> $\pm$ 0.29	37.63 <sup>a</sup> $\pm$ 0.36
0200HO05156	Littoral	60.08 <sup>b</sup> $\pm$ 14.26	43.95 <sup>a</sup> $\pm$ 1.12
Promedios por grupo	Normales	42.97 <sup>a</sup> $\pm$ 3.69	44.67 <sup>a</sup> $\pm$ 7.59
	ReproMax	49.68 <sup>a</sup> $\pm$ 9.27	45.05 <sup>a</sup> $\pm$ 7.51

Cuadro 5. Promedio de las dos pajillas utilizadas de cada semental y promedios por grupo Normales y ReproMax, para el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados al ser descongelados y después de ser capacitados *in vitro*. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En el Cuadro 6 se muestran los promedios  $\pm$  desviación estándar por semental y por grupo de fertilidad *in vitro*, se encontraron diferencias entre los sementales dentro del grupo pero al comparar los promedios de ambos grupos no se encontraron diferencias.

Promedios $\pm$ desviación estándar de fertilidad <i>in vitro</i> por semental y grupo.			
Sementales Normales			
Identificación	Nombre Corto	Promedio FIV % por semental	Promedio Fiv% por grupo
0200HO05139	Bonaire	21.87 <sup>b</sup> $\pm$ 11.76	
0070HO00969	Rubens	35.26 <sup>a</sup> $\pm$ 4.11	
071HO01469	Costeau	29.00 <sup>a</sup> $\pm$ 11.21	
0200HO01677	Dolman	30.62 <sup>a</sup> $\pm$ 1.04	29.85 <sup>a</sup> $\pm$ 8.03
Sementales ReproMax			
0200HO04484	Bacculum	37.89 <sup>b</sup> $\pm$ 14.84	
0200HO01584	Frosty	25.87 <sup>a</sup> $\pm$ 17.83	
0072HO01758	Lheros	26.01 <sup>a</sup> $\pm$ 9.49	
0200HO05156	Littoral	26.67 <sup>a</sup> $\pm$ 8.45	

Cuadro 6. Promedios  $\pm$  la desviación estándar de fertilidad *in vitro* por semental y por grupo. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En el Cuadro 7 se muestran las correlaciones encontradas entre las variables evaluadas de las pajillas seminales de toros Normales y Repromax.

Se encontró una correlación entre Motilidad post-descongelamiento y Motilidad post-capacitación porque una motilidad espermática adecuada al descongelar la pajilla es indicativo de células aptas para llevar a cabo la capacitación espermática y así poder activar correctamente la hipermotilidad característica de este proceso.

Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables evaluadas $p < 0.005$ .			
	Motilidad post-capacitación	Espermatozoides Muertos	Anormales
Motilidad post-descongelamiento	$r=0.76896$ $p=0.0005$		
Espermatozoides Vivos Normales		$r=-0.99535$ $p < 0.0001$	$r=-0.82629$ $p < 0.0001$

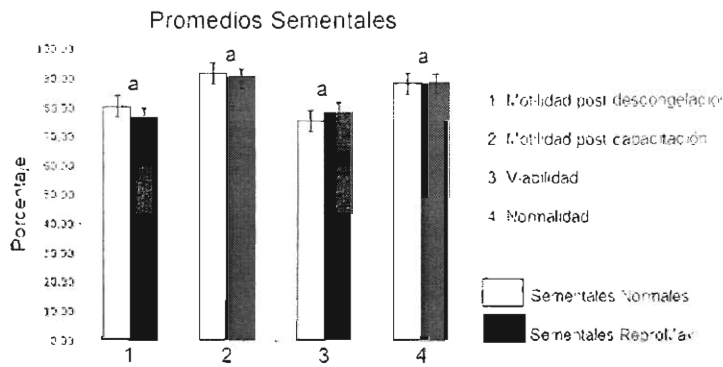
Cuadro 7. Correlaciones encontradas entre las variables evaluadas.

Basándonos en las evaluaciones del SCR (Tasa de Concepción de Toro) entre los sementales Normales y ReproMax analizados en este trabajo, pudimos observar que aun cuando no existe una diferencia estadística, si hay una superioridad numérica para los toros ReproMax ( $2.58 \pm 1.29$ ) frente a los Normales ( $1.68 \pm 0.79$ ). Probablemente esta diferencia numérica podría ser estadística con un mayor número de muestras analizadas para cada grupo (Cuadro 8).

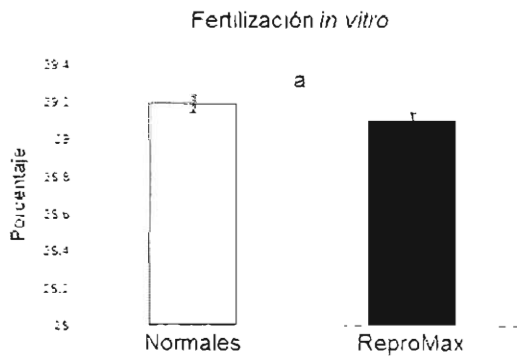
Evaluaciones en el SCR.			
Sementales Normales		Sementales ReproMax	
Nombre corto	SCR	Nombre corto	SCR
Rubens	1.40	Frosty	3.30
Bonair	0.70	Lheros	4.00
Costeau	2.10	Littoral	1.20
Dolman	2.50	Baculum	1.80
Promedios $\pm$ Desviación estándar	$1.68 \pm 0.79$		$2.58 \pm 1.29$

Cuadro 8. Evaluaciones en el SCR de cada semental utilizado.

Los resultados son presentados (en las gráficas 1-4), en donde es posible observar los promedios de cada grupo con sus desviaciones estándar para las variables evaluadas.

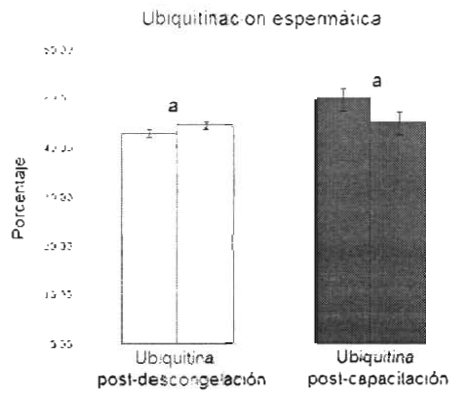


Gráfica 1. Promedios de sementales para viabilidad, normalidad y motilidad al descongelar y después de capacitar. No se observan diferencias significativas entre los dos grupos de sementales en las evaluaciones de motilidad masal al descongelar y después de la capacitación, viabilidad y normalidad.

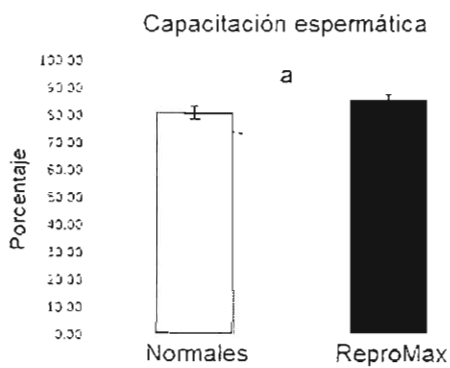


Gráfica 2. En los porcentajes de fertilidad *in vitro* no se observan diferencias significativas entre los dos grupos de sementales.





Gráfica 3. Porcentajes de ubiquitinación espermática, en ninguno de los dos tiempos evaluados se observan diferencias significativas entre los dos grupos de seminales.



Gráfica 4. Porcentajes de capacitación espermática, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de seminales.

En resumen los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje de ubiquitinación espermática entre seminales Normales ( $42.97 \pm 3.69$ ;  $44.67 \pm 7.59$ ) y ReproMax ( $49.68 \pm 9.27$ ;  $45.05 \pm 7.51$ ) de muestras descongeladas y capacitadas

respectivamente. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de fertilidad *in vitro* entre sementales Normales ( $29.85 \pm 8.03$ ) y ReproMax ( $28.75 \pm 12.40$ ).

## IX. DISCUSIÓN

La clasificación de sementales normales y altamente fértiles (ReproMax) que realiza la compañía comercializadora de semen SEMEX Alliance, supone diferencias importantes en la fertilidad *in vivo* de los sementales y por ende se podría pensar que también las hubiera en la fertilidad *in vitro*. Con los resultados de este trabajo pudimos constatar que bajo condiciones *in vitro* no existen diferencias en fertilidad entre estos dos tipos de toros y tampoco hubo diferencias en el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados, por lo cual no podemos contestar si el mayor porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en una muestra de semen está relacionado con su menor fertilidad tal como se plantea en la hipótesis.

Las evaluaciones que realiza SEMEX Alliance a cada semental para su calificación no son publicadas y aún cuando se les solicitaron por diferentes medios no dispusimos de ellas, por lo cual no pudimos verificar la superioridad en fertilidad de los sementales clasificados por esta compañía como ReproMax; debido a esto se recurrió a la evaluación de la Tasa de Concepción de Toro (SCR) de cada semental y así se pudo observar que hay una superioridad numérica para los toros ReproMax (x 2.58) frente a los Normales (x 1.68). El SCR registra la tasa de concepción y utiliza múltiples servicios por

lactancia (hasta siete); para mejorar la confiabilidad, dicha evaluación utiliza lo que denomina un "período extendido de toro por servicio", lo que significa que estima componentes que afectan la fertilidad de los toros independientemente y luego formula la predicción como la suma de los componentes; las evaluaciones se expresan como desviaciones de la media general. Para ser incluido en el SCR, un toro debe tener un estatus de inseminación artificial activo, no ser mayor de 13 años de edad y en los toros Holstein reunir como mínimo 300 inseminaciones totales, 100 inseminaciones en los 12 meses más recientes y al menos 10 hatos (ABS México).

Esta falta de diferencias en cuanto a fertilidad entre los grupos analizados puede indicar que la clasificación superior aplicada a la fertilidad *in vivo* que establece la compañía SEMEX, no está relacionada con características seminales y capacidad fertilizante *in vitro* o bien que la detección de espermatozoides ubiquitinados no sea una herramienta útil para predecir el potencial fertilizante en sementales con grados de fertilidad *in vivo* muy cercanos y únicamente sea útil para comparar machos fértiles contra infértiles o con serios problemas de fertilidad tal como proponen varios estudios (Sutovsky *et al.*, 2000; Sutovsky *et al.*, 2001a; Sutovsky *et al.*, 2001b; Sutovsky *et al.*, 2003); aunque es posible descartar que la falta de diferencias pueda estar asociado al reducido tamaño de la muestra.

En las muestras de los sementales de Tizayuca no se encontraron diferencias en los porcentajes de ubiquitinación en los espermatozoides frescos ( $60.79 \pm 7.23\%$ ) y descongelados ( $60.76 \pm 5.12\%$ ), lo cual concuerda con Ozanon *et al.*, (2005) que tampoco encuentran diferencias al trabajar con semen fresco y

descongelado de hombres, lo que indica que probablemente el proceso de congelación-descongelación no involucra alteraciones en las proteínas de la membrana plasmática.

Como ya se dijo, no hubo diferencias en el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados en muestras descongeladas de sementales Normales ( $42.97 \pm 3.69\%$ ) y ReproMax ( $49.68 \pm 9.27\%$ ). Los porcentajes de ubiquitinación que nosotros detectamos en las muestras analizadas de toros Normales y ReproMax son superiores a los reportados por otros autores en muestras descongeladas de diferentes especies; 22.88% en hombres donantes fértiles (Sutovsky *et al.*, 2001a); y de 31.21% en equinos fértiles (Sutovsky *et al.*, 2003).

La información que se tiene sobre el proceso de ubiquitinación en los espermatozoides es controversial, la mayoría de las evidencias apuntan a una relación positiva entre porcentaje de espermatozoides ubiquitinados e infertilidad ó malformaciones espermáticas (Sutovsky *et al.*, 2001a; Sutovsky *et al.*, 2001b; Sutovsky *et al.*, 2003; Sutovsky *et al.*, 2004), sin embargo hay quien establece que existe una correlación positiva entre el mayor porcentaje de espermatozoides ubiquitinados y mejor calidad espermática (Muratori *et al.*, 2005).

En muestras de semen frescas y congeladas de toro, humano y mono *Rhesus* obtenidas por eyaculación, disección del epidídimo y electro eyaculación se reportó que los espermatozoides anormales son ubiquitinados durante su paso por el epidídimo (55-70% en la cabeza epididimal y 5.2-5.3% en la cauda del epidídimo) (Sutovsky *et al.*, 2001b). La detección de ubiquitina por inmunofluorescencia y citometría de flujo en espermatozoides eyaculados de hombres

infértiles y fértiles demostraron que la ubiquitina se encontró en gran cantidad en espermatozoides morfológicamente anormales (Sutovsky *et al.*, 2001a). En 2004 Sutovsky *et al.*, también reportaron una correlación negativa entre ubiquitinación espermática (18.0% en donadores fértiles y 20.0% en pacientes de clínicas de infertilidad), concentración ( $141.0 \pm 40.8 \times 10^6/\text{ml}$  en donadores y  $122.2 \pm 89.0 \times 10^6/\text{ml}$  en pacientes) y motilidad ( $62.7 \pm 5.3\%$  en donadores y  $63.7 \pm 15.4\%$  en pacientes); y una correlación positiva con morfología anormal ( $24.3 \pm 3.3\%$  en donadores y  $42.0 \pm 11.4\%$  en pacientes) donde además encuentran que hombres fumadores y expuestos a solventes tienen elevado el número de espermatozoides ubiquitinados (19.7% y 25.6% respectivamente).

Sutovsky *et al.*, (2003) compararon 3 sementales equinos fértiles y uno subfétil por un patologia originada por una neoplasia en el testiculo, y reportaron una mayor ubiquitinación de los espermatozoides del semental subfétil además de espermatozoides anormales fuertemente ubiquitinados en los cuatro sementales; además proponen un punto de control de calidad espermática en el epidídimo y sugieren que si ahí se une la ubiquitina a los espermatozoides con anomalías morfológicas es posible que algunos escapen a la fagocitosis y sea esta la razón por la cual son encontrados en el eyaculado; pero en este experimento podría pensarse que el semental subfétil presentó mayor ubiquitinación espermática debido a la patologia que sufría más que a su grado de fertilidad.

Contrario a lo anterior Muratori *et al.*, (2005) reportan correlaciones positivas significativas entre ubiquitinación espermática y

concentración, motilidad total, motilidad progresiva y morfología normal, esto al realizar el conteo de células espermáticas ubiquitinadas en muestras de humanos (pacientes de clínicas de fertilidad), en las que fueron separados los espermatozoides de otros componentes celulares presentes en el eyaculado (principalmente residuos citoplasmáticos y cuerpos M540 llamados así por su tinción con merocianina, la naturaleza de estos cuerpos no se conoce por completo), sin embargo al realizar la detección de espermatozoides ubiquitinados en el eyaculado completo también encuentran una correlación negativa entre ubiquitinación y calidad seminal, tal como lo reportan varios estudios (Sutovsky *et al.*, 2000; Sutovsky *et al.*, 2001a; Sutovsky *et al.*, 2001b), lo cual indica que la ubiquitinación ocurre en los espermatozoides y en otros componentes del eyaculado; por lo que concluyen que la ubiquitinación espermática puede tener un significado biológico que no ha sido reconocido e incluso sugieren que al encontrar una relación positiva entre parámetros seminales aceptables y porcentajes de espermatozoides ubiquitinados ésta última podría tener un papel positivo en la función espermática (Muratori *et al.*, 2005).

Baska *et al.*, (2008) realizaron un experimento para detectar ubiquitina en espermatozoides de bovino, fluido y tejido epididimal, con los resultados obtenidos concluyen que el mecanismo de degradación proteica por el sistema ubiquitina-proteosoma no está limitado al ambiente intracelular y puede ser encontrado de forma extracelular; además apoyan la hipótesis de la existencia de un punto de control de calidad espermática en el epidídimo mediado por este sistema de degradación proteica. Es importante mencionar que 15

años antes Lippert *et al.*, (1993) habían reportado la presencia de ubiquitina extracelular en el plasma seminal humano, y ahora se conoce que está presente en otros sistemas celulares. Además ha sido encontrado de manera extracelular en fluido alveolar, plasma sanguíneo, neoplasias y líquido folicular ovárico (Sixt y Dahlmann, 2008).

Se ha propuesto otra hipótesis para explicar la ubiquitinación espermática, la cual consiste en que este proceso está involucrado en el control de la herencia mitocondrial en mamíferos; se ha observado que la ubiquitinación de la mitocondria del espermatozoide ocurre durante la espermatogénesis con la unión de moléculas de ubiquitina a proteínas de la membrana mitocondrial prohibitina principalmente; la reactividad de los espermatozoides de bovino y mono Rhesus a la ubiquitina, se enmascara durante el paso del espermatozoide por el epididimo gracias a un enlace disulfuro entre una proteína rica en selenio (SMCP) presente en la cápsula mitocondrial y una proteína llamada kinesina de cadena ligera (KLCt), pero la reactividad a la ubiquitina es restaurada y amplificada después de la fertilización donde se pierde el enlace disulfuro que la "ocultaba" para que en la etapa de pre-implantación del embrión sea reconocida y destruida por la maquinaria proteolítica del citoplasma del ovocito (Sutovsky *et al.*, 2000).

Esta hipótesis acerca de la eliminación del ADN mitocondrial (ADNmt) paterno se ha sobrepuesto a otras, tales como: la dilución del ADNmt basada en la relación teóricamente alta de las mitocondrias maternas frente a las paternas (1:1000) (Smith y Alcivar, 1993), pero esta hipótesis no explica por qué en cruza inter-especie en ratones si se

hereda ADN mitocondrial paterno (Gyllensten *et al.*, 1991; Kaneda *et al.*, 1995; Shitara *et al.*, 1998), por lo que además se ha aclarado que es un mecanismo especie-específico; la teoría del daño oxidativo sugiere que las mitocondrias de los espermatozoides son reconocidas por los ovocitos debido al daño que sufren durante su paso por el tracto genital femenino, pero en fertilización *in vitro* ha sido posible observar que este daño es mínimo (a pesar de que es sabido que el ADNmt es susceptible a mutagénesis por especies oxígeno reactivas) (Aitken, 1995) y por lo tanto la eliminación de las mitocondrias paternas no es claramente explicado por esta hipótesis. Otra razón por la cual toma especial importancia la destrucción de la prohibitina mitocondrial es la capacidad que tiene esta proteína para bloquear la entrada a la fase de síntesis de ADN o fase S del ciclo celular del embrión (Nuell *et al.*, 1991). La liberación de prohibitina en el citoplasma del ovocito podría impedir el desarrollo de los pronúcleos y la división embrionaria (Berger *et al.*, 1998); por lo que su rápida degradación protege al embrión del efecto antiproliferativo (Winston *et al.*, 2003).

Para que un espermatozoide alcance la capacidad fertilizante requiere de una serie de procesos fisiológicos como son la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal; el primero ocurre en el epidídimo, el segundo y el tercero en el tracto reproductor de la hembra (Yanagimachi, 1994). La capacitación espermática se caracteriza por una serie de cambios a nivel de la membrana plasmática como son: remoción gradual o alteración de glicoproteínas, disminución del contenido de colesterol y cambios en



la distribución y composición de fosfolípidos de la membrana (Daleke, 2003; Rathi *et al.*, 2003).

Durante la eyaculación algunos componentes del plasma seminal (proteínas principalmente), se fijan a la superficie del espermatozoide, estos componentes se denominan factores descapacitantes y actúan bloqueando receptores, grupos funcionales, enzimas y canales de intercambio iónico (Yanagimachi, 1994); estos factores deben ser eliminados o reacomodados durante la capacitación espermática entre otras cosas para dejar expuestos los receptores a progesterona ( $P_4$ ) (Chen *et al.*, 1998), hormona que juega un papel importante en el proceso de fertilización (Baldi *et al.*, 1995), por lo que es factible pensar que el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados podría variar durante la capacitación para favorecer esta eliminación o remodelación de proteínas. Por lo anterior esperábamos encontrar una diferencia entre el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados de las muestras descongeladas ( $46.32 \pm 4.74\%$  promedio de ambos grupos) y después del proceso de capacitación ( $44.86 \pm 0.27\%$  promedio de ambos grupos), sin embargo no fue así. Tampoco existieron diferencias entre los espermatozoides descongelados ( $60.76 \pm 5.12\%$ ) y capacitados ( $60.87 \pm 4.79$ ) de los toros de Tizayuca, lo que parece indicar que la eliminación y remodelación de proteínas en la membrana plasmática del espermatozoide no involucra de manera importante esta vía de degradación proteica; debido a lo cual puede sugerirse que la proteólisis durante la capacitación espermática se da por mecanismos diferentes al sistema ubiquitina-proteosoma como puede ser la vía citosólica (peroxidasas solubles) (Cuervo, 2004).

En el presente estudio no se obtuvieron diferencias en la fertilidad *in vitro* entre los dos grupos de sementales evaluados, pero este resultado puede estar asociado a un tamaño de muestra reducido, dado que la variable analizada es binomial por lo que requiere grupos de datos numerosos para detectar diferencias.

La fertilización *in vitro* es un procedimiento originalmente desarrollado como una alternativa para aumentar la producción de embriones (Herradón *et al.*, 2007) por lo que los gametos son mantenidos en condiciones ambientales óptimas además de proporcionarles fuentes de energía y proteínas lo más parecidas a las que participan en el desarrollo *in vivo* durante todo el procedimiento (Mucci *et al.*, 2006).

Desde 1981, año en el que nació el primer ternero procedente de un embrión producido *in vitro* esta técnica ha experimentado en la especie bovina una evolución considerable (Brackett *et al.*, 1982); pero a pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorar la eficiencia de esta técnica, continúa teniendo un bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%; este es el promedio de éxito a nivel mundial en la fertilización *in vitro* (Herradón *et al.*, 2007) y cabe destacar que el porcentaje de embriones obtenidos durante nuestro experimento ( $29.30 \pm 0.78$ ) es muy cercano, pese a que se utilizaron ovocitos provenientes de hembras de desecho.

En cuanto a los espermatozoides, los primeros trabajos exitosos sobre fecundación *in vitro* en bovinos se lograron utilizando espermatozoides capacitados *in vivo* lo que ha sido reemplazado por

los sistemas de capacitación *in vitro*; a pesar que el semen criopreservado tiene menor tiempo de sobrevivencia en cultivo con relación a los espermatozoides eyaculados es de mayor utilidad trabajar con las muestras congeladas y descongeladas ya que por una parte está su fácil utilización en el momento adecuado, como también la conveniencia de obtener herencia paterna específica y selección de los reproductores (Hanada y Nagase, 1981).

La técnica de fertilización *in vitro* fue utilizada en este experimento con la finalidad de eliminar en lo posible el factor hembra en el proceso de fertilización y comparar a los dos grupos de sementales con supuesta diferencia en su fertilidad.

## X. CONCLUSIONES

1. Los espermogramas realizados y la fertilidad *in vitro* no indican diferencias entre los dos grupos de sementales lo cual puede deberse al reducido número de muestra o bien a otras características seminales no previstas en este estudio
2. La detección de espermatozoides ubiquitinados no es una técnica útil para diferenciar sementales cuando se comparan animales con grados de fertilidad cercanos.
3. La ubiquitinación espermática no tiene relación con ninguno de los parámetros evaluados en el espermograma.
4. Un alto porcentaje de espermatozoides ubiquitinados no tiene relación con la capacidad fertilizante.

5. La degradación de proteínas que ocurre en la remodelación de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, al parecer no involucra de manera importante al sistema ubiquitina-proteosoma.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A. y Allamaneni, S. (2005): Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina *Rev Int Androl* 3(1):31-37.

Aitken, R., Paterson, M., Fisher, H. y Van Duim, M. (1995): Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025.

Aitken, R. (1995): Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7:659-668.

Aitken, R., Irvine, D. y Wu, F. (1991): Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164:542-551.

Ainsworth, C. (2005): The secret life of sperm. *Nat* 436:770-771.

Albarrán, R., Rule, M. y Hernández, E. (2005): Los gametos: células reproductoras de los mamíferos. *El Manual Moderno México*.

Almeida-Rodríguez, F., Cota, A., Anchondo, A., Sánchez, B. y Jiménez, J. (2008): Capacitación espermática inducida por la conservación del semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 42(4):399-406.

Amann, R. y Hammerstedt, R. (1980): Validation of a system for computerized measurements of spermatozoa velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod* 23:647.

Amann y Picket (1987): Principles of cryopreservation and and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7:145-171.

Arrazola, A. (1994): Biología de la membrana celular. *Nefrol* 14(4):418-426.

Aurich, C. (2005): Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 89:65-75.

Baarends, W., Roest, H. y Grootegoed, A. (1999): The ubiquitin system in gametogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151:5-16.

Baldi, E., Krausz, C., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Maggi, M. y Forti, G. (1995): Actions of progesterone on human sperm: a model of non-genomic effects of steroids. *Mol Biol* 53:199-203.

Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M. y Forti, G. (1991): Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* 12:323-330.

Barth, A. (1994): Evaluación de semen congelado. Manual del I<sup>er</sup>. Curso de Evaluación de Semen. Río Cuarto, Córdoba, pág. 74.

Barroso, V., Karchmer, K., Castelazo, M., Carballo, M. y Kably, A. (2002): Changes in mitochondrial membrane potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatic fractions. *Ginecol Obstet Mex* 270:182-189.

Baska, K., Manandhar, G., Feng, D., Agca, Y., Tengowski, M., Sutovsky, M., Yi, Y. y Sutovsky, P. (2008): Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol* 215:684-696.

Blackmore, P. (1993): Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca<sup>2+</sup> influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5:531-538.

Bebington, C., Doherty, F. y Fleming, S. (2001): The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. *Hum Reprod* 7:102-111.

Bebington, C., Bell, S., Doherty, F., Fazleabas, A. y Fleming, S. (1999): Localization of ubiquitin and ubiquitin cross-reactive protein in human and baboon endometrium and decidua during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 60:920-928.

Bellido, P. (1997): Mecanismo de fertilización. Tema de revisión. *Ginecol Obstet* 43(3):183-190.

Berger, K. y Yaffe, M. (1998): Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18:4043-4052.

Biswas, S., Ferguson, K., Stedronska, J., Boffoe, G., Mansfield, M. y Koskab. N. (1978): Fructose and hormone levels in semen: Their correlation with sperm counts and motility. *Fertil Steril* 30:200-204.

Boon, J. y Smith, B. (2002): Chemical control of phospholipids distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* 22:251-281.

Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, J., Evans, F. y Dressel, M. (1982): Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol Reprod 27:147-158.

Brocas, C., River, R., Paula-Lopes, F., McDowell, L., Calhoun, M., Staples, C., Wilkinson, N., Boning, A., Chenoweth, P. y Hansen, P. (1997): Deleterious actions of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes and embryos. Biol Reprod 57, 901-907.

Carrell, D., Liu, L., Peterson, C., Jones, K., Hatasaka, H. y Erickson, L. (2003): Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch Androl 49:49-55.

Cascales, M. (2005): Vía de la ubiquitina-proteosoma. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia 71:45-82.

Catena, M. y Cabodevila, J. (1999). Trabajo presentado en el Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA), Tandil, 6 de agosto de 1999. Taurus, 1(3):18-31.

Chavarría, M., Mercado, E., Rosado, A. y Reyes, A. (1996): Simultaneous determinations of  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  and  $H^+$  in human spermatozoa incubated under capacitating conditions. Mol Androl 8:153-169.

Chen, H., Sun, J. y Zhang, Y. (1998): Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. J Biol Chem 273:13165-13169.

Ciechanover, A., Orian, A. y Schwartz, J. (2000): The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: model of action and clinical implications. J Cell Biochem 77 (Suppl. 34), 40-51.



Cisneros, P., Saltijeral, J. y Sabás, A. (2004): La sustentabilidad de la ganadería bovina en la costa de Oaxaca. Programa de Maestría en Sistemas de Producción Animal Sustentable. UAG., Acapulco, Guerrero.

Cuervo, A. (2004): Autophagy: Many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263:55-72.

Dacheux, J.L., Luc, J. y Dacheux, F. (2003): Contribution of epididimal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61:7-17.

Daleke, D. (2003): Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44(2):233-242.

Darszon, A. (2007): Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotec* 14:29-42.

De Jarnett, M., Barnes, D. y Marshall, C. (2000): Effects of pre and post-thaw thermal insult on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenol* 53:1225:1238.

Demott, R. y Suárez, S. (1992): Hiperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46(5):779-785.

Den Daas, N. (1992): Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 28:97-94.

Dixon, D., Pruski, A., Dixon, L. y Jha, A. (2002): Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *J Oxford* 17(6):495-507.

Drazynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M. (1975): Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 90:411-428.

Drisdell, R., Mack, S., Anderson, R. and Zaneveld, L. (1995): Purification and partial characterization of acrosome reaction inhibiting glycoprotein from human seminal plasma. *Biol Reprod* 53:201-208.

Duran, E., Morshedi, M. y Taylor, S. and Oehninger, S. (2002): Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 17:3122-3128.

Duty, S., Singh, N., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C. y Huang, T. (2002): Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod* 17:1274-1280.

Eaglesome, M., Garcia, M. y Stewart R. (1992): Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1 *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet Bull* 62(8):743-769.

Ebensperger, C. y Barros, C. (1984): Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gam Res* 9:387-397.

Edwards, J., Ealy, A., Monterroso, V. y Hansen, P. (1997): Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 48:25-33.

Etlinger, J. y Goldberg, A. (1977): A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci* 74:54-58.

Evenson, D., Jost, L., Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, E. y Purvis, K. (1999): Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14:1039-1049.

Fernández, J., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vazquez, R. y Alvarez, J. (2003): The sperm chromatin dispersion test: A simple method for determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24(1):59-66.

Fraser, L. (1994): Na<sup>+</sup> requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int Rev Cytol* 149:1-46.

Fraser, L. (1998): Interaction between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol Reprod Dev* 51(2):193-202.

French, P. y Nebel, R. (2003): The simulated economic cost of extended calving intervals in dairy herds and comparison of reproductive Management programs. *J Dairy Sci.* 86(Suppl.1):54.

Flesch, F. y Barend, M. (2000): Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Act* 1469:197-235.

Fusi, M., Lorenzetti, I., Vignali, M. y Bronson, R. (1992): Sperm surface proteins after capacitation. *J Androl* 13:488-497.

Gadella, B. (1999): Scrambling of phospholipid asymmetry in the apical plasma membrane of acrosome-intact boar sperm cells during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 60 (Suppl 1):207.

Gafo, C. y Garde, J. (1994): Métodos de valoración de la capacitación y reacción acrosómica en mamíferos. *Med Vet* 11:201-210.

Gallardo, J. (2004): Situación actual de la producción de leche de bovino en México. Coordinación General de Ganadería Coordinación General de Ganadería SAGARPA. México 2005, Pág.4.

Gonzales, G. (1994): Corrected seminal fructose test. *Arch Androl* 33:17-22.

Gonzales, G., García-Hjarles, M. y Napuri. R. (1998): Corrected seminal fructose levels: Index of secretory activity of seminal vesicles. *Arch Androl* 21:135-142.

Gopalkrishnan, K., Hurkadli, K., Padwal, V. y Balaiah, D. (1999): Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Androl* 31:277-82.

Gorczyza, W., Gong, J. y Darzynkiewics, Z. (1993): Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53:1945-1951.

Green, C., Cockle, S., Watson, P. y Fraser, L. (1994): Stimulating effect of pyroglutamylprolina amide a prostatic TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* (38):215-223.

Guzick, D., Overstreet, J., Litvek, P., Brazil, C., Nakajima, S., Coutifaris, C., Carson, S., Cisneros, P. y Vogel, D. (2001): Comparison of sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345:1388-1393.

Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A. y Wilson, A. (1991): Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nat* 352:255-257.

Hafez, E. y Hafez, B. (2002): Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill Interamericana, 7ª edición.

Handelsman, D. (2002): Optimal power transformation for analysis of sperm concentration and other semen variables. *J Androl* 23(5):629-634.

Harvey, A. (2007): The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98:113-128.

Hellman, B., Vaghef, H. y Bostrom, B. (1995): The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res* 326:123-131.

Hernandez-Ledezma, J., Sikes, J., Murphey, C., Watson, A., Schultz, G., y Roberts, R. (1992): Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 47:374-380.

Herradón, P., Quintela, L., Becerra, J., Ruibal, S. y Fernández, M. (2007): Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-PerúArch. Latinoam Prod Anim 15(1)33:40.

Hershko, A. y Ciechanover, A. (1998): The Ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.

Hershko, A. y Ciechanover, A. (1982): Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu Rev Biochem* 51:335-364.

Hershko, A., Heller, H., Ganoh, D. y Ciechanover, A. (1978): In Protein Turnover and Lysosome Function. Pp 149-169 Academic Press, New York.

Hodjat, M., Akhondi, M., Al-Hasani, S., Mobaraki, M y Sedaghi, M. (2008): Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. *Reprod Biomed* (3):324-330.

Irvine, D. Twigg, J., Gordon, E. Fulton, N., Milne, P. y Aitken, R. (2000): DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21:33-44.

Jesenberger, V. y Jentsch, S. (2002): Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2):112-121.

Jeyendran, R., Van Der Ven, H., Perez, M., Crabo, B. y Zaneveld, L. (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219-228.

Jiménez, I., González, H., Ortiz, R., Herrera, J., García, A., Betancourt, M. y Fierro, R. (2003): Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenol* 59:1171-1180.

Johansson, M., Adolfsson, A., Berg, M., Francis, J., Hogström, L., Janson, P., Sogn, J. y Hellström, A.(2009): Quality of life for couples 4-5.5 years after unsuccessful IVF treatment. *Acta Obstet Gynecol* (26) 1-10.

Jones, R. (2004): Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod* 71(5):1405-1411.

Juhász, J., Nagy, P., Kulcsár, M. y Huszenicza, G. (2000): Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion. *Acta Vet Brno* 69:247-250 Review.

Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Fischer-Lindahl, K. y Yonekawa, H. (1995): Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 92:4542-4546.

Kuypers, A., Lewis, A. y Hua, M. (1996): Determination of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 87(3):1179-1187.

Langlais, J., Roberts, K., Zollinger, M. Plante, L. Chapdelaine, A. y Bleau, G. (1981): Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc Natl Acad Sci* 72:66-70.

Larson, K., DeJonge, C., Barnes, A., Jost, L. y Evenson, D. (2000): Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15:1717-1722.

Lassalle; B. y Testart, J. (1994): Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J Reprod Fertil* 101:703-711.

Leclerc, P. y Kopf, G. (1999): Evidence for the role of heterotrimeric guanine nucleotide-binding regulatory proteins in the regulation of the

mouse sperm adenylyl cyclase by the egg's zona pellucida. *J Androl* 20(1):126-134.

Leicach, S. (2001) *Biomoléculas. Estructura y rol metabólico*. Ed Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Lippert, T., Seeger, H., Schieferstein, G. y Voelter, W. (1993): Immunoreactive Ubiquitin in human seminal plasma. *J Androl* 14(2):130-131.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. y Casper, R. (1998): Reactive oxygen species: a potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:896-900.

Madrid-Bury, N. (2005): ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros? *Manual de Ganadería Doble propósito*. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela pp 632-35.

Mann, T. y Lutwaak-Mann, C. (1982): Male reproductive function and semen. *Androl* 14(1):76.

Manotas, A., López, M. y Vásquez, F. (2001): Determinación de fructosa seminal en una población de adolescentes. *Medicina Reproductiva* 4(1):92.

Martins, C., Dode, M., Bão, S. y Rumpf, R. (2007): The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res* 6 (1):94-104.

Masson, D., Drouineaud, V., Moiroux, P., Gautier, T., Dautin, G., Schneider, M., Fruchart-Najib, J., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Sagot, P., Gambert, P., Jimenez, C. y Lagrost, L. (2003): Human



seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid protein. *Mol Hum Reprod* 9(8):457-464.

Méndez, M., Tzintzun, R. y Val, D. (1999): Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala. *Rural Dev* 12(1)2000.

Momozawa, K. y Fukuda, Y. (1995): *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocyte with heterogeneous ooplasm. *Anim Sci Tech* (66):605-609.

Monterroso, V., Drury, K., Ealy, A., Howell, J. y Hansen, P. (1995): Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenol* 44:947-961.

Morales, P. Kong, M. Pizarro, E. y Pasten, C. (2003): Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum Reprod* 18(5)1017-1017.

Morris, I., Llott, S., Dixon, L. y Brison, D. (2002): The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization. *Hum Reprod* 17:990-998.

Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F. y Alberio, R. (2006): Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch Med Vet.* 38(2)97:104.

Müller, P., Pomorski, T., Porwoli, S., Tauber, R. y Herrmann, A. (1996): Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the

plasma membrane of a hepatocytic cell line (HepG2): implications for biliary secretion. *Hepatology* 24:1497-1503.

Muratori, M., Marchiani, S., Forti, G. y Baldi, E. (2005): Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum Reprod* 20(4):1035-1043.

Naz, R. y Rajesh, P. (2004): Role of Tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2(75).

Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M. y Agüero, A. (1999): Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenol* 51:721-727.

Norman, D., Kuhn, M., Hutchison, J. y Wright, J.: Tasa de concepción de toros de servicio SCR. *ABS México, S. A. de C. V. Artículos técnicos. [www.aipl.arsusda.gov/reference/arr-scr1.htm](http://www.aipl.arsusda.gov/reference/arr-scr1.htm)* Consultada 16/04/2010.

Nuell, M., Stewart, D., Walker, L., Friedman, V., Wood, C., Owen, G., Smith, J., Schneider, E., Dell'Orco, R. y Lumpkin, C. (1991): Prohibitin an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblast and HeLa cells. *Mol Cell Biol* 11:1372-1381.

O'Connor, M., Arnann, R. y Saacke, R. (1981): Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory test and their use for predicting fertility. *J Androl* 53:1368-1376.

Oliphant, G., Reynolds, A. y Thomas, T. (1985): Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *J Ana* 174:269-283.

Osheroff, J., Visconti, P., Valenzuela, J. Travis, J., Alvarez, J. y Kopf, S. (1999): Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* (11):1017-1026.

Ostling, O. y Johanson, K. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Comm* 123:291-298.

Ozanon, C., Chouteau, J. y Sutovsky, P. (2005): Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population. *Hum Reprod* 20:2271-2278.

Pace, M.: Estadísticas en fertilidad. ABS México, S. A. de C. V. Artículos técnicos. [www.absmexico.com.mx](http://www.absmexico.com.mx) Consultada 28/11/2010.

Parrilla, I., Vázquez, J., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Yelamos, J., Roca, J. y Martínez, E. (2003): Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labeled by nick translation. *Reprod* 126:317-325.

Parrish, J., Susko-Parrish, J., Critser, E., Eyestone, W. y First, N. (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenol* 25:591-600.

Paula-Lopes, F., De Moraes, A., Edwards, J., Justice, J. y Hansen, P. (1998): Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1. *Biol Reprod* 59:1406-1412.

Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T., Bevers, M. y Gadella, B. (2003): Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Devel* 64:120-128.

Reyes, A., Delgado, N., Chavarría, M. y Rosado, A. (1990): Algunos conceptos nuevos sobre el mecanismo terminal de la fertilización de los mamíferos. *Ginec Obstet Méx.* 58:292-299.

Reyes, A. y Chavarría, M. (1987): Regulación bioquímica de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero. *Gac Med Mex* 123:261-267.

Risopatrón, J., Catalán, S., Sepúlveda, N. y Sánchez R. (2005): Efecto de diferentes concentraciones de Heparina sobre la capacitación espermática In Vitro en canino. *Revista Científica* 15(6)528-535.

Rivera, J., Edwards, A., Ealy, V., Monterroso, A., Brad, A., Majewski, C., Franco, P. y Hansen, J.: Procedures for In Vitro Production of Bovine Embryos. Dept of Animal Sciences, University of Florida (2000).

Rogers, B. y Perrault, S. (1990): Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 43:1064-1069.

Rosales, AM. y Guzmán, A. (2008): Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revisión. Tec Pec Mex* 46:159-182.

Rubio-Guillén, J., Quintero, A. y González, D. (2009): Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoide de toros. *Revista Científica* (19)4:382-389.

Sánchez, A., Rubilar J. y Gatica. R. (2002): Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch Med Vet* 34(1):18-23.

Shitara, H., Hayashi, J., Takahama, S., Kaneda, H. y Yonekawa, H. (1998): Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Gen* 148:851-857.

Singh, N., McCoy, M., Tice, R. y Schneider, E. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1)184-191.

Sixt, S. y Dahlmann P. (2008): Extracellular, circulating proteasomes and Ubiquitin. Incidence and relevance. *Biochim Biophys Act* 1782:817-823.

Smith, L. y Alcivar, A. (1993): Cytoplasmic inheritance and its effects on development and permormance. *J Reprod Fertil* 48:31-43.

Spano, M., Kolstad, A., Larsen, S., Cordelli, E., Leter, G. y Giwercman, A. (1998): The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Hum Reprod* 13:2495-2505.

Suarez, S. y Pacey, A. (2006): Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod* 12:23-37.

Sun, J., Jurisicova, A. y Casper, R. (1997): Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56:602-607.

Sun, F., Ko, E. y Martin R. (2006): Is there relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology. *Reprod Biol Endocrinol* 4:1.

Sutovsky, P., Hauser, R. y Sutovsky, M. (2004): Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod* 19:628-638.

Sutovsky, P. (2003) Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 61: 88–102.

Sutovsky, P., Terrada, Y. y Schatten, G. (2001a): Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 16: 250-258.

Sutovsky, P., Moreno, D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C y Schatten, G. (2001b): A putative ubiquitin-dependent mechanism

for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *H Cells Sci* 114: 1665-1675.

Sutovsky, P., Moreno, DR., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C y Schatten, G. (2000). Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos *Biol Reprod* 63:582-590.

Sutovsky, P., Navarra, C. y Schatten, G. (1996): The fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 55: 1195-1205.

Tomlinson, M., Moffatt, O., Manicardi, G., Bizzaro, D., Afnan, M. y Sakkas, D. (2001): Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16:2160-2165.

Tomsu, M., Sharma, V. y Miller, D. (2002): Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17:1856-1862.

Travis, A. y Kopf, G. (2002): The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential at mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110:731-736.

Vásquez, R. y Vásquez, D. (2007): Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte* 23 (2):220-230.

Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci* 93:12142–12149.

Vidament, P., Ecot, P., Noue, C., Bourgeois, M., Magistrini, A. y Palmer, E. (2000): Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenol* 54:907-919.

Vitela, I., Cruz, C. y Ramos, M. (2004): Identificación de las causas de desecho en cinco establos lecheros de Aguascalientes, México. *Téc Pec Mex* 42(3)437-444.

Winston ET, Ramalho-Santos J, y Sutovsky P. (2003): Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: Possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 69:254-260.

Xu, K., Yadav, B., Rorie, R., Plante, L., Betteridge, K. y King, W. (1992): Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro (italcis) and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertil* 94:33-43.

Yanagimachi, R. (1994): Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2:371-372.

Yin, Y., Stahl, B. C., DeWolf, W.C. y Morgentaler, A. (1998): P53 mediated germ cell quality control in spermatogénesis. *Dev Biol* 204:165-171.

Yildiz, C., Palma, O., Napoleon, L., Renise, A., Ling, L. y Colin, M. (2007): Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA



integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reprod* 133:585–595.

Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C. y Mayorga, L. (2000): Rab3A Triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod* 62:1084-1089.

La Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C.  
Otorga el presente

## Reconocimiento

a  
Rodríguez Lozano I, Ávalos Rodríguez A,  
Borderas Tordesillas F, Roa Vidal JJ, Rosales Torres AM

Por haber obtenido el *Primer lugar* en el concurso de carteles, categoría  
*Maestría*, con el trabajo:

*Porcentaje de ubiquitinación espermática y capacidad fertilizante espermática  
descongelado de bovino*

En la XXXVI Reunión de la AIBIR.

Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Qro. del 20 al 22 de junio de 2011



Dr. Alonso Fernández Gassó  
Presidente



Dra. Lucía Martínez Mota  
Secretaria

