

**DESARROLLO DE UNA TECNICA SIMPLE PARA
DETERMINAR LA CAPACIDAD DE FERTILIZACION
DE ESPERMATOZOIDES DE CAPRINOS, BASADA EN
LA PENETRACION DE OOCITOS DE BOVINOS.**

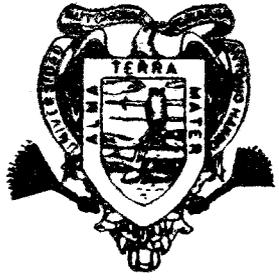
Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"

ROGELIO ALEJANDRO LEDEZMA TORRES



T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCION ANIMAL**



**Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro**

**PROGRAMA DE GRADUADOS
Buenavista, Saltillo, Coah.
AGOSTO DE 1995**

DESARROLLO DE UNA TECNICA SIMPLE PARA
DETERMINAR LA CAPACIDAD DE FERTILIZACION DE
ESPERMATOZOIDES DE CAPRINOS, BASADA EN LA
PENETRACION DE OOCITOS DE BOVINOS.

ROGELIO ALEJANDRO LEDEZMA TORRES

T E S I S

Presentada como requisito parcial para
obtener el grado de
Maestro en Ciencias en
Producción Animal

Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.
Agosto de 1995

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION ANIMAL

COMITE PARTICULAR

Asesor principal: Miguel Mellado
Dr. Miguel Mellado Bosque

Asesor: Joel Maltos Romo
Dr. Joel Maltos Romo

Asesor: Jesús M. Fuentes Rodríguez
Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez

Jesús M. Fuentes Rodríguez
Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Agosto de 1995

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor Dr. Miguel Mellado Bosque, por aceptarme como su asesorado, darme su confianza y apoyarme en el transcurso y finalización de la investigación.

A mis coasesores Dr. Joel Maltos Romo y Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez por su valiosa colaboración en la conclusión de esta tesis.

A mi colega, compañero y amigo M.V.Z. Jesús Rogelio Hernández Ruiz por haberme ayudado en la electroeyaculación de los machos cabríos y acompañarme hasta las 2 ó 3:00 AM cuando tenía trabajo en esta Universidad.

A el Ing. Roberto A. Villaseñor Ramos y Q.F.B Oscar Noe Reboloso Padilla por su apoyo incondicional en la realización de mí tesis.

A la Q.F.B. Laura E. Padilla G. por facilitarme el electroeyaculador y material de laboratorio. Pero sobre todo su amistad y conocimientos.

A el M.C. Margarito por enseñarme a usar el paquete Wordperfect, cuando recién llegué a esta Universidad (Agosto de 1993).

A mis compañeros: MC. Ladislao Cantu Robles
Ing. Carlos Ríos Quiroz
MVZ. Raúl Valdés Saucedo
MVZ. Jorge Acosta Ortiz
MC. Arnulfo Bernal Millan
Ing. Salvador "chava"
Ing. Ezequiel Del Angel
Ing. Jorge Villegas

Por ayudarme en la recolección de semen de machos cabrios.

A la LCQ. Ma del Socorro Bahena García, LCN. Graciela Martínez Leija y QFB. Ma del Carmen Julia García por su amistad y apoyo con el material de laboratorio que necesité durante mi postgrado.

A las secretarias de Producción Animal:

Ma del Socorro Sánchez de Cano
Juana María Valdés
María Adela Cepeda Juárez
Ana María Fuentes Torres
Silvia Orta Jaquez
Verónica Zavala Hernández

Por ayudarme y aguantarme durante mi estancia en esta Universidad.

A el Biólogo Armando Rodríguez García por su valiosa colaboración en el trabajo audiovisual.

A el Ing. Martín Aguirre Garza y al M.V.Z. Guadalupe Rodríguez M. Además, a los trabajadores del rastro municipal de Saltillo que cooperaron en la recolección de material biológico.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por el apoyo técnico, económico, científico, político y social.

A CONACYT por brindarme la oportunidad de superarme.

DEDICATORIAS

A veces nuestro camino es largo con pendientes y obstáculos, pero la fé que depositan mis padres y el respeto que le tengo a Dios, hacen que este camino parezca más corto y agradable al recorrerlo. Aunque físicamente, ellos estén fuera de mi camino. Espero que Dios siga brindando salud a mi familia y a mí, para caminar donde poco se explora.

Especialmente a mis Padres: Rogelio Ledezma Solis y Genoveva Torres de Ledezma por creer en mí, brindarme su confianza y darme su cariño que es muy importante en mi virar.

A mis hermanos: Felipe de Jesús
Julio César
Juanita Yesenia
Genoveva

A quienes quiero y son un estímulo para seguir superándome.

A todos mis compañeros de todas las especialidades de postgrado, pues en ellos sembré y coseché amistad y cariño.

COMPENDIO

Desarrollo de una técnica simple para determinar la capacidad de fertilización de espermatozoides de caprinos, basada en la penetración de oocitos de bovinos

POR

Rogelio Alejandro Ledezma Torres

MAESTRIA

PRODUCCION ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. AGOSTO 1995.

Dr. Miguel Mellado Bosque - Asesor -

Palabras clave: Caprinos, macho cabrío, espermatozoide,
oocito, capacitación, fertilización.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una técnica simple para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides de machos cabríos, utilizando oocitos de bovino tratados con NaOH y diferentes técnicas para la capacitación de los espermatozoides.

El trabajo se dividió en tres fases. En la fase 1, se evaluaron diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 N) y tiempos (2.0, 2.15, 2.5 y 3.0 minutos) de exposición a NaOH para eliminar las células de la granulosa de oocitos de bovino. En la fase 2, se evaluaron las siguientes técnicas de capacitación de los espermatozoides: incubación en oviductos de bovinos, en células de la pared interior de oviductos de bovino, en suero sanguíneo de cabra en estro y en heparina. En la fase 3, se evaluó la fertilización in vitro.

En la fase 1 se obtuvo el 100 por ciento de denudación (eliminación de las células de la granulosa y eliminación parcial de la zona pelúcida) de oocitos de bovinos, cuando se utilizó una concentración 1 N de NaOH y un tiempo de exposición de 2.15 minutos.

En la fase 2, la capacitación de los espermatozoides incubados en oviductos de bovino, no sobrepasó el 20 por ciento. En este experimento el tiempo de incubación no afectó el porcentaje de células capacitadas ($P > 0.05$), pero se observó un mayor ($\chi^2 = 32.7, 1 \text{ gl}, P < 0.01$) número de células capacitadas con el semen "sin lavar" comparado con el semen "lavado" (sin líquido seminal). No existió interacción entre el estatus del semen y el tiempo de incubación de las células espermáticas. En otro experimento, la capacitación de los

espermatozoides incubados con células de la pared interior de oviductos de bovino, alcanzó el 50 por ciento. El estatus del semen no influyó sobre la capacitación de los espermatozoides, pero el tiempo de incubación afectó significativamente ($\chi^2 = 4.97$, 3 gl, $P < 0.05$) el número de células espermáticas capacitadas. No existió interacción entre el estatus del semen y el tiempo de incubación. En otro experimento, la proporción de células espermáticas capacitadas con suero sanguíneo de cabra en estro y heparina fueron, 57.5 y 61.0 por ciento cuando se incubaron por 1 hora y, 83.0 y 88.0 por ciento cuando se incubaron por 40 minutos ($\chi^2 = 68.9$, 1 gl, $P < 0.01$) respectivamente. El estatus del semen no influyó ($P > 0.05$) en los resultados encontrados y no existió interacción entre los tratamientos y estatus del semen en la capacitación de espermatozoides de caprinos.

En la fase 3 del estudio se llevó a cabo la fertilización in vitro, utilizando una incubadora para huevos de ave. Se obtuvo un 66.6 por ciento (10/15) de penetración de los oocitos tratados con NaOH y expuestos a espermatozoides capacitados con heparina. En el 33.4 por ciento restante de los oocitos no se logró observar cabezas descondensadas de espermatozoides, pero se observó gran cantidad de espermatozoides en la periferia de los oocitos.

ABSTRACT

Development of a simple technique to determine the fertilization of capacity buck spermatozoa, based on the penetration of bovine oocytes

By

Rogelio Alejandro Ledezma Torres

MASTER DEGREE

ANIMAL PRODUCTION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. AUGUST 1995.

Ph.D. Miguel Mellado Bosque - Major advisor -

Key words: Fertilization, buck, spermatozoa, oocyte, capacitation.

The objective of this study was to develop a simple technique to evaluate the fertilizing capacity of buck spermatozoa, utilizing bovine oocytes treated with NaOH and buck semen subjected to different treatments to induce capacitation.

The study was divided into three phases. In phase 1, different concentrations (0.5, 1.0 y 1.5 N) of NaOH and exposition times (2.0, 2.15, 2.5 y 3.0) to eliminate the granulosa cells of the bovine oocytes were evaluated. During phase 2, capacitation of spermatozoa was induced by incubating the semen in bovine oviducts; in cells of the interior wall of bovine oviducts; in blood serum of does in estrus and in heparin. During phase 3, an in vitro fertilization trial in a manual hen's egg incubator was carried out.

In phase 1, 100 percent of denudation (elimination of granulosa cells and partial elimination of zona pellucida) of bovine oocytes was obtained, when oocytes were exposed to NaOH 1 N during 2.15 minutes.

In phase 2, capacitation of spermatozoa incubated in bovine oviducts, did not surpassed 20 percent. In this experiment the incubation time did not affect the percentage of capacitated sperm cells ($P > 0.05$), but higher ($\chi^2 = 32.7, 1 \text{ DF}, P < 0.01$) numbers of capacitated spermatozoa were observed with intact semen compared to "washed" semen (without seminal liquid). Interaction was not detected between the status of semen and the incubation time of the spermatozoa. In another experiment, capacitation of spermatozoa incubated with cells of the interior wall of bovine oviducts reached 50 percent. The

status of semen did not to influence the percentage of capacitated spermatozoa, but the incubation time significantly affected ($\chi^2 = 4.97, 3 \text{ DF}, P < 0.05$) the percentage of capacitated sperma cells. Interaction was not detected between status of the semen and the incubation time. In a third experiment, the percentage of capacitated sperma cells incubated either with blood serum of does in estrus and heparin were, 57.5 and 61.0 percent when incubate for 1 hour and, 83.0 and 88.0 percent when incubate for 40 minutes ($\chi^2 = 68.9, 1 \text{ DF}, P < 0.01$) respectively. The status of semen (washed or not washed) did not influence ($P > 0.05$) capacitation and it did not exist interaction between treatments and status of semen.

In phase 3 of the study on the in vitro fertilization trial was carried out, utilizing a mannual incubator for hens's eggs. Sixty seven percent (10/15) of the oocytes treated with NaOH 1 N were penetrated by buck spermatozoa trated with heparin. It is concluded that the technique deicribed in this study can be used to evaluate the fertilizing capacity of buck spermatozoa.

INDICE DE CONTENIDO

	PAGINA
INDICE DE CUADROS.....	XV
INDICE DE FIGURAS.....	XVi
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
FERTILIZACION <u>in vitro</u>	3
ELIMINACION DE LA GRANULOSA DE LOS OOCITOS....	7
CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	14
DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.....	14
RECOLECCION DE OOCITOS.....	15
RECOLECCION DE OVIDUCTOS.....	15
RECOLECCION DE CELULAS DE LOS OVIDUCTOS.....	16
RECOLECCION DE SEMEN.....	16
TINCION DE ESPERMATOZOIDEOS PARA DETERMINAR CAPACITACION.....	16
TINCION DE OOCITOS PARA DETERMINAR PENETRA- CION.....	17
FASE 1. DENUDACION DE LOS OOCITOS.....	17
FASE 2. CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS..	18
EXPERIMENTO 1.....	18
EXPERIMENTO 2.....	19

EXPERIMENTO 3.....	20
FASE 3.....	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	34
CONCLUSIONES.....	39
RESUMEN.....	41
LITERATURA CITADA.....	43

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
4.1. TASA DE DENUDACION (ELIMINACION DE GRANULOSA Y PARCIALMENTE ZONA PELUCIDA) DE OOCITOS DE BOVINOS, A DIFERENTE TIEMPO DE EXPOSICION A SOLUCIONES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaOH.....23	23
4.2. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE CAPRINOS "SIN LAVAR Y LAVADOS" AL SER INCUBADOS EN OVIDUCTOS DE BOVINOS.....26	26
4.3. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE CAPRINOS "SIN LAVAR Y LAVADOS" AL SER INCUBADOS EN CELULAS DE LA PARED INTERIOR DEL OVIDUCTO DE BOVINOS.....27	27
4.4. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS DE CAPRINOS "SIN LAVAR Y LAVADOS" DESPUES DE SER INCUBADOS EN SUERO SANGUINEO DE CABRA EN ESTRO Y HEPARINA.....28	28

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
4.1. PORCENTAJE DE DENUDACION DE OOCITOS EN FUNCION DEL TIEMPO DE EXPOSICION A UNA SOLUCION 1N DE NaOH	24
4.2. ESPERMATOZOIDES DE MACHOS CABRIOS CAPACITADOS Y NO CAPACITADOS. 1) ESPERMATOZOIDE SIN REACCION ACROSOMICA , 2) ESPERMATOZOIDE CON REACCION ACROSOMICA (CONTRASTE DE FASES 400X)	29
4.3. ESPERMATOZOIDES DE MACHOS CABRIOS CAPACITADOS. LAS FLECHAS MUESTRAN ESPERMATOZOIDES VESICULADOS (CONTRASTE DE FASES 1,000X)	30
4.4 (A Y B) . DESCONDENSACION DE CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES DE MACHOS CABRIOS (CONTRASTE DE FASES 1,000X)	32
4.5. ESPERMATOZOIDES DE MACHOS CABRIOS ALREDEDOR DE UN OOCITO DE BOVINO DESPROVISTO DE LAS CELULAS	

DE LA GRANULOSA (CONTRASTE DE FASES 100X).....33

INTRODUCCION

En la pasada década, la investigación sobre nuevas alternativas para lograr la fertilización in vitro y posterior desarrollo del embrión en las diferentes especies domésticas, silvestres e incluso en el humano, ha sido muy abundante, y en la actualidad se siguen estudiando nuevas técnicas para la capacitación de espermatozoides y maduración de oocitos, para lograr lo anteriormente mencionado.

El uso de la técnica de fertilización in vitro en nuestro país, se ha utilizado en forma muy limitada, cosa que no ocurre en otros países desarrollados. Esta técnica permite desarrollar conocimientos sobre biotecnología e ingeniería genética; además, eventualmente el progreso genético de los animales domésticos puede acelerarse.

La capacidad de fertilización de los espermatozoides de machos cabríos en las diferentes estaciones del año, no está definida en México. Cuando se disponga de esta información, el caprinocultor sabrá en que

estación del año la fertilidad de sus sementales se ve aumentada para establecer un manejo reproductivo adecuado.

Se propone que la utilización de oocitos desnudos de bovinos con hidróxido de sodio, es una técnica valiosa para determinar la capacidad de fertilización de los espermatozoides caprinos.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue el desarrollo de una técnica simple para evaluar la capacidad de fertilización in vitro de los espermatozoides de machos cabríos, utilizando oocitos de bovinos desnudos (desprovistos de su granulosa y eliminación parcial de la zona pelúcida) con hidróxido de sodio y diferentes técnicas para la capacitación de los espermatozoides.

REVISION DE LITERATURA

Fertilización in vitro.

Las etapas de la fertilización natural incluyen: la conducta de apareamiento, el transporte de espermatozoides y óvulos, y la interacción entre gametos (Yanagimachi, 1988). Anteriormente se pensó que la barrera que limita la interacción de gametos entre diferentes especies, estaba en la zona pelúcida del oocito (O'Rand, 1988), ya que dependiendo de la especie, la zona pelúcida permite modular la inducción a la reacción acrosómica y/o penetración de la zona pelúcida por espermatozoides extraños (Cox, 1992). De cualquier modo, la relación filogenética entre gametos puede reducir la eficiencia de la zona pelúcida para actuar como una barrera.

El primer estudio de fertilización in vitro (FIV) en mamíferos, fue realizado en los años 30 por Chang (1959) en conejos. Desde aquel tiempo, muchos laboratorios han reportado exitosamente técnicas de FIV en roedores, rumiantes y humanos, pero en algunas especies como el cerdo, la maduración y FIV de los óvulos ha resultado más

difícil que en otras especies (Mattioli et al., 1988a,b; Nagai et al., 1988; Vajta et al., 1991).

La FIV ha sido reportada en varias especies domésticas mayores incluyendo bovinos, ovinos, cerdos y cabras. La descripción morfológica de la unión espermatozoide-óvulo (Song e Iritani, 1985) y ultraestructura, ha sido estudiado en cigotes de cabras obtenidos in vivo, revelando muchas características morfológicas comunes a otros mamíferos (Crozet et al., 1987).

Algunos de los objetivos de la FIV son: lograr el cruzamiento entre especies domésticas, proporcionar cigotes para la industria de la ingeniería genética y la transferencia de genes para la producción de animales transgénicos (Younis et al., 1991). El progreso en el desarrollo del procedimiento de FIV para oocitos de cabras madurados in vivo o in vitro, y el desarrollo potencial de los embriones producto de la FIV, fueron reportados por Younis et al. (1990).

Los factores que afectan el éxito de la FIV de oocitos foliculares de bovino fueron estudiados por Ball et al. (1983). Estos investigadores encontraron que la presencia de células del cúmulus oophorus no fueron necesarias para la penetración de los oocitos, pero la

frecuencia de penetración y la presencia de ambos pronúcleos: masculino y femenino, se incrementó cuando el cúmulus oophorus estaba presente en los oocitos. Otro de los factores que afectan la FIV es el calor que se les proporciona a los oocitos inmaduros antes de su maduración, y la anomalía que se observó fue en la estructura meiótica. Por otra parte, los porcentajes de fertilización de óvulos liberados de los folículos y denudados mecánicamente fueron 85 por ciento y 82.8 por ciento, pero solamente el 59.7 por ciento y 57.1 por ciento, respectivamente, fueron fertilizados normalmente (presencia de pronúcleos en el ooplasma). Estos resultados se obtuvieron 17 horas después de la inseminación (De Smedt et al., 1992).

La maduración y fertilización in vitro de oocitos en especies domésticas grandes es importante para el desarrollo de nuevas biotecnologías, tales como transferencia de genes y multiplicación in vitro de embriones idénticos. Los oocitos de bovino son particularmente demandados; aunque cigotos de cabras también pueden ser de valor para la biotecnología. Por ejemplo, cabras lecheras transgénicas pueden ser usadas para producir, en su leche, grandes cantidades de proteínas extrañas que la cabra normalmente no es capaz de producir. Aunque la maduración y fertilización in vitro de oocitos de

bovino y ovino tiene que ser extensivamente investigado (Crozet, 1991).

Para usar las técnicas de FIV, Cox et al. (1992) y Slavík y Fulka (1992) mencionan que los espermatozoides de caprinos también pueden penetrar oocitos de vacas y ovejas.

Cox et al. (1994) compararon la eficiencia de espermatozoides de machos cabríos para penetrar oocitos intactos de bovinos y ovejas, además evaluaron el efecto de la presencia de células del cúmulus oophorus sobre la habilidad de los espermatozoides para penetrar oocitos de estas especies.

Cox (1992) reportó que los espermatozoides de toros fueron capaces de penetrar oocitos de ovejas pero incapaces de penetrar oocitos de cerdo o ratón. Por otra parte, Slavík et al. (1990) y Cox (1992) mencionaron que los espermatozoides de borrego fácilmente penetraron oocitos de vaca. Esto está confuso porque la zona pelúcida es incapaz de reconocer a espermatozoides de otras especies, pero O'Rand (1988) menciona que las partes moleculares comunes de la zona de interface del espermatozoide puede ser una posibilidad.

El desarrollo potencial de oocitos madurados in vitro o in vivo fue estudiado por Leibfried et al. (1987),

quienes evaluaron la frecuencia de penetración del espermatozoide, frecuencia de formación del pronúcleo masculino y desarrollo embrionario. La frecuencia de penetración del espermatozoide no fue diferente para oocitos madurados in vitro (73 por ciento) en comparación con oocitos madurados in vivo (70 por ciento). De cualquier modo, la formación del pronúcleo masculino fue significativamente menor para oocitos madurados in vitro (69 por ciento) contra in vivo (88 por ciento). Los oocitos madurados y fertilizados in vitro fallaron para desarrollarse a la etapa de 2 células (3 por ciento), mientras que los oocitos madurados in vivo presentaron un desarrollo normal (40 por ciento) en la etapa de 2 a 4 células. El desarrollo hasta la etapa de blastocisto fue evaluado después de 5 días de incubación en oviductos de ovinos (in vivo).

Bajo condiciones de maduración de oocitos y posterior FIV, se produjeron grandes cantidades de oocitos en metafase II, estos oocitos fueron penetrados y formaron pronúcleo (Shea et al., 1976).

Eliminación de la granulosa de los oocitos.

La denudación de los oocitos, en cualquiera de las especies domésticas, es de gran valor para su utilización

diferentes experimentos tales como la evaluación de la capacidad de penetración de los espermatozoides, utilización y posible desarrollo embriológico. Esta manipulación de oocitos consiste en remover las células que rodean a éstos, y se ha realizado por varias técnicas como: manipulación mecánica en solución salina (Shea et al., 1976), manipulación mecánica con micropipetas (De Smedt et al., 1992; Cibried y Bavister, 1983), hialuronidasa (Yanagimachi et al., 1979; Simon et al., 1993; Fayerer-Hosken y Brackett, 1987), hialuronidasa y tripsina (El-Gaafary et al., 1993).

Lu et al. (1987) utilizaron oocitos parcialmente manipulados mecánicamente, y espermatozoides de bovino manipulados con heparina (100 µg/ml). Los oocitos manipulados in vitro fueron transferidos a oviductos de vacas, los cuales después de seis o siete días fueron recuperados ya como embriones, y transferidos a 19 vacas de las cuales 14 quedaron preñadas (74 por ciento). En otro estudio conducido por Xu et al. (1987), utilizando la técnica de maduración y fertilización in vitro de oocitos de bovinos, los embriones fueron transferidos quirúrgicamente a los úteros de vacas. Después, éstos fueron recuperados en la etapa de blastocisto o mórula temprana, y posteriormente transferidos por el método no quirúrgico a las receptoras, dando lugar a preñeces normales.

Capacitación de los espermatozoides.

La capacitación espermática se ha realizado mediante una gran cantidad de técnicas tanto in vivo como in vitro, y en las diferentes especies de animales domésticos. Fayrer-Hosken y Brackett (1987) estudiaron diferentes formas de capacitación espermática en conejos utilizando oocitos desnudos de hamster. Los tratamientos fueron suero de conejo, dilaurilfosfatidilcolina con 36.5 μ M de lípidos y lavado de semen con solución isotónica e incubados por 15 minutos. Los resultados obtenidos fueron (oocitos fertilizados/oocitos inseminados) 0/30, 0/30 y 67/87, respectivamente. En este mismo estudio, también se utilizaron espermatozoides capacitados in vivo (cuernos uterinos) con los siguientes resultados 65.4 por ciento (17/26) para fertilización in vitro y 100 por ciento (7/7) para penetración.

La capacitación y la subsecuente reacción acrosómica en espermatozoides, son requisitos para la fertilización de los óvulos de mamíferos (Bedford, 1970). Generalmente se ha aceptado que estos eventos pueden ser inducidos no solamente en el tracto reproductivo de la hembra en estro, sino también en medios químicamente definidos. La forma de saber si los espermatozoides de caprinos experimentaban verdadera reacción acrosómica, fue por medio de una tinción por el método trypan azul-Giemsa,

el cual fue más sencillo y más útil en comparación con la tinción Triple (TS), usada convencionalmente (Didion et al., 1989).

Las enzimas que libera el acrosoma después de la capacitación y subsiguiente reacción acrosómica de los espermatozoides, son de vital importancia para el espermatozoide en la penetración de la zona pelúcida durante la fertilización del óvulo (Barth y Oko, 1989).

Trish (1989) realizó un estudio para determinar la capacidad de fertilización de espermatozoides de caprinos, utilizando oocitos de hamster desnudos. Este investigador encontró que los espermatozoides tuvieron gran habilidad para penetrar los oocitos desnudos cuando estos fueron incubados en el Medio Tris-buferado, en comparación con el Medio Ham's F-10 (95 contra 2 por ciento), aunque la motilidad no fue bien mantenida en el Medio Tris-buferado. Diez millones de espermatozoides por ml fue suficiente para una máxima penetración. El autor concluyó que esta técnica es de gran ayuda para estimar la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

En un experimento que realizaron Younis et al. (1991) en cabras con oocitos madurados y fertilizados con espermatozoides capacitados in vitro, lograron iniciar tres

preñeces después de la transferencia de embriones (etapa de 2 y 4 células) a los oviductos de estos animales.

Hanada (1985) obtuvo 12 embriones de dos células después de realizar la FIV, utilizando oocitos extraídos del oviducto, y espermatozoides epididimales de caprino capacitados en un medio químicamente definido. Los embriones fueron transferidos a cinco recipientes, de los cuales se obtuvo una preñez y el nacimiento de un cabrito.

Sundhey et al. (1994) utilizaron el Medio BWW (pH 7.4, con 3 por ciento BSA y 10 mM Ca²⁺) para la capacitación de espermatozoides de caprinos. Estos se recolectaron del epidídimo, y se incubaron por 3 horas en el Medio BWW. Los autores encontraron que la reacción del acrosoma complica la secuencia de la contracción o descondensación de la membrana, vesiculación, rompimiento de acrosomas y liberación de proteínas de la membrana. Tales proteínas pueden disminuir la fertilización.

Cox et al. (1994) estudiaron la fertilización in vitro de oocitos foliculares de bovino y ovinos, utilizando espermatozoides de caprinos. Después de la recolección del semen éste se "lavó" dos veces (300 X g, 5 min) con Dulbecco's PBS. Posteriormente las células espermáticas fueron resuspendidas en TALP IVF para su capacitación. En un primer experimento, donde se fertilizaron oocitos

madurados de caprinos, bovinos y ovino, los cuales tenían células del cúmulus oophorus con espermatozoides de caprinos, se obtuvieron porcentajes de fertilización de 91.3, 82.7 y 79.8 para los oocitos de cabras, vacas y ovejas, respectivamente. En un segundo experimento, se utilizaron oocitos desnudados y los porcentajes de fertilización fueron 74.0 por ciento para oocitos de vacas y 68.42 por ciento para oocitos de ovejas. La presencia de células del cúmulus oophorus no modificó la habilidad de los espermatozoides de machos cabríos para penetrar oocitos de otras especies de rumiantes.

Generalmente el semen congelado de morueco es menos fértil que el semen fresco (Watson, 1975), a pesar del 60 a 70 por ciento de motilidad que presentan los espermatozoides después del descongelamiento. Iritani y Niwa (1977) aplicaron espermatozoides de bovinos in situ en úteros de vacas y conejas en etapa de estro, para evaluar la capacitación.

Ensayos de FIV fueron llevados a cabo por Guienne et al. (1990) para investigar su validez, en la evaluación de semen de toro para inseminación artificial (IA). Se utilizaron 1532 oocitos, colectados de ovarios de vacas sacrificadas en el rastro. Se utilizaron 4 dosis de heparina para la capacitación de los espermatozoides (0, 0.05, 0.1 y 0.2 µg/ml). Los oocitos fueron considerados

fertilizados cuando dos pronúcleos (o más) fueron observados en el ooplasma. Estos investigadores concluyeron que la capacitación y fertilización en un Medio Tyrode modificado conteniendo 0.05 µg/ml de heparina puede ser una buena herramienta para la evaluación de la fertilidad de toros cuyo semen es utilizado para la IA.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio fue conducido en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", ubicadas en los terrenos de la misma Universidad en Buenavista, Saltillo Coahuila. El sitio de estudio se ubica en la latitud $25^{\circ} 22' N$ y longitud de $101^{\circ} 00' W$, a una altura de 1742 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de $19.8^{\circ} C$ y la precipitación total media anual es de 298.5 mm, con un clima seco semicálido, con invierno fresco, extremoso (Mendoza, 1983). La fecha de inicio de este estudio fue el 25 de febrero de 1994 y terminó el 18 de Mayo de 1995.

En este estudio se utilizaron tres machos cabríos Nubios de aproximadamente 4 años de edad, los cuales permanecieron estabulados y eran alimentados con heno de alfalfa o avena. La condición corporal de los animales era de 6 en la escala de 1 a 9 para bovinos (Mortimer et al. 1991). Se utilizaron también cinco cabras Nubias adultas en la etapa de estro. Además, se utilizaron ovarios y oviductos de vacas sacrificadas en el rastro municipal de Saltillo, Coahuila.

Recolección de oocitos.

En este estudio los oocitos fueron recolectados de ovarios de vacas, inmediatamente después del sacrificio de éstas, sin importar la etapa del ciclo estrual. El transporte de los ovarios al laboratorio fue en una solución salina al 0.9 por ciento, a una temperatura de 38°C. Los oocitos se recolectaron de todos los folículos presentes en los ovarios, independientemente de su tamaño, por medio de aspiración con una jeringa. Una vez recolectados, éstos fueron expuestos a NaOH para eliminar las células de la granulosa (denudación), procediéndose luego a realizar la FIV.

Recolección de oviductos.

Los oviductos de las vacas se recolectaron, sin importar la etapa del ciclo estrual, inmediatamente después del sacrificio de los animales. El transporte de los oviductos al laboratorio fue en solución salina al 0.9 por ciento a una temperatura de 38°C.

Recolección de células de los oviductos.

Los oviductos utilizados para la recolección de las células se obtuvieron y se manejaron en forma similar a la recolección de los ovarios. Las células de las paredes internas del oviducto se recolectaron utilizando el Medio PBS (Phosphate buffer solution) aplicado a presión a través del lumen de este órgano, con una jeringa y a una temperatura de 38°C.

Recolección de semen.

Se llevó a cabo por medio de electroeyacuación. A cada una de las muestras de semen se les determinó su concentración, volumen, color y motilidad. Se obtuvo una muestra por macho cabrío, con un intervalo de cinco a siete días en los meses de Noviembre y Diciembre de 1994 y, Febrero, Marzo, Abril y Mayo de 1995.

Tinción de espermatozoides para determinar capacitación.

Consistió en un frotis de espermatozoides tratados con los diferentes métodos de capacitación sobre un portaobjetos. El portaobjetos fue secado con aire caliente, inmediatamente después los espermatozoides fueron fijados

en metanol por 7 minutos. Posteriormente, se tiñeron con Giemsa diluida 1:20 (Giemsa:agua desionizada), por 1 hora. Se secaron los portaobjetos con aire caliente y se observaron en un microscopio de contraste de fases.

Tinción de oocitos para determinar penetración.

Una vez que pasaron 12 horas de incubación en la fertilización in vitro, se colectaron los oocitos de las cajas petri para depositarlos en portaobjetos. Se secaron con aire caliente y fueron fijados por 12 horas en ácido acético:metanol (1:3). Después, se tiñeron con aceto orceina 1 por ciento y posteriormente se examinaron con un microscopio de contraste de fases.

Fase 1. Denudación de los oocitos.

Para este experimento los oocitos fueron desprovistos de su granulosa y parcialmente su zona pelúcida, utilizando una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5, 1.0 y 1.5 N. Los oocitos recolectados fueron colocados en cajas petri en Medio PBS, procediéndose luego a colocarlos en grupos de 10 oocitos, en cajas petri que contenían la solución de NaOH. En este experimento también se evaluó el tiempo de exposición de los oocitos a la

solución de NaOH el cual fue de 2.0, 2.15, 2.5 y 3.0 minutos. Después de la incubación, los oocitos se recuperaron y se lavaron dos veces en Medio PBS, anotándose el porcentaje de oocitos desnudos. La observación de los oocitos fue a través de un microscopio estereoscópico.

Fase 2. Capacitación de los espermatozoides.

En esta fase se llevaron a cabo diferentes experimentos para probar diferentes procedimientos, para la capacitación de los espermatozoides.

Experimento 1. Incubación de espermatozoides en oviductos de bovinos.

El semen se asignó a 8 tratamientos en un arreglo factorial, donde las fuentes de variación fueron el estatus del semen ("sin lavar" y "lavado") y el tiempo de incubación. El semen se "lavó" 2 veces con Medio 199 en una proporción 1:3 (semen:Medio 199) y se centrifugó a 300 g por 5 minutos. El semen fue resuspendido en Medio 199 a una temperatura de 38°C. Para la incubación de los espermatozoides en la ampolla de los oviductos, los extremos de este órgano fueron atados con hilo nylon, e inmediatamente después se depositaron 10^7 espermatozoides en el lumen de este segmento del aparato reproductor, por medio de una jeringa de 1.0 ml. Posteriormente los

oviductos fueron incubados durante 3, 6, 9 y 12 horas en una incubadora para huevo de aves, la cual contenía una solución salina al 0.9 por ciento a una temperatura de 38°C. Una vez que se cumplió el período de incubación, se "lavaron" los oviductos con el Medio PBS para recuperar los espermatozoides. Luego se prepararon frotis para tinción con Giemsa (SIGMA DIAGNOSTICS), y posteriormente se observaron los espermatozoides para detectar aquellos con la reacción del acrosoma, con la ayuda de un microscopio de contraste de fases. Se consideró que los espermatozoides estaban capacitados, cuando la membrana acrosómica estaba vesiculada o fragmentada y cuando la parte superior de la cabeza (arriba de la zona ecuatorial) no estaba teñida.

Experimento 2. Incubación de espermatozoides con células del oviducto.

El manejo de los oviductos, semen, incubación y proceso de los espermatozoides para su observación fue en forma similar al experimento 1. La recolección de las células de la pared interior del oviducto fue con el Medio PBS aplicado a presión por una jeringa, dicha recolección se hizo en recipientes de plástico desinfectados, de una capacidad de 15 ml aproximadamente. Los resultados obtenidos en el experimento 1 y 2, se analizaron estadísticamente con pruebas de χ^2 , considerándose 2 fuentes de variación: estatus del semen ("sin lavar" y "lavado") y

hora de incubación, además de la interacción entre estas variables.

Experimento 3. Incubación de espermatozoides en suero sanguíneo de cabra en estro y en heparina.

Uno de los tratamientos consistió en la utilización de suero sanguíneo de cabras en estro, el cual se filtró a través de filtros ACRO-DISC, con un diámetro de los poros de 0.2 μm y se calentó a 60°C por 1 hora. Se añadieron 10^7 espermatozoides en 1 mililitro de suero procesado. La incubación de los espermatozoides en este caso fue de 1 hora a 38°C. El semen se manejó en forma similar al experimento 1 y 2. El otro tratamiento consistió en la utilización de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de heparina en Medio 199, al cual se agregaron 10^7 espermatozoides. Esta dosis se agregó directamente al Medio 199 y al semen por 40 minutos a 38°C. En ambos tratamientos se utilizó semen "sin lavar" y "lavado". Se utilizaron pruebas de χ^2 para detectar diferencias entre estatus del semen y medio de capacitación, así como su interacción.

Fase 3. Fertilización in vitro.

En esta fase se combinaron los procedimientos que mejores resultados se obtuvieron en los experimentos previos, tanto para la desnudación de los oocitos como para

la capacitación de los espermatozoides, y se realizó la FIV. Una vez que se obtuvieron los oocitos desnudos, éstos fueron expuestos con 10^7 espermatozoides capacitados en cajas petri (8 o 10 oocitos) selladas con parafina, por un tiempo de 12 horas. Se consideró fertilizado el oocito cuando éste fue penetrado por los espermatozoides, lo cual pudo constatarse por la presencia de pronúcleos, al descondensarse la cabeza de los espermatozoides. La observación de este proceso fue con un microscopio de contraste de fases.

RESULTADOS

Fase 1. Denudación de los oocitos.

La denudación de oocitos de bovinos expuestos a diferente concentración de hidróxido de sodio y en diferentes tiempos de exposición, se presentan en el Cuadro 4.1. A una concentración de 0.5 N no se logró la denudación de oocitos en ningún tiempo de exposición. Con una concentración de 1.5 N, con exposición de 2.0 minutos, se obtuvo el 50 por ciento (5/10) de denudación pero, el 50 por ciento restante de los oocitos se disolvieron. La concentración 1.0 N tuvo valores más altos de denudación con una exposición de 2.15 minutos (100 por ciento). Debido a que los niveles de hidróxido de sodio 0.5 y 1.5 N no funcionaron, no se realizaron análisis estadísticos para determinar los efectos de las 2 fuentes de variación estudiados. En lugar de esto se procedió a determinar la relación entre el tiempo de incubación y el porcentaje de denudación de oocitos a una concentración de 1.0 N de NaOH. Esta relación mostró una tendencia cúbica (Figura 4.1), en la cual se observa que, con 2.15 y 2.5 minutos de exposición con una concentración de 1.0 N de NaOH, se

eliminaron la células de la granulosa en casi la totalidad de los oocitos.

Cuadro 4.1. Tasa de denudación (eliminación de granulosa y parcialmente zona pelúcida) de oocitos de bovinos a diferente tiempo de exposición a soluciones con diferentes concentraciones de NaOH.

Tiempo de exposición (min)	Concentración de NaOH (normalidad)					
	0.5		1.0		1.5	
	Nº-	%	Nº-	%	Nº-	%
2.0	**0/10	0	**0/10	0	* 5/10 **5/10	50 50
2.15	**0/10	0	**10/10	100	*10/10	100
2.5	**0/10	0	* 4/10 ** 6/10	40 60	*10/10	100
3.0	**0/10	0	* 10/10	100	*10/10	100

* oocitos disueltos

** oocitos denudados parcialmente

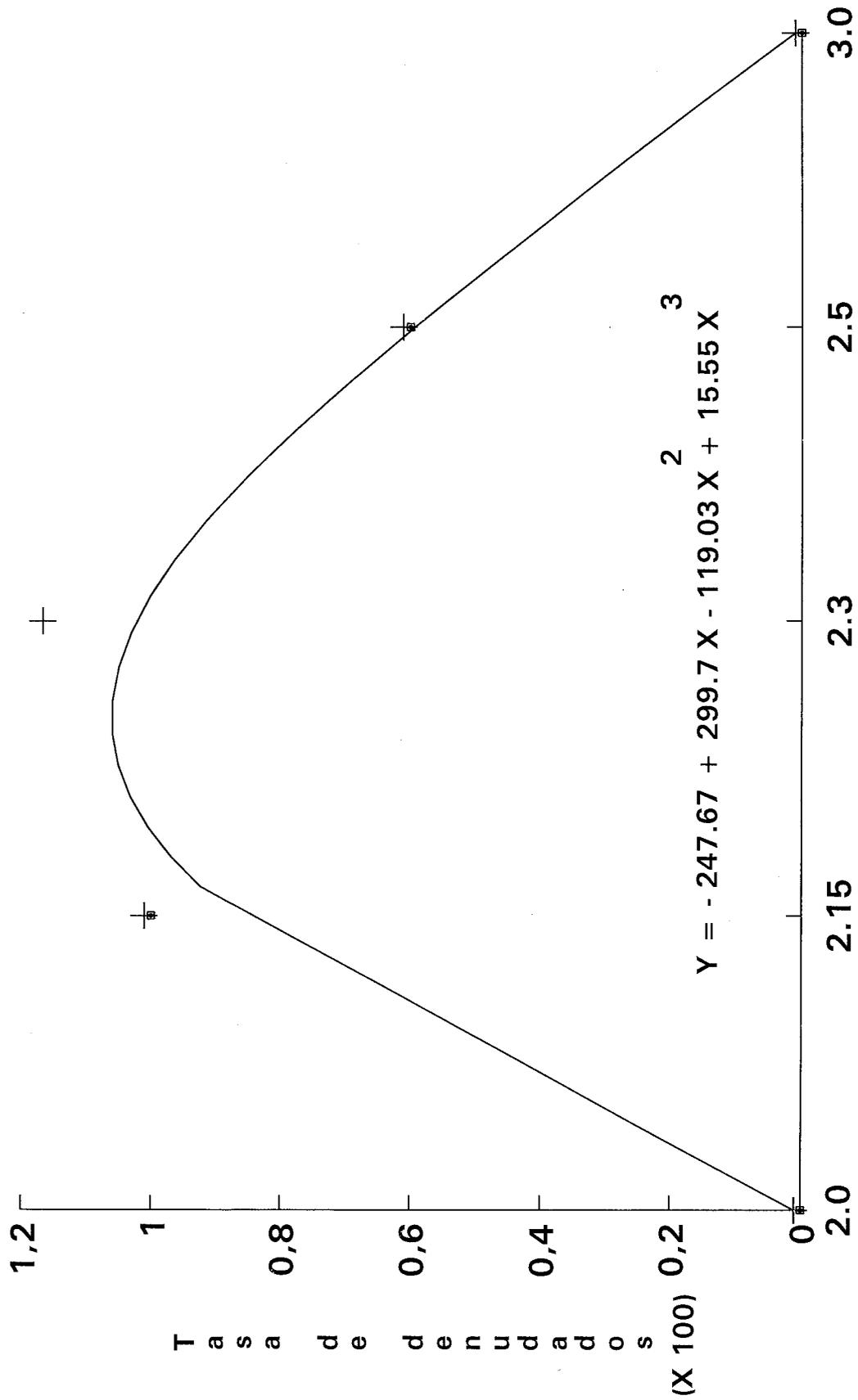


Figura 4.1. Porcentaje de denudación de oocitos en función del tiempo de exposición a una solución 1 N de NaOH

Fase 2. Capacitación de los espermatozoides.

Experimento 1.

En el Cuadro 4.2 se presentan los resultados de la capacitación de espermatozoides de machos cabríos incubados en oviductos de bovinos. Se observa que este método de capacitación no resultó adecuado, pues el porcentaje de células capacitadas en los diferentes tratamientos no sobrepasó el 20 por ciento. El tiempo de incubación no afectó el porcentaje de células espermáticas capacitadas ($P > 0.05$), pero con el semen "sin lavar" se obtuvo un mayor ($\chi^2 = 32.7, 1 \text{ gl}, P < 0.01$) número de células capacitadas comparado con el semen "lavado". No existió interacción entre el estatus del semen y el tiempo de incubación en la capacitación espermática.

Cuadro 4.2. Porcentaje de espermatozoides capacitados de caprinos "sin lavar" y "lavados" al ser incubados en oviductos de bovinos.

Hora de incubación	Semen sin lavar		Semen lavado		Combinación	
	N°-	%	N°-	%	N°-	%
3	34/200	17.0	10/200	5.0	44/400	11.0 ^a
6	33/200	16.5	19/200	9.5	52/400	13.0 ^a
9	38/200	19.0	21/200	10.5	59/400	14.8 ^a
12	38/200	19.0	16/200	8.0	54/400	13.5 ^a
Combinación	143/800	17.9 ^a	66/800	8.3 ^b		

^a, ^b. Datos con letras distintas difieren $P(< 0.01)$

Experimento 2.

En el Cuadro 4.3 se presentan los porcentajes de células espermáticas capacitadas, cuando los espermatozoides fueron incubados junto con células del oviducto de bovinos. En general, los diferentes períodos de incubación, tanto con semen "sin lavar" como con semen "lavado" los valores de capacitación fueron muy similares. Sin embargo, con 6 horas de incubación existió un mayor número de células espermáticas capacitadas ($\chi^2 = 4.97$, 3 gl, $P < 0.05$) en comparación con el resto de los períodos de incubación. No se detectó efecto del estatus del semen ni tampoco existió interacción entre el estatus del semen y

el tiempo de incubación durante el proceso de capacitación espermática.

Cuadro 4.3. Porcentaje de espermatozoides capacitados de caprinos "sin lavar" y "lavados" al ser incubados en células de la pared interior del oviducto de bovinos.

Hora de incubación	Semen sin lavar		Semen lavado		Combinación	
	Nº-	%	Nº-	%	Nº-	%
3	79/200	39.5	64/200	32.0	143/400	35.8 ^a
6	98/200	49.0	103/200	51.5	201/400	50.3 ^b
9	100/200	50.0	76/200	38.0	176/400	44.0 ^a
12	82/200	41.0	71/200	35.5	153/400	38.3 ^a
Combinación	359/800	44.9 ^a	314/800	39.3 ^a		

^{a, b}. Datos con letras distintas difieren P (< 0.05)

Experimento 3.

En el Cuadro 4.4 se muestran los porcentajes de células espermáticas capacitadas con suero sanguíneo de cabra en estro y heparina. Estos datos indican que el suero sanguíneo de cabra en estro fue menos efectivo para inducir la capacitación de los espermatozoides en comparación con la heparina ($\chi^2 = 68.9$, 1 gl, P < 0.01). Por otra parte, el lavado del semen no mejoró (P > 0.05) el porcentaje de espermatozoides capacitados. No existió interacción entre

tratamientos y estatus del semen en la capacitación de espermatozoides de caprinos.

Cuadro 4.4. Porcentaje de espermatozoides capacitados de caprinos "sin lavar" y "lavados" después de ser incubados en suero sanguíneo de cabra en estro y heparina.

Incubación	Semen sin lavar		Semen lavado		Combinación	
	Nº-	%	Nº-	%	Nº-	%
Suero 1 (h)	115/200	57.5	122/200	61.0	237/400	59.3 ^a
Heparina						
40 (min)	166/200	83.0	176/200	88.0	342/400	85.5 ^b
Combinación	281/400	70.3 ^a	298/400	74.5 ^a		

^{a, b}. Datos con letras distintas difieren P (< 0.01)

En la Figura 4.2 se muestran espermatozoides de machos cabríos capacitados vistos en contraste de fases a 400X. Se observan espermatozoides capacitados sin reacción acrosómica (1) y con reacción acrosómica (2). Además, se observan algunos espermatozoides normales. En la Figura 4.3 se observan espermatozoides de machos cabríos capacitados en la etapa de vesiculación.

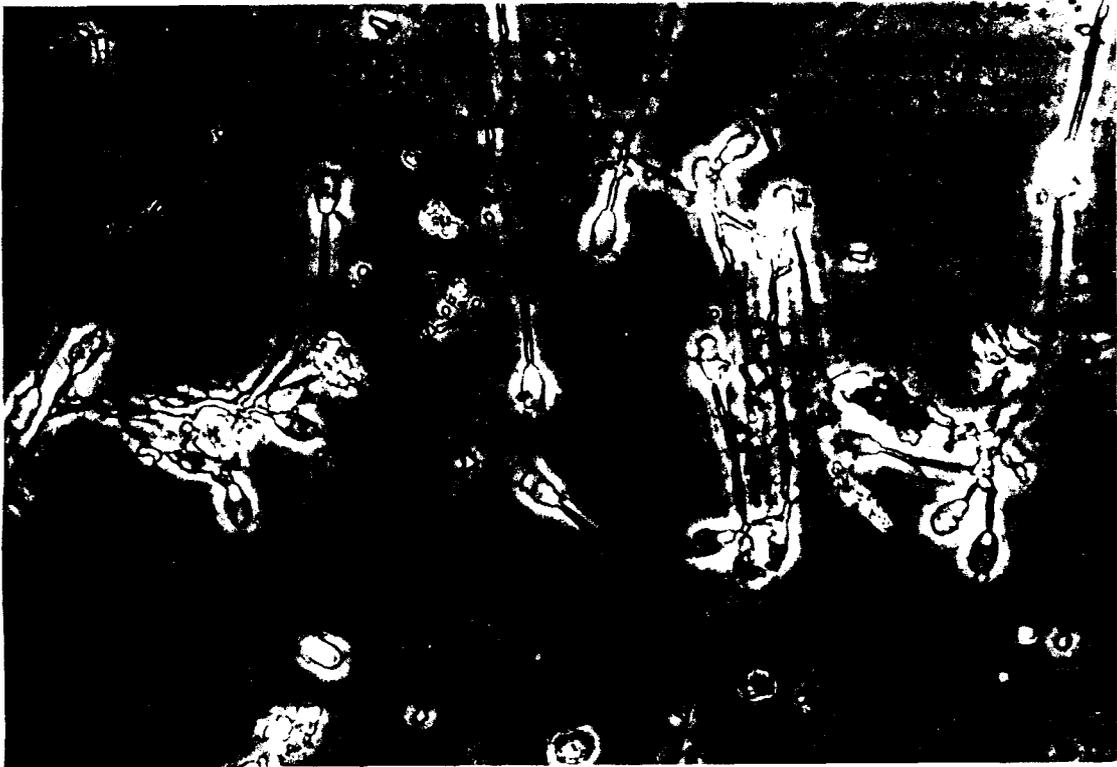


Figura 4.2. Espermatozoides de machos cabríos capacitados y no capacitados. 1) espermatozoide sin reacción acrosómica, 2) espermatozoide con reacción acrosómica (contraste de fases 400X).

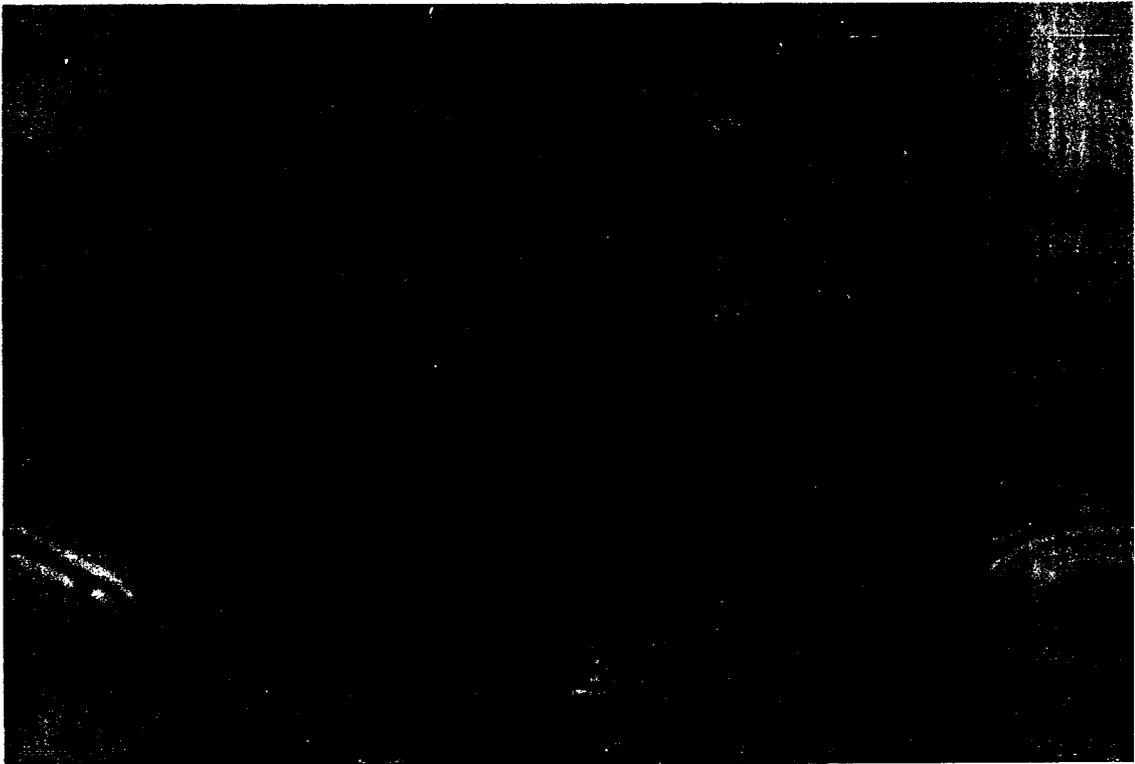


Figura 4.3. Espermatozoides de machos cabríos capacitados. Las flechas muestran espermatozoides vesiculados (contraste de fases 1,000X).

Fase 3.

En esta fase se realizó la fertilización in vitro utilizando oocitos de bovinos desnudados con NaOH, y espermatozoides de machos cabríos capacitados con heparina. Los resultados encontrados fueron exitosos, ya que de 15 oocitos, 10 (66.6 por ciento) fueron penetrados (observación de la descondensación de las cabezas de los espermatozoides). Aunque, claramente se observó que hubo

gran cantidad de espermatozoides alrededor de los oocitos de bovinos (Figura 4.5).

En la Figura 4.4 (A y B) se observan cabezas descondensadas de espermatozoides de machos cabríos en el ooplasma de los oocitos parcialmente desnudos de bovinos.

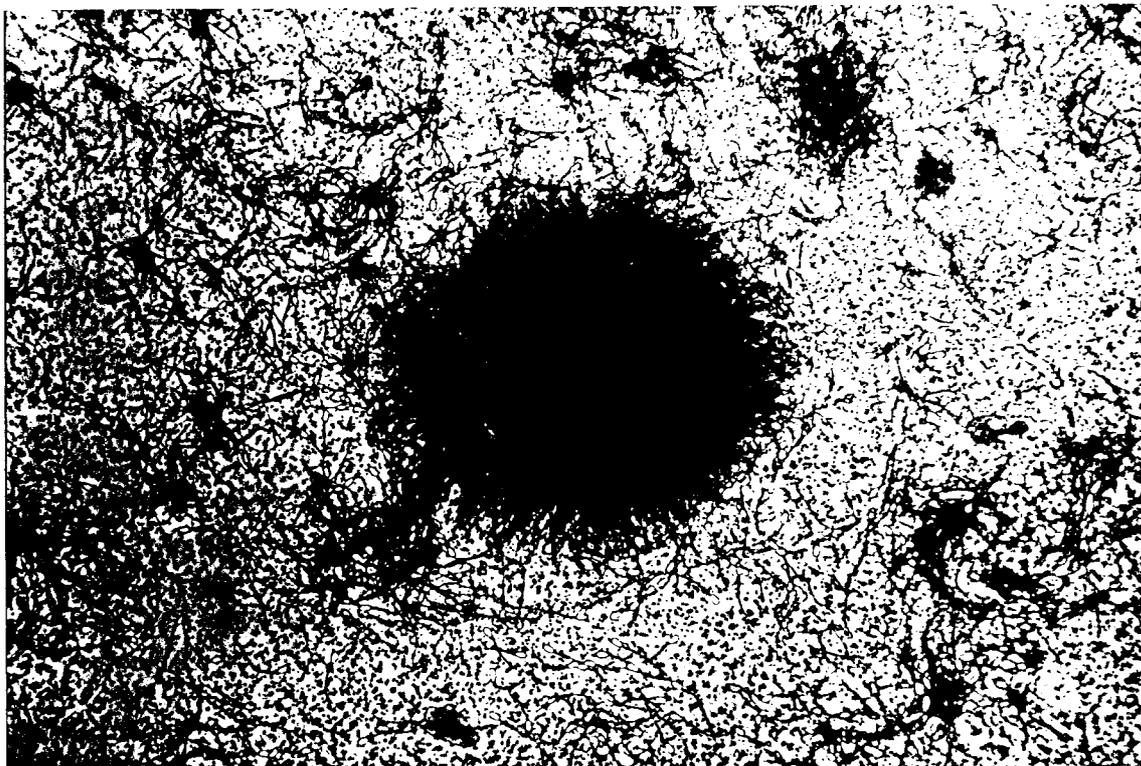


Figura 4.5. Espermatozoides de machos cabríos alrededor de un oocito de bovino desprovisto de las células de la granulosa (contraste de fases 100X).

DISCUSION

Fase 1.

El NaOH demostró ser una buena alternativa para la denudación de oocitos de bovinos (100 por ciento con una concentración de 1 N y un tiempo de exposición de 2.15 minutos). Estos resultados son similares a los logrados con métodos enzimáticos como la hialuronidasa (Yanagimachi et al., 1979; Fayner-Hosken y Brackett, 1987; Simon et al., 1993) y la tripsina (El-Gaafary et al., 1993). Además, también se demostró que usando el NaOH para la denudación parcial de oocitos de bovinos y posterior fertilización in vitro se obtienen buenos resultados.

Como ya se mencionó anteriormente, el NaOH fue eficaz para eliminar las células de la granulosa y erosionar la cara externa de la zona pelúcida, lo cual, posiblemente facilita la penetración de los espermatozoides. Algunas ventajas que se encontraron del NaOH sobre los métodos enzimáticos son: 1) menor costo, 2) se adquiere fácilmente en el mercado, 3) no es necesario manipular demasiado los oocitos de bovinos, y lo más

importante 4) la denudación es muy rápida (2 minutos de exposición).

Fase 2.

En la capacitación de los espermatozoides de machos cabríos Nubios, se obtuvieron diferentes resultados con los diferentes métodos utilizados. Los porcentajes de células espermáticas capacitadas después de ser incubados en oviductos de bovinos no sobrepasó el 20 por ciento. En este mismo experimento el semen "sin lavar" reflejó mejores resultados comparado con el semen "lavado". Esto es contrario a lo reportado por Hafez (1987) quien menciona, que el líquido seminal contiene factores anticapacitantes.

En la incubación de los espermatozoides caprinos Nubios con células de la pared interna de los oviductos de bovinos, se obtuvo el 50 por ciento de capacitación a las 6 horas de incubación, mostrándose una tendencia similar a las 9 horas. Sin embargo, esto demuestra que con 6 horas de incubación es suficiente. En contraste con la incubación en oviductos de bovinos, la incubación en células de los oviductos no refleja diferencia entre el semen "sin lavar" y "lavado". Estos datos resultaron mejores a los encontrados por Gutiérrez et al. (1994), quienes encontraron un 20.5 por ciento de espermatozoides de borrego con reacción del acrosoma, cuando estos fueron

incubados en células de los oviductos de hamster por 4 horas, y en células de los oviductos de borregas por 12 horas.

Por otra parte, se obtuvo el 60 por ciento de células espermáticas capacitadas cuando se utilizó suero sanguíneo de cabra en estro. De Smedt et al. (1992) encontraron que agregando 20 por ciento de suero de borregas en estro a 1 mililitro de medio DM-H que contenía 10 espermatozoides de caprinos, facilitaba la capacitación espermática (debido a la presencia de proteínas y albúmina presente en el suero, además, el suero contribuye en la limpieza del colesterol en las membranas de los espermatozoides) y aumenta la penetración y fertilización in vitro. Contrariamente, Fayrer-Hosken y Brackett (1987) encontraron que el suero de coneja no tuvo efecto en la capacitación (11.5 por ciento) de espermatozoides de conejos; pero el mayor porcentaje (83 por ciento aproximadamente) de células espermáticas capacitadas de machos cabríos se encontró cuando se utilizó la heparina. El estatus del semen no influyó en los resultados encontrados.

Cox et al. (1994) utilizaron heparina para la capacitación de espermatozoides de caprinos, al realizarse la fertilización in vitro. Los resultados de estos autores demostraron que el 82.7 por ciento de los oocitos madurados in vitro fueron penetrados, con lo cual, se cree que éste

mismo porcentaje influya sobre la capacitación de los espermatozoides de caprinos.

En otro estudio realizado por Iqbal y Hunter² (1995) sobre diferentes sistemas de capacitación de espermatozoides de bovinos, en el cual la heparina fue uno de los tratamientos; encontraron que a una temperatura de 39°C se alcanzaba el mayor porcentaje (77.1 por ciento) de penetración en oocitos de hamster sin células de la granulosa. La fertilización in vitro fue un indicador para determinar la capacitación espermática.

Mencionado lo anterior, se puede decir que los resultados encontrados en éste estudio son similares a los encontrados por Cox et al. (1994). Pero, superiores a los obtenidos por Iqbal y Hunter² (1995).

Fase 3.

La fertilización in vitro, se llevó a cabo bajo condiciones muy diferentes a las presentes en los estudios realizados en la última década. Dentro de estas condiciones se encuentra la utilización de una incubadora para huevo de ave, en la cual no se generó la atmósfera adecuada de Co₂ (5 por ciento) en aire y no se controló la humedad relativa (80 por ciento) como marcan muchos de los

investigadores citados. Otra condición que no se dio en el presente estudio, fue la esterilización de los materiales con los que se trabajaron en todos los experimentos. La asepsia en el presente estudio fue impregnar los materiales que entraban en contacto con los gametos con alcohol, provocando luego una flama para desinfectar a estos. Solamente las cajas petri donde se llevó a cabo la FIV estaban esterilizadas. Sin embargo, cabe mencionar también que con estos procedimientos se dieron resultados aceptables. Pero este tipo de situación no favorece al desarrollo de embriones.

Es muy probable que bajo condiciones estrictas de esterilidad de los materiales a utilizar, se logren mejores resultados a los encontrados en todos los experimentos en este estudio.

Los resultados encontrados en este estudio (66.6 por ciento de penetración) son similares a los obtenidos por Cox et al. (1994) donde utilizaron oocitos de bovino y ovino expuestos a espermatozoides de caprinos capacitados con heparina. Los resultados fueron 74.0 por ciento para oocitos de bovino y 68.42 por ciento para oocitos de ovino. Una variante de este trabajo, fue la utilización de oocitos madurados in vitro y posterior denudación.

CONCLUSIONES

1. El NaOH 1 N demostró ser una buena alternativa para la eliminación de las células de la granulosa de los oocitos.
2. De los diferentes métodos de capacitación de espermatozoides de machos cabríos Nubios, la utilización de heparina fue el más efectivo, seguido del suero de cabra en estro y de las células de la pared interior del oviducto de bovinos.
3. Para la penetración de los oocitos por los espermatozoides, no fue necesaria una atmósfera controlada (5 por ciento de Co_2 en aire y 80 por ciento de humedad), utilizada rutinariamente en este tipo de procesos.
4. Los oocitos de bovinos desnudados con NaOH no parecen ser dañados por este agente caústico y resultaron útiles en la determinación de la capacidad de fertilización in vitro de los espermatozoides de caprinos.

5. Esta técnica puede ser una alternativa importante para determinar la capacidad de fertilización in vitro de los espermatozoides.

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se utilizaron tres machos cabríos Nubios de aproximadamente 4 años de edad y cinco cabras Nubias adultas en la etapa de estro. Además, se utilizaron ovarios y oviductos de vacas sacrificadas en el rastro.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una técnica simple para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides de machos cabríos, utilizando oocitos de bovinos tratados con hidróxido de sodio (NaOH) y diferentes técnicas para la capacitación de los espermatozoides.

El trabajo se dividió en 3 fases. En la fase 1, se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición a NaOH para eliminar las células de la granulosa de oocitos de bovinos. En la fase 2, se evaluaron las siguientes técnicas de capacitación de los espermatozoides: incubación en oviductos de bovinos, en células de la pared interior de oviductos de bovinos, en suero sanguíneo de

cabra en estro y en heparina. En la fase 3, se evaluó la fertilización in vitro.

En la fase 1, se obtuvo el 100 por ciento de denudación (eliminación de las células de la granulosa y eliminación parcial de la zona pelúcida) de oocitos de bovinos, cuando se utilizó una concentración 1 N de NaOH y un tiempo de exposición de 2.15 minutos.

En la fase 2, se obtuvieron los siguientes resultados: 20 por ciento en oviductos de bovinos, 50 por ciento en células de la pared interior de oviductos de bovinos, 60 por ciento en suero sanguíneo de cabra en estro y 83 por ciento de células espermáticas capacitadas en heparina.

En la fase 3 del estudio se llevó a cabo la fertilización in vitro, utilizando una incubadora para huevo de ave. Se obtuvo un 66.6 por ciento (10/15) de penetración de los oocitos tratados con NaOH y expuestos a espermatozoides capacitados con heparina. En conclusión, esta técnica puede ser una alternativa importante para determinar la capacidad de fertilización in vitro de los espermatozoides de caprinos, dado que no fue necesario alta tecnología para obtener estos resultados.

LITERATURA CITADA

- Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful In Vitro Fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. of Reprod. 28:717 - 725.
- Barth, A.D. and R.J. Oko. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames. pp. 17 y 37.
- Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. (Suppl), 2:128-158.
- Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature. 184:466-467.
- Cox, J.F. 1992. Heterologous fertilization using livestock gametes. Arch. Med. Vet. 24:25-31.
- Cox, J.F., F. Saravia, J. Avila, A. Catalán and A. Santa María. 1992. Heterologous fertilization of intact sheep and cattle oocytes by goats spermatozoa. En: Proceedings XVII Annual Meeting of Chilean Society of Animal Production, Chillán. 63.
- Cox, J.F., A. Catalán, F. Saravia, J. Avila and A. Santa María. 1994. In vitro Fertilization of cattle and sheep follicular oocytes by goat spermatozoa. Small Ruminant Research. 15:55-58.
- Crozet, N., M.C. Theron and P. Chemineua. 1987. Ultrastructure of in vivo Fertilization in the goat. Gamete Research. 18:191-199.

- Crozet, N. 1991. Manipulation of oocytes and in vitro Fertilization. J. Reprod. Fertil. 43(Suppl):235-243.
- De Smedt, V., N. Crozet, M. Ahmed, A. Martino and Cognié. 1992. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. Theriogenology 37:1049-1060.
- Didion, B.A., J.R. Dobrinsky, J.R. Giles and C.N. Graves. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction of spermatozoa of various species. Gamete Research. 22:51-57
- El-Gaafary., C.N. Graves and P.V. Goncalves. 1993. Re-activated bull spermatozoa: motility, acrosome status and ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. Animal Repr.Sci. 32:163- 172.
- Fayrer-Hosken, R.A. and B.G. Brackett. 1987. Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for in vitro Fertilization. Gamete Research. 17:191-201.
- Guienne, B.M., P. Humblot, M. Thibier and C. Thibault. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro Fertilization tests. Reprod. Nutr. Dev. 30:259-266.
- Gutiérrez, A., J. Garde., C. García-Artiga and Vázquez. 1994. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an in vitro model for the study of capacitation and the acrosome reaction. Molecular Reprod. and Dev. 36(3) 338-345.
- Hafez, E.S.E. 1987. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5a. edición Interamericana. pp. 223-228.
- Hanada, A. 1985. In vitro Fertilization in goats. Jpn. J. Anim. Reprod. 31:21-26.
- Iqbal, N. and A. G. Hunter². 1995. Comparison of Bovine Sperm Capacitation Systems for Ability of Sperm to Penetrate Zona-Free Hamster Oocytes and

Bovine Oocytes Matured In Vitro¹. J Dairy Sc
78:77-83.

Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bu
spermatozoa and Fertilization in vitro
cattle follicular oocytes matured in cultur
J. Repr. Fert. 50:119-121.

Leibfried, M.L. and B.D. Bavister. 1983. Fertilizabili
of in vitro matured oocytes from gold
hamsters. J. Exp. Zoology. 226:481-485.

Leibfried, M.L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L.
Northey and N.L. First. 1987. Developme
potential of bovine oocytes matured in vitro
in vivo. Biol. of Repr. 36:376-383.

Lu, K.H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 198
Pregnancy established in cattle by transfer
embryos derived from in vitro Fertilization
oocytes matured in vitro. Veterinary Recor
121:259-260.

Mattioli, M., G. Galeati, M.L. Bacci and E. Sere
1988a. Follicular factors influence oocy
fertilizability by modulating t
intercellular cooperation between cumul
cells and oocyte. Gamete Research. 21:223-232.

Mattioli, M., G. Galeati and E. Seren. 1988b. Effect
follicle somatic cells during pig oocy
maturation on egg penetrability and ma
pronucleus formation. Gamete Research. 20:17
183.

Mendoza, H. J. M. 1983. Diagnóstico climatológico para
zona de influencia inmediata de la UAAA
México, D.F. pp. 2-3.

Mortimer, R. G., G. W. Boyd and D. L. Morris. 199
Evaluating the impact of body condition
production parameters in beef cows. Veterina
Medicine. pp. 1030-1036.

Nagai, T., T. Takahashi, H. Masuda, Y. Shioya,
Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and
Hanada. 1988. In vitro Fertilization of p

- oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 84:585-591.
- O'Rand, M.G. 1988. Sperm recognition and barriers to inter-species fertilization. *Gamete Research.* 19:315-328.
- Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Bedirian and R.D. Baker. 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-815.
- Simon, A., D. Palanker, V. Harpaz-Eisenberg, A. Lewis and N. Laufer. 1993. Interaction between human sperm cells and hamster oocytes after argon fluoride excimer laser drilling of the zona pellucida. *Fertility and Sterility.* 60:159-164.
- Slavík, T. and J. Fulka. 1992. In vitro Fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology.* 38:721-726.
- Slavík, T., A. Pavlok and J. Fulka. 1990. Penetration of intact bovine ova with ram sperm in vitro. *Molec. Reprod. Dev.* 25:345-347.
- Song, H.B. and A. Iritani. 1985. In vitro Fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Proceeding 3rd AAAP Anim Sci Cong. Seoul, Korea.* 1:463.
- Sundhey, R., S.P. Ahuja and B. Singh. 1994. Changes in membrane proteins of cauda spermatozoa of goat bucks during in vitro capacitation. *Small Ruminant Research.* 15:59-66.
- Trish, B. 1989. Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology.* 32:69-77.
- Vajta, G., Z. Macháty, Zs. Bárándi, A. Soós and L. Solti. 1991. Transfer of in vitro fertilized and cultivated swine embryos. *Theriogenology.* 35:289.

- Watson, P.F. 1975. Use of a giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet. Rec. 97:12-15.
- Xu, K.P., T. Greve, H. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. 81:501-504.
- Yanagimachi, R., A. Lopata, C.B. Odom, R.A. Bronson, C.A. Mahl and G.L. Nicolson. 1979. Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Fertility and Sterility. 31:562-574.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. En: Knobil. The Physiology of Reproduction. pp. 135-185.
- Younis, A.I., K.A. Zuelke, K.M. Harper, M.A.L. Oliveira and B.G. Brackett. 1990. Pregnancies after embryo transfer of in vitro fertilized goat oocytes. Biol. Reprod. 42:128.
- Younis, A.I., K.A. Zuelke, K.M. Harper, M.A.L. Oliveira and B.G. Brackett. 1991. In vitro Fertilization of goat oocytes. Biol. of Reprod. 44:1177-1182.