UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

ESTADO FUNCIONAL DE LA MEMBRANA, CAPACITACIÓN *IN VITRO*, REACCIÓN ACROSOMAL Y CAPACIDAD DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS ALMACENADOS EN UN DILUYENTE DE LARGA DURACIÓN

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

J. JESÚS CONEJO NAVA

Julio 2003

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

J. JESUS CONEJO NAVA

El día 30 de julio de 2003

COMITÉ TUTORIAL:

Tutor: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

Asesora: DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

Asesor: DR. CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR

Sinodal: DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Sinodal: DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR “C” Y PROFESOR DISTINGUIDO DE LA UAM-I, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

ASESORA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR “C” DE LA UAM-I, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

ASESOR

DR. CARLOS GUILLERMO GUTIÉRREZ AGUILAR

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR “B” DE LA FMVZ-UNAM, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Dr. José Miguel Betancourt, a la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana y al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por el invaluable apoyo recibido durante la realización de este trabajo de tesis. Agradezco al Dr. Salvador Romo García y a la Dra. María Elena Trujillo Ortega por haber aceptado la revisión del presente trabajo y por ser miembros de mi jurado. A los compañeros maestros y estudiantes del Laboratorio de Biología Celular de la DCBS de la UAM-I agradezco su hospitalidad; en ellos encontré un ambiente de trabajo agradable, de colaboración y exigencia académica. Mi reconocimiento para Yvonne Ducolomb y Colett Vázquez Juárez quienes me apoyaron en la realización del ensayo de fertilización *in vitro.* Durante mi estancia de más de tres años, conté con la amistad y la colaboración de Héctor Zayas Pérez, José Antonio Herrera Barragán, Eduardo Casas y del Dr. Humberto González Márquez. Jorge Lodigiani me apoyó en la digitalización de imágenes. Doy las gracias al Departamento de Comunicaciones de la UAM-I, y a su personal que cada quince días nos transportó sin incidentes para recoger las muestras de material biológico. Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de la Secretaria de Educación Publica (P/PROMEP: UMICH-99-11-01), quienes me proporcionaron una beca para la realización de los estudios de doctorado. Dedico esta tesis a mi familia; a mis hijos (Ulises y Alejandro), a mi madre (María Cruz Nava Romero), a mi hermano Alberto y su familia, pero sobre todo a Teo, mi esposa y compañera.

RESUMEN.

La inseminación de cerdas con semen conservado en diluyentes de larga duración a 15-18° C por más de cinco días, resulta en una disminución en la tasa de partos y/o el tamaño de camada, aún cuando los espermatozoides muestran una alta movilidad progresiva. Con el propósito de mejorar éste sistema de conservación es necesario comprender la fisiología del espermatozoide diluido. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tiempo de almacenamiento (0, 2, 4, 6, 8 días) de los espermatozoides de cerdo sobre el estado funcional de la membrana y la habilidad para responder a la capacitación *in vitro*, a la reacción acrosomal inducida con P_4 y la capacidad de fertilización *in vitro*. Se analizaron 10 muestras de semen de cinco cerdos adultos. Dos alícuotas fueron obtenidas de la fracción rica en espermatozoides: una fue utilizada para evaluar el semen fresco y la otra fue diluida en el extensor Reading y almacenada a 16°C. Las muestras de semen fueron teñidas con clorotetraciclina (CTC) para determinar el estado funcional de la membrana plasmática y con Hoechst 33258 para evaluar la viabilidad. Se prepararon laminillas por duplicado y se contaron 200 células espermáticas por cada preparación observada y el estado funcional de la membrana se determinó según el patrón de tinción con CTC: espermatozoides no capacitados, espermatozoides capacitados y espermatozoides con reacción acrosomal (RA). Adicionalmente, se evalúo la capacidad fertilizante de los espermatozoides almacenados, para ello se realizaron 6 ensayos de FIV y se emplearon 900 ovocitos. Los resultados fueron

sometidos a análisis de varianza mixto con mediciones repetidas. Se encontró que el almacenamiento del semen, del cuarto al octavo día, produjo un incremento ($p<0.05$) en la proporción de espermatozoides capacitados (*capacitación por almacenamiento*). Además, después de 4 días de almacenamiento, un estimulo adicional como la capacitación *in vitro* no logró incrementar ($p>0.05$) el porcentaje de espermatozoides capacitados con respecto al tratamiento testigo, pero, si aumentó el porcentaje de espermatozoides reaccionados ($p<0.05$). La adición de P_4, antes o después de la capacitación *in vitro,* no logró aumentar ($p>0.05$) la proporción de espermatozoides con RA en el semen fresco y diluido en todos los tiempos de almacenamiento. Los ensayos de FIV demostraron que la "capacitación por almacenamiento" no disminuyó la habilidad fertilizante de los espermatozoides bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, es muy posible que en programas de IA ésta sea una de las causas que disminuyen la habilidad fertilizante del semen porcino.

Palabras clave: Capacitación, clorotetraciclina, conservación de semen, diluyentes de larga duración, espermatozoide porcino, estado funcional de la membrana, reacción acrosomal, fertilización *in vitro*.

ABSTRACT.

Preservation of porcine semen in long-term extenders at 15 to 18°C for more than 5 days results in decreased farrowing rates and reduced litter size after artificial insemination (AI), despite high progressive motility rates of sperm. To improve this preservation system it is necessary to understand sperm physiology under storage conditions. The purpose of this study was to determine the effect of storing diluted porcine semen (during 0, 2, 4, 6 and 8 days) on sperm membrane status and the ability of sperm to respond to *in vitro* capacitation, acrosomal reaction and its capacity to *in vitro* fertilization (IVF). Ten semen samples from five adult boars were analysed. Two aliquots were obtained from the sperm rich fraction: one was used to assess fresh semen and the other was diluted in Reading extender and stored at 16°C. Both semen samples were stained with chlortetracycline to assess the status of sperm membranes, and with Hoechst 33258 to determine viability. Additionally, to evaluate the capacity of *in vitro* fertilization of stored spermatozoa 6 essays of IVF were made using 900 oocytes from prepuberal gilts. Semen storage for 4, 6 and 8 days increased the proportion of prematurely capacitated sperm (18.7±2.5, 28.8±2.9 and 37.2±3.3 % respectively, $p<0.05$) (*storage capacitation*). After 4 days of storage, *in vitro* capacitation treatment did not increase the percentage of capacitated sperm ($p>0.05$), but increased the percentage of acrosome reacted sperm ($p<0.05$). The P_4 addition, after or before *in vitro* capacitation treatment, did not increase the percentage of AR sperm in the fresh and diluted semen at all storage times with

respect to the control group ($p>0.05$). It was observed that capacitation during storage not reduce the fertilizing ability of spermatozoa ($p>0.05$). However, it is possible that "storage capacitation" might be one of the causes that decrease the fertilizing ability of porcine semen in AI programs.

Key words: Acrosome reaction, boar sperm, capacitation, chlortetracycline, long-term extenders, membrane status, semen preservation, *in vitro* fertilization.

INDICE DE CONTENIDO.

1. MARCO TEORICO..... 1

1.1. Inseminación artificial y conservación de semen porcino. 1

1.2. Conservación de semen porcino en diluyentes de larga duración..... 3

1.3. Cambios morfológicos y fisiológicos de los espermatozoides en el tracto genital de la cerda..... 7

2. ANTECEDENTES. 21

2.1. Efecto del frío (15°C) sobre la desestabilización de la MP. 21

2.2. Efecto de la conservación del espermatozoide porcino a 15-18°C sobre la capacitación *in vitro*..... 23

2.3. Efecto del almacenamiento del semen sobre la capacidad de fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos homólogos y heterólogos. 24

3. JUSTIFICACIÓN. 26

4. PLANTEAMIENTO DE LAS HIPOTESIS. 27

5. OBJETIVOS. 28

5.1. Objetivo general. 28

5.2. Objetivos particulares. 28

6. MATERIAL Y METODO. 29

6.1. Colección, dilución y almacenamiento del semen. 29

6.2. Experimentos y tratamientos del semen. 30

6.3. Procedimientos para la evaluación del semen 31

6.3.1. Movilidad progresiva.....31

6.3.2. Viabilidad y estado funcional de las membranas espermáticas.....31

6.3.3. Capacitación *in vitro*.....33

6.3.4. Inducción de RA con P_4.....33

6.3.5. Procedimiento para la FIV.....34

6.4. Evaluación de la FIV. 36

6.5. Análisis estadístico. 37

7. RESULTADOS. 38

7.1. Efecto del tiempo de almacenamiento en la movilidad progresiva y la viabilidad espermática..... 38

7.2. Estado funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo mediante CTC..... 39

7.3. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen en el estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. 41

7.4. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la capacitación *in vitro* por 4.5 h en el estado funcional de los espermatozoides. 41

7.5. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la adición de P_4 (por 15 min.) en el estado funcional de los espermatozoides..... 43

7.6. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la capacitación *in vitro* +P_4 en el estado funcional de los espermatozoides..... 44

7.7. Efecto de cuatro tratamientos del semen porcino en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. 46

7.8. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino sobre la capacidad de fertilizar ovocitos homólogos *in vitro*. 49

8. DISCUSION. 50

9. CONCLUSION. 59

10. LITERATURA CITADA. 60

11. APENDICE. 71

12. DIFUSIÓN DE RESULTADOS. 76

12.1. Articulo científico. 76

12.2. Artículos *in extenso*. 76

12.3. Resúmenes. 77

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diluyentes de larga duración utilizados en la conservación del semen porcino.....4

cuadro 2. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino sobre la viabilidad espermatica y la movilidad progresiva (n=10) (promedios ± ee). 39

cuadro 3. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino en el estado funcional de los espermatozoides (n=10) (% promedio ± ee).....42

cuadro 4. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen en la capacitación *in vitro* de espermatozoides porcinos (n=10) (% promedio ± ee).....43

cuadro 5. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la adición de p_4 por 15 min. en el estado funcional de los espermatozoides (n=10) (% promedio ± ee).....44

cuadro 6. Efecto del tiempo de almacenamiento en la capacitacion *in vitro*+p_4 de espermatozoides porcinos (% promedio ± ee) (n=10). 45

cuadro 7. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen sobre la capacidad de fertilización *in vitro* (% promedio ± ee) (n=6)..... 49

INDICE DE FIGURAS

Figura1. Mecanismos moleculares de la capacitación de espermatozoides de mamífero.....15

Figura 2. Mecanismos moleculares del proceso de RA en espermatozoides de mamífero.....18

Figura 3. Estados funcionales de la membrana plasmática en espermatozoides de cerdo teñidos con CTC.....40

Figura 4. Estado fisiológico de la membrana plasmática determinado por CTC en espermatozoides sometidos a cuatro tratamientos. 48

1. MARCO TEORICO.

1.1. Inseminación artificial y conservación de semen porcino.

En las últimas dos décadas, la inseminación artificial (IA) ha tenido un crecimiento vertiginoso a nivel mundial. Hace 20 años, Reed [60] estimó que de 7 millones de cerdas que fueron inseminadas con semen conservado en estado líquido, solamente 20 mil se inseminaron con semen congelado-descongelado. Decuadro-Hansen [15], calculó que para el año 2000 el 25 % del inventario mundial de hembras reproductoras (72 millones) sería inseminado y Johnson [40] predijo que para el 2008, la cifra ascenderá al 75 % del inventario mundial.

El auge de la IA ocurrió especialmente en aquellos países donde un elevado número de animales se concentra en algunas regiones, como en Dinamarca y Holanda, o que poseen unidades de producción de gran tamaño, como los países Ex-Socialistas de Europa Oriental [61]. Actualmente, en varios países europeos se insemina más del 50% de la piara reproductora [39].

En México, en 1987 se inauguró el primer centro de procesamiento de semen porcino, en la región del Bajío; en 1992 se calculó que un 3 % de las reproductoras eran inseminadas [13] y cinco años más tarde se estimó un 30 % [15].

Uno de los aspectos más importantes para el desarrollo de la IA ha sido el diseño de diluyentes, cuyas funciones son: mantener la viabilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides el mayor tiempo posible, aumentar el volumen del eyaculado para inseminar el máximo número de cerdas, con la mejor higiene y el mínimo costo. Esto es necesario, ya que el semen porcino en estado fresco conserva la viabilidad espermática solamente por un periodo de 2 a 3 horas, sin afectar el tamaño de camada y la fertilidad de las cerdas [46].

En la mayoría de los países, la industria de la IA utiliza diluyentes de corto periodo de almacenamiento para conservar el semen porcino, los cuales mantienen su capacidad fertilizante de 1 a 3 días, a una temperatura de 15-18°C [40]. Hofmo *et al.* [29] inseminaron 27, 588 cerdas con semen diluido en BTS o Kiev a una concentración espermática de 2×10^9; concluyeron que este sistema es capaz de conservar el semen porcino hasta 60 horas, y después de este momento la fertilidad y la prolificidad descienden.

El corto periodo de conservación del semen continúa siendo una limitación para la difusión de la IA porcina, principalmente en aquellos países y regiones que poseen pequeñas y medianas unidades de producción y están dispersas. Incluso, en las actuales condiciones donde la IA ha prosperado, sería económicamente ventajoso, contar con un sistema de conservación del semen porcino de larga duración, ya que se reducirían las tasas de desecho de semen por caducidad, disminuirían los costos de transportación y de mano de obra, existiría una mejor

planeación en el manejo de los verracos y en la producción de dosis de semen, y se facilitaría su comercio internacional [24, 31, 82].

La criopreservación del semen a temperatura de –196°C, es un procedimiento que prolonga la capacidad fertilizante de los espermatozoides por varios años, pero solo ha tenido éxito en bovinos. Se han desarrollado varios procedimientos para conservar a los espermatozoides de cerdo, pero debido a su gran sensibilidad al frío, se produce una notable disminución de su capacidad fertilizante; expresándose en una baja tasa de fertilidad y un menor tamaño de camada (59.2% y 8.8 lechones) [22], con respecto a la monta natural (80.5% y 10.5 lechones, respectivamente) y a la IA con semen diluido (82% y 10.0 lechones, respectivamente) [13]. Por ello, el empleo de semen congelado se ha restringido solamente a hatos núcleo o a hatos comerciales, que poseen programas de mejoramiento genético para la producción de hembras de reemplazo [11].

1.2. Conservación de semen porcino en diluyentes de larga duración.

Una alternativa a los diluyentes de corto periodo de almacenamiento y a la criopreservación, son los diluyentes denominados de larga duración (long-term extender) [82] o de larga vida (long life) [30]. En la literatura especializada se ha informado de unos 13 diluyentes de este tipo (cuadro 1) y en algunos no se conoce su composición química por razones comerciales.

CUADRO 1. DILUYENTES DE LARGA DURACIÓN UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN PORCINO.

DILUYENTE	DIAS DE ALMACENAMIENTO	AUTOR O EMPRESA Y AÑO	PAÍS
SCK-7	6-7	Masterbreeders,1975	Inglaterra
Zorlesco	8-10	Gottardí *et al.* 1980	Italia
Butschwiler	3-4	Summermater, 1984	Alemania
MR-A	7-8	Martín-Rillo. 1984	España
Zorpva	4	Cheng,1985	Inglaterra
Schonow	4	Peter *et al.* 1984	Alemania
BW-25	4-6	Weitze *et al.* 1988	Alemania
Androhep	4-6	Weitze *et al.* 1988	Alemania
Reading	5-6	Revell y Glossop, 1989	Inglaterra
GEPZ	6	Becerril *et al.* 1990	México
SUS	-	Medi-chimica, 1997	Italia
X-Cell	5-6	Kuster y Althouse,1999	E.U.A.
Vital	-	Biotech, 1997	E.U.A.

Fuente: Modificado de Conejo-Nava, 1995 (13).

Varios autores revisaron el tema y concluyeron que la conservación del semen porcino en diluyentes de larga duración a 15-18° C, por más de cinco días, provoca una disminución en la tasa de partos, aún cuando se presenta una alta movilidad

progresiva [3, 14, 32, 39]. También, se ha observado una reducción del tamaño de la camada en el semen conservado en MR-A [44], Androhep [77], Reading [61] y Modena [43].

Adicionalmente, se sabe que estos diluyentes incluyen en su composición química, ingredientes como la albúmina sérica bovina fracción V (BSA) y amortiguadores orgánicos (Hepes, MOPS), que elevan significativamente el costo de su elaboración y consecuentemente el de las dosis de semen con respecto a los diluyentes de corta duración, como el BTS (Beltsville Thaw Solution) y el Kiev [3]. La prolongación de la capacidad fertilizante del semen de 3 a 5 días a través de los diluyentes de larga duración, pudiera no justificarse por el mayor costo. Por todo lo anterior, es necesario mejorar este sistema de conservación.

En el presente trabajo se ha elegido al extensor Reading [61], como un modelo para estudiar la fisiología del espermatozoide porcino en diluyentes de larga duración ya que ofrece las siguientes ventajas:

Primera. La composición química del Reading es conocida, lo que permite su preparación en el momento más adecuado y controlar su calidad, ya que en su elaboración se pueden utilizar los mismos lotes de reactivos.

Segunda. Su elaboración es más económica, que la de aquellos diluyentes de larga duración que contienen albúmina sérica bovina (por ejemplo, Zorlesco y Androhep), o amortiguadores orgánicos, como el Androhep.

Tercera. Se puede conservar el eyaculado total y no solamente la fracción rica en espermatozoides, como lo exige el resto de los diluyentes de larga duración, logrando con ello obtener un mayor número de dosis.

Cuarta. Los resultados de fertilidad y tamaño de camada de las cerdas inseminadas con semen almacenado en Reading son parecidos a los obtenidos con los diluyentes de larga duración. Revell y Glossop [61], observaron con semen de 4-5 días de almacenado en Reading, un porcentaje de preñez de 83 % y 13 embriones y con semen de 5-6 días de almacenado ambos parámetros descendieron a 75 % y 9.3, respectivamente. Al sexto día de almacenamiento, encontraron 40 a 50 % de movilidad progresiva y 61 a 79 % de acrosomas normales.

Con el propósito de mejorar el sistema de conservación del semen en diluyentes de larga duración, es necesario conocer las causas que producen el descenso de su capacidad fertilizante durante el almacenamiento. Se plantea como estrategia conocer los cambios morfológicos y fisiológicos que experimentan los espermatozoides en el medio ambiente bioquímico que los diluyentes les proporcionan, ya que por estudios *in vitro* e *in vivo* se sabe que los espermatozoides

experimentan transformaciones morfológicas y fisiológicas en el tracto genital de la cerda.

1.3. Cambios morfológicos y fisiológicos de los espermatozoides en el tracto genital de la cerda.

Los espermatozoides son células altamente especializadas producidas en los testículos y tienen como funciones: transportar la información genética del macho hasta el óvulo y activarlo, ya que se encuentra detenido en metafase II [85].

Los espermatozoides eyaculados adquieren la habilidad de moverse progresivamente en el epidídimo, pero, aún no tienen la capacidad de interactuar con los ovocitos y fertilizarlos. Ellos obtienen esta habilidad, después de residir algún tiempo en el tracto genital de la hembra, durante el cual los espermatozoides experimentan un conjunto de cambios fisiológicos y bioquímicos denominados como capacitación. Solamente los gametos masculinos capacitados tienen la habilidad de interaccionar con los ovocitos y experimentar la reacción acrosomal [85]. Los espermatozoides eyaculados en el tracto genital de la hembra pasan por las siguientes etapas fisiológicas: No capacitado, capacitado y con reacción acrosomal [74]. Finalmente, el espermatozoide con RA penetra al ovocito y lo fertiliza o muere. Estos eventos ocurren de manera secuencial y son controlados por el tracto genital de la hembra.

Espermatozoides no capacitados. Durante la monta natural (MN) la cerda recibe 30-60 X 10^9 espermatozoides en 150-200 ml de semen fresco [23] y mediante IA, de 2-6 X 10^9 espermatozoides en 80-100 ml de semen diluido [3]. La mayoría de los espermatozoides eyaculados (84%) se encuentran sin capacitar [49] y son depositados dentro del útero de la cerda [33].

Los espermatozoides no capacitados están cubiertos casi totalmente por la membrana plasmática (MP), la cual los divide en cinco dominios o regiones, formados durante la elongación de las espermátidas: segmento acrosomal, segmento ecuatorial, segmento posacrosomal, pieza media y pieza principal. Únicamente la pieza terminal de la cola no está cubierta por la membrana plasmática. Cada uno de los dominios esta claramente separado por una barrera estructural y funcional. El ecuador divide la porción caudal de la cabeza del segmento acrosomal. El anillo posterior separa la cabeza de la pieza media y el *annulus* separa la pieza media de la principal. De esta manera, la MP proporciona al espermatozoide una superficie altamente regionalizada en su estructura y en sus funciones [6, 17].

En cada dominio de la MP, los lípidos, las proteínas y los carbohidratos se distribuyen de manera diferente [17]. Los lípidos, muestran una distribución asimétrica en la bicapa; la lamina interna o citoplasmática contiene fosfatidil serina (PS), fosfatidil etanolamina (PE) y fosfatidil inositol (PI); mientras que la lamina

externa o exoplasmática contiene fosfatidil colina (PC), esfingomielina (SM) y glicerol. Una pérdida de la asimetría de las membranas espermáticas por la acción de la ATP-amino fosfolipotranslocasas o "flipasas" [84], redefine la función de la región de la MP afectada [42].

Cada región o dominio de la MP tiene una función especifica. El segmento acrosomal es el sitio de unión del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) y en este mismo sitio ocurre la RA. El segmento ecuatorial, es el sitio de fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito y evita que se difundan los componentes de la región acrosomal a la posacrosomal y viceversa. La pieza media, une la cola con la cabeza y contiene las mitocondrias involucradas en la producción de energía. El segmento principal proporciona el movimiento del espermatozoide y, éste cambia en tipo y velocidad, en los diferentes estados funcionales [17].

Una característica importante de los espermatozoides es que no conservan la capacidad de síntesis de moléculas que poseían las espermatogonias. No obstante, la MP de los espermatozoides eyaculados está muy lejos de ser una estructura inerte; mantiene un gran dinamismo para interactuar con los líquidos y células epiteliales del tracto genital de la hembra y consecuente experimentar una profunda reorganización molecular en el oviducto hasta que el espermatozoide alcance la capacidad de fertilizar ovocitos [19, 73].

Los millones de espermatozoides depositados dentro del útero de la cerda, durante la MN o la IA, son transportados por las contracciones peristálticas del miometrio hasta la unión útero-tubárica (UUT). Muchos de los espermatozoides son rápidamente eliminados por reflujo a través del cérvix y la vagina y una cantidad excesiva en el oviducto puede ser eliminada transportándolos hasta la cavidad peritoneal [67]. También ocurre una inflamación fisiológica en el útero y el oviducto, generándose una infiltración de leucocitos y fagocitosis de los espermatozoides muertos y dañados [63-65]. A pesar de que durante el apareamiento se depositan más de 30 mil millones de espermatozoides en el útero de la cerda, solo algunos miles logran atravesar la UUT por movimientos propios (migración) y alcanzar la región del istmo. Todavía un número menor de espermatozoides (4 a 5 mil, en cada oviducto) logra adherirse a las células epiteliales de esta región del oviducto [35] y permanecer ahí durante un lapso de por lo menos 12 horas hasta que ocurre la ovulación [39].

Los espermatozoides no capacitados tiene la habilidad de adherirse a las células epiteliales del oviducto y durante este periodo de adhesión su movilidad se suprime [34], las tasas de capacitación son bajas y su viabilidad se prolonga [18, 68].

Espermatozoides capacitados. Los espermatozoides no capacitados deben prepararse para fertilizar a los ovocitos, lo que ocurre después de residir varias horas en el tracto genital de la hembra. Poco antes de la ovulación, subpoblaciones de

espermatozoides no capacitados adheridos al oviducto, comienzan a experimentar cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que en conjunto se denominan como capacitación [85].

Se cree que la capacitación y subsiguiente liberación de los espermatozoides de las células epiteliales están reguladas por el ovario y dependen de eventos locales desencadenados por la ovulación, particularmente de los gradientes de hormonas esteroides y los niveles de Ca^{2+} en el liquido del oviducto [36, 50].

El mecanismo de la capacitación espermática es muy complejo, por ello ha sido intensamente investigado bajo condiciones *in vitro*. En base a estos estudios Flesch y Gadella [19] propusieron el siguiente modelo (figura 1), el cual debe ajustarse a las condiciones *in vivo*: La capacitación espermática se inicia en la MP, donde recibe varias señales que luego se internalizan a la célula. En primer lugar, la MP experimenta una pérdida de colesterol a través de la acción de la BSA. Se creé que esto genera un incremento de la permeabilidad de la MP y consecuentemente el ingreso del bicarbonato de sodio a la célula [19]. Recientemente se ha planteado que en el espermatozoide porcino la extracción del colesterol de la MP no es un mecanismo importante en la capacitación, ya que la relación colesterol:fosfolípidos es más baja (0.22) que en el espermatozoide bovino (0.4) y humano (0.99). Se ha demostrado que en la especie porcina es más importante el bicarbonato de sodio y el Ca^{2+}, que el colesterol en el proceso de capacitación [70].

El bicarbonato de sodio se introduce a la célula a través de los canales iónicos de la MP o por difusión conjuntamente con el CO_2, activa la adenil ciclasa (AC) y, consecuentemente la producción de AMPc, que a su vez activa a la proteína quinasa A (PKA). La PKA fosforila la tirosina de las proteínas de la MP [19] ya sea activando la proteína tirosina quinasa (PTK) o inhibiendo la tirosina fosfatasa (PTP) [19].

La PKA activada induce la fosforilación de varias proteínas de la MP e intracelulares, generando varios efectos:

a) Fosforila la tirosina de la fosfolipasa C (PLC), la cual induce una redistribución lateral de los seminolípidos, la traslocación de los amino fosfolípidos (fosfotidil etanol amina y fosfotidil serina) y consecuentemente una pérdida de la asimetría de la MP [19], lo cual juega un papel importante en los procesos de adhesión y fusión celular. La traslocación de los amino fosfolípidos es un proceso dependiente de una "scramblasa" [54].

b) Fosforila la tirosina de proteínas de la MP y los receptores de unión a ZP y consecuentemente los activa [19].

c) La PKA también participa en la fosforilación de proteínas que regulan la movilidad espermática. La PKA fosforila a la dineína; mientras que una fosfatasa dependiente de calmodulina, la

defosforila. La dineína fosforilada regula el deslizamiento de los microtúbulos del axonema, desencadenando y manteniendo la hiperactivación de la movilidad del espermatozoide [52].

La entrada a la célula de pequeñas cantidades de Ca^{2+} extracelular, en una concentración mucho menor (90 μM) con respecto a la existente durante la RA (1,800 μM), induce la capacitación. Se han postulado varios mecanismos a través de los cuales el Ca^{2+} extracelular pasa al interior de la célula a través de la MP, tales como: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, ATPasas, intercambiador Na^{+}/ Ca^{2+} y otros. Existe también Ca^{2+} en el acrosoma, pero lo más probable es que esté inmovilizado por las proteínas o en forma de cristales por el pH ácido del contenido acrosomal. El Ca^{2+} intracelular permanece en forma libre en el citoplasma, ya que el espermatozoide carece de un reservorio, por no tener retículo endoplásmico, y las mitocondrias se encuentran fuera de la cabeza. Por esta razón se ha propuesto que los bajos niveles de ión libre intracelular se deben a una ATPasa-Ca^{2+} regulada por calmodulina que inhibe la capacitación. El bloqueo de este mecanismo incrementa los niveles de Ca^{2+} libre y consecuentemente la capacitación. De esta manera, el control de los niveles de Ca^{2+} libre intracelular previene la capacitación prematura de las células espermáticas. No se conoce exactamente el mecanismo de acción del Ca^{2+} intracelular, pero se considera que actúa indirectamente en el proceso de activación de la PKA, activando la fosfodiesterasa, que cataliza la transformación del ADPc en AMPc [19]

Durante la capacitación el espermatozoide de cerdo experimenta una disminución de los residuos de N-acetil glucosamina y ácido siálico de la superficie de la MP [37]. También ocurre una remoción de los factores descapacitantes, lo cual induce la actividad de la tirosina quinasa de las proteínas transmembranales (receptores de MP) y los prepara para reaccionar con la ZP y la P_4 [19].

In vivo, el bicarbonato de sodio puede estar desempeñando la función observada *in vitro*, ya que sus concentraciones en el tracto genital de la hembra son más elevadas (>15 mM) que en la cola del epidídimo (< 1 mM) [19]. Sin embargo, bajo estas condiciones la capacitación está modulada por el siguiente mecanismo: Los espermatozoides no capacitados se mantienen adheridos a las células del oviducto, con niveles bajos de Ca^{2+} y con la fosforilación de la tirosina de las proteínas de la MP suprimida, de esta manera también se alarga la vida del espermatozoide. Así, la capacitación y la viabilidad espermática son dos procesos estrechamente relacionados [59].

La capacitación es un proceso gradual de desestabilización de las membranas del espermatozoide, ocurriendo asincrónicamente en una población heterogénea de células y que culmina con la RA. La proporción de cada subpoblación dependerá del grado de desestabilización de la membrana espermática [38]. Así, la capacitación es un proceso que se "enciende" bajo condiciones especificas y no todos los espermatozoides responden a las mismas condiciones de manera sincrónica [26, 27]

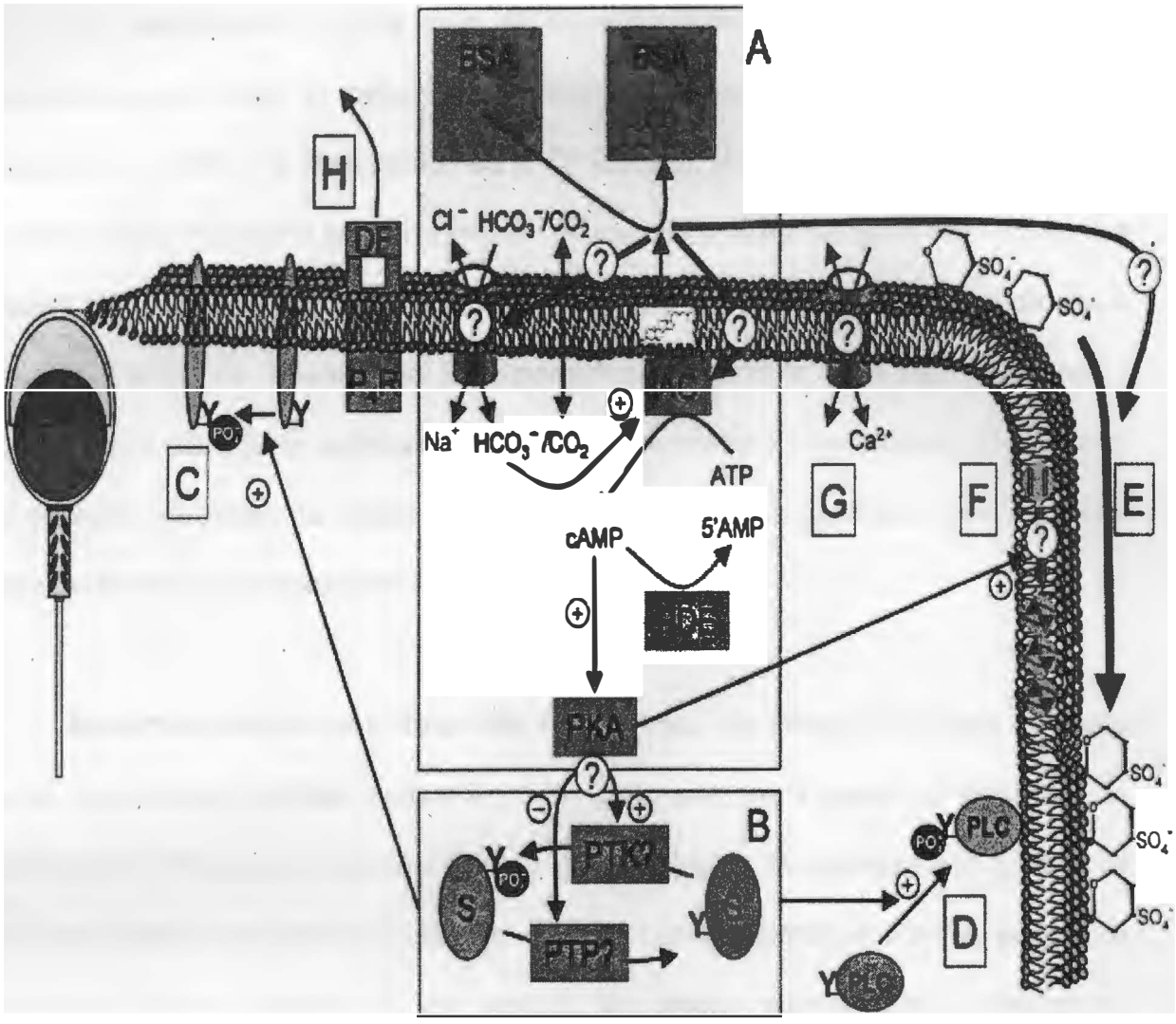

Figura 1. Mecanismos moleculares de la capacitación de espermatozoides de mamífero. (**A**) La pérdida del colesterol por la acción de la BSA aumenta la permeabilidad de la MP al bicarbonato, el cual activa AC y consecuentemente el AMPc quién a su vez activa PKA. (**B**) PKA induce la fosforilación de tirosina (Y) de varios sustratos (S) probablemente por la activación de PTK o por la inhibición de tirosina fosfatasa (PTP). (**C**) La fosforilación de la tirosina de las proteínas de unión de ZP-espermatozoides y otras de la MP ocurre a través de la cadena de señales desencadenada por el bicarbonato. (**D**) La fosforilación de la tirosina de PLC ocurre vía PKA activada por el bicarbonato. (**E**) La activación de PKA induce una redistribución de los seminolípidos y traslocación de los aminofosfolípidos en la MP. (**F**) La activación de PKA para la translocación de los aminofosfolípidos depende de una "scramblasa". (**G**) Pequeñas cantidades de Ca^{2+} intracelular son necesarias para la capacitación. (**H**) Los factores decapacitantes (DF) son removidos de la superficie de la célula, quedando al descubierto los receptores para progesterona (P_4R) [19].

La capacitación facilita que el espermatozoide adquiera tres funciones esenciales para llevar a cabo la fertilización: la hiperactivación de la movilidad espermática, la RA y la penetración de la ZP [26, 85]. Hunter [34] indica que el ovario controla endócrinamente la liberación de cientos de espermatozoides adheridos a las células epiteliales del istmo a través de la hiperactivación, lo cual comienza de una a dos horas antes de la ovulación. La hiperactivación permite a los espermatozoides separarse de las células epiteliales del oviducto, moverse a través del líquido viscoso del oviducto, atravesar la región de las células del cúmulus oophorus y de la corona radiada, adherirse y penetrar la ZP [53, 85].

Espermatozoides con Reacción Acrosomal. Los espermatozoides de cerdo recién eyaculados pueden unirse a la ZP [58], pero no poseen la habilidad de experimentar RA al ponerse en contacto con ella [9], ni de penetrarla [87]. Esta es una asociación inespecífica y débil, ya que los espermatozoides pueden separarse fácilmente de los ovocitos [7]. En cambio, las células espermáticas capacitadas, hiperactivadas y con el acrosoma intacto, se unen firmemente a la ZP [62, 72, 85]. La unión del espermatozoide capacitado con el ovocito es especie especifica; está regulada por una glicoproteína de la zona, ZP3 o ZPC, la cual funciona como un receptor primario y también como una ligadura, que además "dispara" la RA [55, 85].

Como se indicó anteriormente, en los espermatozoides capacitados, los factores descapacitantes (glucósidos de origen epididimario y de las vesículas seminales) han sido removidos de la superficie de la MP, quedando al descubierto

los receptores para ZP3 y P_4 [16, 19, 56]. La RA se inicia inmediatamente después de que el espermatozoide se ha unido firmemente a la ZP3 del ovocito [69]. Flesch y Gadella [19] indican que la ZP3 se une a los receptores correspondientes en la MP del espermatozoide e induce su agregación y fosforilación. La ZP3 interacciona con la P_4 para activar a las proteínas G y consecuentemente generar un incremento del pH_i. Estos dos últimos eventos producen una despolarización del potencial de la MP e inducen la entrada masiva de Ca^{2+} a través de canales tipo-T dependientes de voltaje. Las elevadas concentraciones de Ca^{2+} activan a la fosfatidilinositol fosfolipasa C (PLC), que degrada el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP). El Ca^{2+} también activa la fosfolipasa A_2 (PLA_2), la cual cataliza la transformación de la fosfatidilcolina (PC) en lifosfatidilcolina (LPC) y ácidos grasos libres (FFA). Estos dos últimos componentes y el DAG activan la proteína quinasa C, (PKC) que induce la fusión de la MP y la membrana acrosomal externa. Esta fusión de membranas ocurre en múltiples sitios, formando pequeñas vesículas y liberando el contenido enzimático del acrosoma. Las enzimas proteolíticas del acrosoma, tal como la acrosina y la hialuronidasa, disuelven la ZP y de esta manera, los espermatozoides alcanzan el espacio perivitelino (figura 2).

En ocasiones la RA ocurre en ausencia de un inductor, por eso se le denomina reacción acrosomal espontánea (RAE), para diferenciarla de la reacción acrosomal inducida (RAI) por ZP o P_4. La RAE es considerada como un evento no fisiológico, ya que normalmente debe presentarse en la superficie de la ZP y no en el

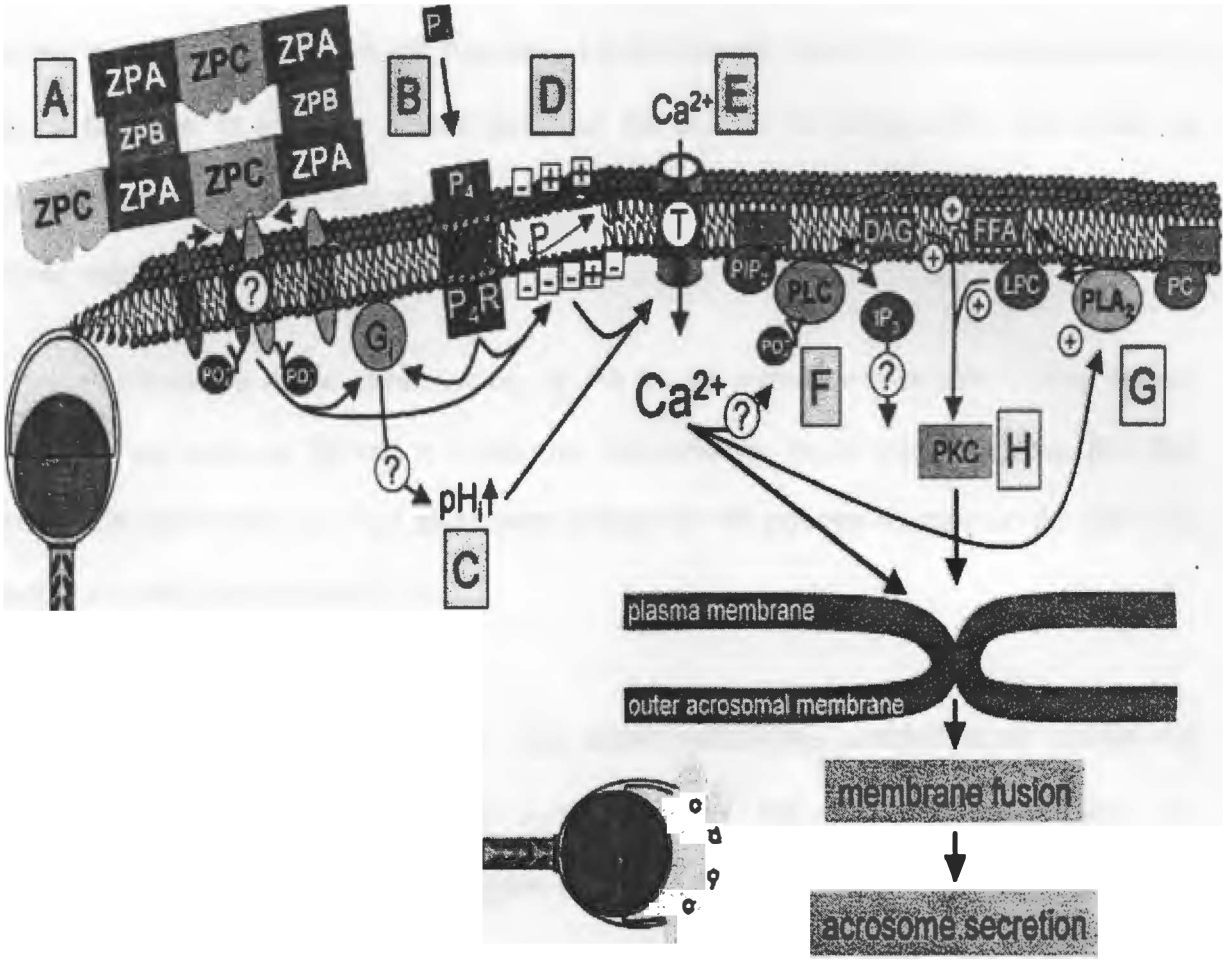

Figura 2. Mecanismos moleculares del proceso de RA en espermatozoides de mamífero. (**A**) Las proteínas de ZPC se unen a receptores de la MP del espermatozoide. (**B**) La P_4 se une a receptores de la MP del espermatozoide. (**C**) La P_4 interacciona con la ZPC e incrementan el pHi vía proteínas G (Gi) y (**D**) despolarizan el potencial de membrana. (**E**) Consecuentemente se activan transitoriamente los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje e ingresan grandes cantidades de Ca^{2+}. (**F**) Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular activan PLC que transforma PIP_2 a DAG e IP_3. (**G**) El Ca^{2+} también activa PLA_2, la cual degrada PC a LPC y ácidos grasos libres (FFA). (**H**) El papel de IP_3 no está claro, pero DAG, FFA, y LPC activan PKC, la que junto con el incremento de los niveles de Ca^{2+} inducen la fusión de la MP con la membrana acrosomal externa y subsecuentemente la liberación de las enzimas acrosomales [19].

medio de capacitación. En estas condiciones, el espermatozoide es incapaz de unirse a la ZP y fertilizar a los ovocitos. La incidencia de la RAE va a depender de varios factores: la especie y línea genética del animal, la composición del medio de capacitación, los tratamientos pre y pos-eyaculación y la condición inmunológica del espermatozoide [85].

A diferencia de la capacitación, la RA es un evento irreversible y muy rápido; ocurre en un lapso de 30 seg a 5 minutos, dependiendo de la especie animal [62, 85]. Los espermatozoides que han alcanzado la fase de RA poseen un periodo de vida muy corto y mueren rápidamente [74].

Espermatozoides muertos. Los espermatozoides pueden morir dentro del tracto genital de la cerda, en cualquiera de los estados funcionales del espermatozoide eyaculado. Una gran cantidad de las células que mueren en el útero, son retenidas por el endometrio y expulsados junto con secreciones retrógradas a través del cérvix y vulva o fagocitados por los leucocitos [67]. Poco se sabe del destino de los espermatozoides que mueren en el oviducto, pero lo más probable es que también sean fagocitados.

En condiciones de almacenamiento *in vitro*, no existe un sistema de limpieza de espermatozoides muertos. Vishwanath y Shannon [76] informan que la membrana de los espermatozoides muertos, por lo menos en el toro, libera la enzima aromático aminoácido oxidasa, en presencia de citrato. Esta enzima es

fuente de peróxido (H_2O_2), ya que cataliza la desaminación oxidativa de los aminoácidos aromáticos durante el almacenamiento del semen a temperatura ambiente. El peróxido a su vez, puede producir daño al ADN mitocondrial y comprometer la viabilidad del embrión.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Efecto del frío (15°C) sobre la desestabilización de la MP.

Uno de los primeros aspectos que se tienen que investigar es la identificación de los posibles cambios morfológicos y fisiológicos que experimentan los espermatozoides porcinos en el medio ambiente bioquímico que los diluyentes les proporcionan.

Hace algunos años, no existía algún procedimiento que permitiera estudiar directamente a los espermatozoides capacitados. Por eso, los investigadores utilizaron a la RA como un indicador de la capacitación, basados en el principio de que sólo los espermatozoides que han completado la capacitación pueden experimentar RA [85]. En 1979, Saling y Storey [66] propusieron la utilización de la clorotetraciclina (CTC) para determinar el estado funcional de los espermatozoides humanos. Mediante este procedimiento ha sido posible seguir el proceso de transformación de un espermatozoide no capacitado a la etapa de capacitación y posteriormente a la fase de RA.

La CTC al ponerse en contacto con el espermatozoide, atraviesa la MP y se une al Ca^{2+} libre intracelular, formando el complejo CTC+Ca^{2+}, el cual se liga preferentemente a las regiones hidrofóbicas de la MP y su distribución cambia según

el estado funcional de la célula. Así, los espermatozoides no capacitados se caracterizan por una fluorescencia distribuida uniformemente en la cabeza; los capacitados, muestran una fluorescencia concentrada en la región acrosomal y una banda transparente en la región postacrosomal y, los espermatozoides con RA, sin fluorescencia en la cabeza, excepto, por una delgada banda presente en la región ecuatorial [38, 49, 80, 81]. De esta manera, los cambios en los patrones de fluorescencia con CTC son un indicador del grado de desestabilización de la MP y están asociados al estado funcional del espermatozoide.

Maxwell y Johnson [49] utilizaron el ensayo de CTC y encontraron que cuando el semen porcino se almacenó a 15°C en solución Tyrode o en una solución amortiguadora de fosfato (PBS), durante 180 min., los espermatozoides experimentaron cambios de membrana semejantes a la capacitación y a la RA. Watson [81], encontró que condiciones similares de almacenamiento, pero en un lapso más corto (90 min.), inducen un estado equivalente a la capacitación pero no de RA. En ambos trabajos estos cambios en la MP fueron atribuidos a la acción del frío (15°C). No existen informes que indiquen si estos cambios en la MP también ocurren en espermatozoides almacenados en diluyentes de larga duración a 16°C.

2.2. Efecto de la conservación del espermatozoide porcino a 15-18°C sobre la capacitación *in vitro*.

También es importante determinar la habilidad de los espermatozoides almacenados para responder al proceso de capacitación al que serán sometidos dentro del tracto genital de la cerda. Los estudios *in vitro* pueden dar una idea de lo que está ocurriendo.

Mattioli *et al.* [47], detectaron una reducción del tiempo de capacitación en los espermatozoides conservados en BTS durante 1 y 3 días, con respecto al semen fresco. En efecto, el semen almacenado alcanzó su máximo nivel de capacitación a los 90 minutos de incubación, mientras que el semen fresco lo alcanzó a partir de los 180 minutos.

Harrison *et al.* [27] encontraron una mayor tasa de capacitación en espermatozoides conservados en BTS a 18°C durante 1 día, con respecto a aquellos que se almacenaron durante 7 días; pero en este segundo momento, la tasa de células muertas fue superior. Tal incremento en la proporción de espermatozoides muertos, pudiera deberse a que las células espermáticas estarían experimentando una segunda capacitación, la cual muchos de ellos, ya no podrían resistir. La primera capacitación se experimentó durante el almacenamiento. Sin embargo, ésta es una

mera suposición y es necesario investigar ésta hipótesis, especialmente en espermatozoides almacenados en diluyentes de larga duración.

Vazquez *et al.* [74], observaron porcentajes muy bajos de RAE (1.5 a 3.5 %) en espermatozoides porcinos conservados en MR-A (diluyente de larga duración) durante 24 h a 16°C; cuando estos espermatozoides fueron sometidos a capacitación (incubados a 38°C por 40 min, en medio TCM 199), la tasa de RAE se elevó a 9 o 10 %.

En síntesis, estos trabajos presentan tres posibilidades sobre el comportamiento de los espermatozoides almacenados y sometidos a capacitación, a saber: a) existe una reducción del tiempo de capacitación, b) se produce un incremento de la muerte espermática y, c) existe un incremento en el porcentaje de espermatozoides con RA. Por ello, la pregunta planteada al principio de este capitulo continúa sin responderse de manera concluyente.

2.3. Efecto del almacenamiento del semen sobre la capacidad de fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos homólogos y heterólogos.

La capacidad de penetración de ovocitos heterólogos y homólogos por parte de espermatozoides conservados en diluyentes de larga duración está poco estudiada. Yanagimachi [86] encontró que el espermatozoide humano tenia la

capacidad de penetrar a los ovocitos de hámster libres de ZP. A este ensayo se le denomina por sus siglas en inglés como SPA (sperm penetration assay) y fue propuesto como una prueba de rutina para evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides de humanos. La Organización Mundial de la Salud considera que el SPA asociado a variables como la movilidad progresiva, tiene la capacidad de predecir la fertilidad de espermatozoides humanos [83].

Clarke y Johnson [12] en un SPA observaron 42 %, de ovocitos fertilizados de hámster con espermatozoides de cerdo almacenados en BTS durante tres días a 18°C, mientras que con espermatozoides frescos obtuvieron 45.8 % ($p<0.05$) y, concluyeron que el SPA, en asociación con las pruebas convencionales de evaluación de semen, puede ser usado para detectar diferencias potenciales en la capacidad fertilizante de espermatozoides de cerdo almacenados bajo diferentes condiciones.

El ensayo de FIV de ovocitos homólogos, tiene una alta sensibilidad (93.75 %), la cual se define como la habilidad para identificar verracos fértiles con base en la capacidad de penetrar ovocitos *in vitro*; mientras que la especificidad del ensayo, es decir, la capacidad de identificar verracos subfértiles, fue de 83.3 % [45].

Vazquez *et al.* [75] encontraron que los espermatozoides porcinos conservados en MR-A (un diluyente de larga duración) y en BTS (un diluyente de corta duración) mantienen por un periodo muy reducido (48 horas) la capacidad para

fertilizar ovocitos homólogos, para luego descender de manera significativa y paulatina, al cuarto, séptimo y noveno días de almacenamiento. De manera inexplicable, el MR-A, no logró mantener a los espermatozoides con una mayor fertilidad por más de dos días, ya que es un diluyente de larga duración. Este resultado coincide con la conclusión de Althouse [3], quien señaló que os diluyentes de larga duración comerciales, no cumplen con las expectativas planteadas; confirmándose una vez más, la necesidad de mejorar este sistema de conservación de semen porcino.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los antecedentes presentados en el presente trabajo muestran que no se conoce si los espermatozoides almacenados en diluyentes de larga duración a 16°C, pueden experimentar cambios en la MP (desestabilización de membranas o cambios en el estado funcional del espermatozoide). Tampoco se sabe de manera concluyente si los espermatozoides con varios días de almacenamiento, mantienen la habilidad para responder a la capacitación *in vitro* o a la inducción de RA con P_4. También se requiere conocer el efecto del tiempo de almacenamiento del semen sobre la capacidad de fertilización *in vitro* de ovocitos homólogos. A fin de mejorar el sistema de conservación del semen porcino en diluyentes de larga duración a 15-18°C, es necesario determinar las causas que producen un descenso de la capacidad fertilizante durante su almacenamiento.

4. PLANTEAMIENTO DE LAS HIPOTESIS.

Primera. La conservación de espermatozoides porcinos en un diluyente de larga duración durante 8 días induce procesos similares a la capacitación y/o RAE; dichos procesos se incrementarán de manera progresiva conforme avance el período de conservación. En el ensayo de CTC, el semen diluido y con más de 48 h de conservación, se observará un incremento en la proporción de espermatozoides capacitados y con RA, en proporciones semejantes a las que presenten espermatozoides frescos pero sometidos a capacitación.

Segunda. Los espermatozoides que probablemente experimenten cambios en la MP durante el almacenamiento, verán modificada su habilidad para capacitarse *in vitro* o de reaccionar al estimulo de la P_4.

Tercera. Conforme avance el periodo de conservación y se incrementen las proporciones de espermatozoides capacitados y/o con RA, una mayor proporción de espermatozoides ira perdiendo progresivamente la capacidad de fertilizar ovocitos bajo condiciones *in vitro*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

- Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de los espermatozoides de cerdo en el diluyente Reading sobre el estado funcional de la membrana, así como su habilidad para responder a la capacitación *in vitro,* a la inducción de RA con P_4 y de fertilizar ovocitos homólogos *in vitro* (FIV).

5.2. Objetivos particulares.

- Determinar las tasas de movilidad y viabilidad de los espermatozoides conservados en el diluyente Reading a 16°C hasta un periodo de 8 días.

- Estandarizar y reproducir el ensayo de CTC para estudiar el estado funcional de la MP de los espermatozoides almacenados en Reading.

- Determinar mediante tinción de CTC, si la conservación de espermatozoides en el diluyente Reading induce cambios en el estado funcional de la MP.

- Determinar el efecto de la conservación de los espermatozoides porcinos en el diluyente Reading en la FIV de ovocitos homólogos.

6. MATERIAL Y METODO.

6.1. Colección, dilución y almacenamiento del semen.

Se utilizaron cinco verracos adultos para la obtención de semen. De cada verraco se obtuvieron dos eyaculados, con una abstinencia mínima de tres días. El semen se colectó por el método de la mano enguantada, separando la fracción gelatinosa. La fracción rica se transportó al laboratorio en un termo a 37°C en un lapso de 1 h para su evaluación y dilución. Se utilizaron únicamente eyaculados con 85% de movilidad progresiva y menos de 10% de anormalidades espermáticas.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). El agua utilizada en la preparación de las soluciones fue calidad Milli Q (Millipore). De la fracción rica de semen fresco, se tomó una alícuota de 1 ml para su estudio. El resto del eyaculado fue diluido en el extensor Reading, isotérmicamente a 30°C, dentro de los 60 minutos posteriores a su llegada al laboratorio. El diluyente se preparó según Revell y Glossop [61]. Brevemente, un litro de diluyente contenía: D-glucosa, 11.5 g; Na HCO_3, 1.75 g; EDTA, 2.35 g; citrato de sodio, 11.65 g; Tris, 5.5 g; ácido cítrico, 4.1 g; cisteína, 0.07 g; trehalosa, 1.0 g; alcohol polivinílico (PVA) tipo II, 1.0 g; cloruro de potasio, 0.75 g; lincomicina-espectinomicina (1:2), 1.0 g. El diluyente se preparó a un pH de 6.4, 284 mOsm/kg y se esterilizó con filtros de 0.22 μm (Millipore). Se prepararon dosis de 2.5×10^9 espermatozoides en 50 ml y se

envasaron en botellas estériles de polietileno-tereftalato. En estas condiciones el semen diluido se mantuvo a temperatura ambiente por 1 h para equilibrarlo y se almacenó en una incubadora a 16±1°C hasta por 8 días.

6.2. Experimentos y tratamientos del semen.

Se realizaron dos experimentos.

Experimento 1. Se realizó con el propósito de determinar si los espermatozoides conservados en el diluyente Reading a 16°C estimula procesos semejantes a la capacitación y/o RA. Los espermatozoides fueron evaluados en semen fresco y después de diluido y almacenado por 0, 2, 4, 6 y 8 días. Los parámetros seminales en el tiempo 0 fueron considerados básales para el mismo eyaculado almacenado por 2, 4, 6 y 8 días. Adicionalmente, se determinó la habilidad de los espermatozoides almacenados, durante los tiempos indicados previamente, para responder a la capacitación *in vitro* por 4.5 h, a la adición de P_4 (tratamiento P_4) y, finalmente, a la capacitación *in vitro* + P_4. Para los tres tratamientos adicionales, el semen almacenado fue considerado como el tratamiento testigo. Las variables a medir fueron movilidad progresiva, viabilidad y estado funcional de la membrana (no capacitado, capacitado, RA) en todos los tratamientos.

Experimento 2. Se realizó con el propósito de determinar el efecto del tiempo de conservación de los espermatozoides sobre la capacidad de FIV de ovocitos homólogos. El semen diluido en Reading, se evalúo a los 0, 4 y 8 días de almacenamiento, de acuerdo con el procedimiento indicado. Las variables de respuesta fueron porcentaje de ovocitos fertilizados y el porcentaje de polispermia.

6.3. Procedimientos para la evaluación del semen

6.3.1. Movilidad progresiva.

La movilidad progresiva se determinó después de incubar 1 ml de semen a 39°C durante 10 min. Una gota de 20 µl de semen se colocó sobre un portaobjetos a 37°C, se cubrió con un cubreobjetos y la movilidad progresiva fue evaluada bajo un microscopio de campo claro a 400 aumentos, asignándose porcentajes de 0 a 90.

6.3.2. Viabilidad y estado funcional de las membranas espermáticas.

Para determinar la viabilidad espermática se siguió el procedimiento de Berger [8]. Se agregó Hoechst-33258 (H-33258) a una concentración final de 1 µg/ml en la suspensión de espermatozoides y se incubó 8 min a 39°C. Inmediatamente después, el excedente de H-33258 fue removido de una suspensión de 100 µl de espermatozoides mediante centrifugación a 650 x g durante 10 min. sobre una solución de 300 µl de polivinilpirrolidona-40 (PVP-40) al 2 % en PBS. El tubo se cortó

por encima del paquete celular para asegurar la eliminación del colorante y de la solución remanente de PVP-40.

A continuación se utilizó la tinción de CTC para determinar el estado funcional de las MP, de acuerdo con el procedimiento de Fraser y Herold [21]. La CTC se preparó a una concentración de 750 μM, en un amortiguador de Tris 20 mM, NaCl 130 mM, L-cisteína 5 mM, a un pH final de 7.8. La solución fue preparada en fresco y se mantuvo en obscuridad. El paquete de células espermáticas se fijó en 10 μl de glutaraldehído al 0.2 %, en Tris 0.5 M y pH final de 7.4. Una suspensión de 5 μl de espermatozoides fijados se mezcló con 5 μl de CTC en un portaobjetos y se dejó reposar 60 seg. Finalmente, se añadió una gota de 1,4-Diaza-biciclo (2.2.2) octano (DABCO) 0.22 M en glicerol al 90 %, para conservar la fluorescencia. Las preparaciones con doble tinción (CTC/H-33258) se analizaron bajo el microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), a 1000 aumentos. La viabilidad de los espermatozoides se evalúo irradiando con luz ultravioleta a 360 nm para excitar el H-33258 y se consideró como muertos aquellos espermatozoides que mostraron fluorescencia uniforme en la cabeza. A continuación, el mismo campo fue iluminado con luz ultravioleta a 495 nm para excitar a la CTC y determinar el estado funcional de los espermatozoides de acuerdo con los siguientes patrones de tinción: *Espermatozoides no capacitados*, con fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto; *espermatozoides capacitados*, con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y

presencia de acrosoma intacto; *espermatozoides con RA*, sin fluorescencia en la cabeza, excepto, una delgada banda en la región ecuatorial [49, 80]. Se contaron como mínimo 200 células espermáticas por preparación.

6.3.3. Capacitación *in vitro*.

La capacitación *in vitro* de los espermatozoides en semen fresco y diluido se realizó según el procedimiento descrito por Betancourt *et al.* [10]. Se depositó 1 ml de medio de capacitación TALP-Hepes, suplementado con BSA (6 mg/ml) y piruvato de sodio 1 mM a un pH de 7.4, en cada pozo de una caja de plástico (Nunc-Dinamarca) de 4 pozos y se incubaron a 39°C. Los espermatozoides fueron separados del plasma seminal colocando 1 ml de semen fresco o 1.5 ml de semen diluido en un tubo de centrífuga conteniendo 2 ml de medio TALP-Hepes a 39°C, y se centrifugó a 320 x g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante con el plasma seminal y el paquete celular sé resuspendió cuidadosamente con 1 ml de TALP-Hepes, se tomó una alícuota de esta suspensión para obtener 15 x 10^6 espermatozoides, depositarlos en cada pozo, para finalmente incubarlos durante 4.5 h a 39°C en una atmósfera húmeda y 5 % de CO_2.

6.3.4. Inducción de RA con P_4.

La habilidad de los espermatozoides para llevar a cabo la RA se evaluó de acuerdo con el procedimiento de Berger [8]. Al semen diluido y almacenado durante 0, 2, 4, 6 y 8 días, con y sin capacitación *in vitro*, se le adicionó P_4 para inducir la RA;

se utilizó una concentración final de 10 μg/ml de P_4 y se incubó a 39°C durante 15 min.

6.3.5. Procedimiento para la FIV.

El semen se evalúo a los 0, 4 y 8 días de almacenamiento en el extensor Reading a 16°C. Se realizaron 6 ensayos y se emplearon en total 900 ovocitos.

Obtención y maduración de ovocitos. Los ovarios se obtuvieron de cerdas prepúberes, en el rastro porcino ABC de los Reyes la Paz, Estado de México y se transportaron en menos de 2 h al Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I, en solución salina estéril (NaCl 0.157 M) a 39°C [10]. Se lavaron tres veces en solución salina estéril a 39°C. Los folículos de 3 a 6 mm de diámetro se puncionaron con una jeringa estéril de 10 ml y aguja de 18x38 mm (Becton Dickinson, México); el líquido folicular obtenido se depositó en un tubo de centrífuga estéril y se dejó sedimentar durante 15 min. El paquete celular se lavó y se dejó sedimentar 10 min. dos veces más con medio modificado Tyrode, suplementado con lactato de sodio, Hepes y PVA (TL-Hepes-PVA) a pH de 7.3 a 7.4. El paquete celular sedimentado se depositó en una caja de Petri. Bajo el microscopio estereoscópico se seleccionaron los complejos ovocitos-células del cúmulus (COC), eligiendo aquellos que presentaron citoplasma uniforme y rodeados de al menos tres capas de células cúmulo, empleando una pipeta Pasteur alargada, con un diámetro ligeramente superior del COC. Los complejos COC se lavaron tres veces en gotas de 500 μl de medio de maduración

La maduración de los ovocitos se realizó en medio TCM 199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In Vitro S.A., México), suplementado con PVA al 0.1%; D-glucosa, 3.05 mM; piruvato de sodio, 0.91 mM; cisteína, 0.57 mM y factor de crecimiento epidérmico (FCE), 10 ng/ml [79]. Para la maduración, se depositaron de 40 a 50 COC por pozo en una caja de 4 pozos (Nunc) con 500 μl de medio de maduración, cubierto con aceite mineral (Fisher Scientific) agregando las hormonas FSH y LH en una concentración de 0.5 μg/ml de cada una. Se incubaron a 39°C en atmósfera de CO_2 y humedad a saturación durante 42 a 44 h.

Coincubación de los ovocitos. Transcurrido el tiempo de maduración, se agregaron a cada pozo 300 μl de hialuronidasa al 0.1 % para eliminar las células cúmulus. Los ovocitos desnudos se transfirieron a gotas de 50 μl del medio de fertilización "Tris-buffer médium" (TBM), suplementado con cafeína 2.5 mM y albúmina sérica bovina fracción V (BSA) al 0.4 % cubiertas con aceite en cajas de 4 pozos [1, 2].

Se lavaron 5 ml de semen diluido en Reading con 0, 4 y 8 días de almacenamiento, con 5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de Dulbbecco (DPBS) suplementado con BSA fracción V al 0.1 % y a un pH de 7.2-7.4 y se centrifugó a 61 g durante 5 min; se tomó el sobrenadante y se lavó dos veces más con DPBS a 1900 g durante 5 min. El paquete celular se diluyó en 100 μl de TBM. Después de realizar las diluciones apropiadas, 50 μl de esta suspensión de

espermatozoides, se agregaron a cada pozo que contenía de 35 a 40 ovocitos, para tener una concentración final de $5x10^5$ células/ml [2]. La coincubación se llevó a cabo durante 5 h a 39°C en atmósfera de 5% de CO_2 con humedad a saturación.

Transcurrido el tiempo de coincubación, los ovocitos se lavaron en gotas de 50 μl de medio de desarrollo embrionario North Carolina State University (NCSU-23) [57], suplementados con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 % y se transfirieron a gotas de 500 μl del mismo medio cubiertas con aceite mineral en cajas de 4 pozos y se incubaron por 12 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se lavaron tres veces en gotas de 100 μl de medio TL-Hepes-PVA.

6.4. Evaluación de la FIV.

Se prepararon laminillas con aproximadamente 10 ovocitos, presionados entre un portaobjetos y cubreobjetos y se fijaron en una solución de ácido acético-etanol (1:3) durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se tiñeron con una solución de orceína al 0.1% en ácido acético. La observación de los pronúcleos se realizó con el microscopio de contraste de fases a 400 aumentos [2]. Se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados con semen diluido en Reading a diferentes intervalos de conservación, clasificándose como monospérmicos, aquellos que presentaron dos pronúcleos y polispérmicos, los que tuvieron tres o más pronúcleos. Se consideraron como ovocitos maduros aquellos que presentaron cromosomas en metafase II y/o

primer cuerpo polar. Se consideraron ovocitos inmaduros aquellos que presentaron vesícula germinal, o en vías de maduración, aquellos que presentaron cromosomas de la primera división meiótica. El porcentaje de ovocitos fertilizados se determinó dividiendo el número de ovocitos monospérmicos/número total de ovocitos inmaduros x 100. La polispérmia se determinó por el número de ovocitos polispérmicos/número total de ovocitos inmaduros x 100.

6.5. Análisis estadístico.

Las variables de repuesta: movilidad progresiva, viabilidad espermática, porcentaje de espermatozoides de acuerdo a su estado funcional; no capacitados, capacitados, reaccionados (RA), así como el porcentaje de ovocitos fertilizados y el porcentaje de polispérmia, se analizaron por medio de un análisis de varianza mixto, con mediciones repetidas [88]. Para movilidad progresiva y viabilidad espermática, se hizo necesaria la transformación arco seno de los datos para corregir la heterogeneidad de las varianzas. El nivel de confianza se tomó cuando $p<0.05$.

7. RESULTADOS.

7.1. Efecto del tiempo de almacenamiento en la movilidad progresiva y la viabilidad espermática.

El promedio ± error estándar (EE) de viabilidad espermática en el semen fresco fue del 91.4±1.8 % y no difirió del semen diluido (0, 2 y 4 días de almacenamiento) ($p>0.05$). Al sexto y octavo días de almacenamiento la viabilidad descendió de manera significativa (87.9±1.8 y 86.9±1.8% respectivamente, $p<0.05$), con relación al día 0.

El semen fresco mostró la máxima movilidad progresiva y no difirió con respecto al diluido al día 0 (87.5±1.6 y 84.9±1.6% respectivamente, $p>0.05$). Sin embargo, después del segundo día de almacenamiento la movilidad descendió significativamente ($p<0.05$), llegando a su punto más bajo al octavo día de almacenamiento (62.8±1.6 %) (cuadro 2).

CUADRO 2. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN PORCINO SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMATICA Y LA MOVILIDAD PROGRESIVA (n=10) (% PROMEDIO ± EE).

Variable	Semen Fresco	Días de almacenamiento				
		0	2	4	6	8
Viabilidad (%)	91.4±1.8[a]	89.9±1.8[a]	89.9±1.8[a]	90.1±1.8[a]	87.9±1.8[b]	86.9±1.8[b]
Movilidad (%)	87.5±1.6[a]	84.9±1.6[a]	80.2±1.6[b]	76.8±1.6[b]	72.3±1.6[b]	62.8±1.6[b]

Literales distintas son significativamente diferentes ($p<0.05$) con respecto al día 0.

7.2. Estado funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo mediante CTC.

La tinción de espermatozoides con CTC permitió observar tres estados funcionales: a) Espermatozoides no capacitados, con fluorescencia distribuida en toda la cabeza; b) Espermatozoides capacitados, con fluorescencia en la región acrosomal y una banda libre de fluorescencia en la región posacrosomal; c) Espermatozoides con RA, sin fluorescencia en la cabeza, excepto, una banda en la región ecuatorial (figura 3). Estos estados funcionales se observaron en cado uno de los tratamientos a los que se sometió el semen fresco y diluido, mismos que a continuación se describen.

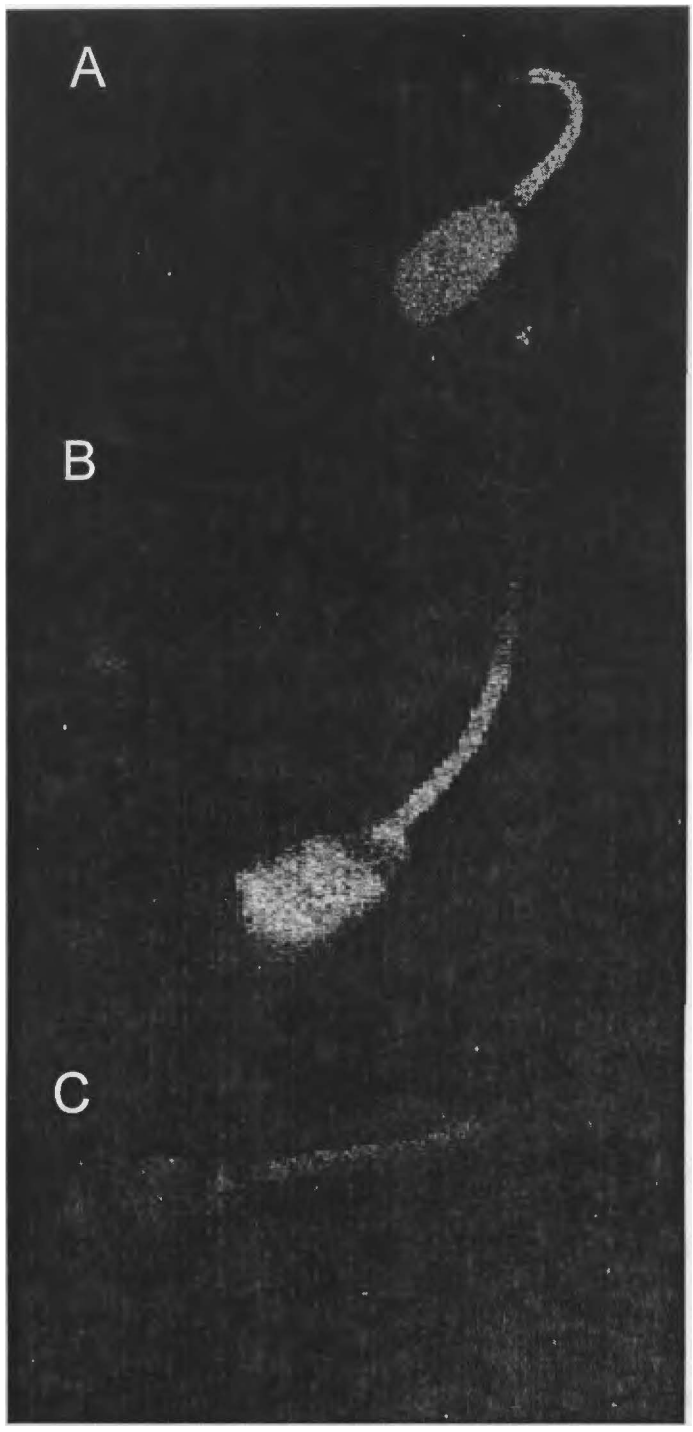

Figura 3. Estados funcionales de la membrana plasmática en espermatozoides de cerdo teñidos con CTC: A) Espermatozoide no capacitado, con fluorescencia distribuida en toda la cabeza; B) Espermatozoide capacitado, con fluorescencia en la región acrosomal y una banda libre de fluorescencia en la región posacrosomal; C) Espermatozoide con RA, sin fluorescencia en la cabeza, excepto, una banda en la región ecuatorial (1000 X).

7.3. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen en el estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Se encontró que los porcentajes de espermatozoides capacitados fueron bajos en el semen fresco y diluido al día 0 y 2 de almacenamiento (4.3 ± 0.7, 4.8 ± 0.9 y 10.7 ± 1.8% respectivamente, $p>0.05$), pero en los días 4, 6 y 8 se incrementaron significativamente (18.7±2.5, 28.8±2.8 y 37.2±3.3 % respectivamente, $p<0.05$). En el semen fresco solamente 5.7±1% de los espermatozoides mostraron RA. Este porcentaje se incrementó ligeramente hasta el octavo día de almacenamiento, pero sin diferencias significativas ($p>0.05$). Complementariamente, los porcentajes de espermatozoides no capacitados fueron altos en el semen fresco y diluido al día 0 y 2 de almacenamiento (84.2±2.0, 85.2±1.1, 77.6±1.9 % respectivamente, $p>0.05$), pero en los días 4, 6 y 8 disminuyeron significativamente (66.6±3, 55.5±4.6, 41.8±6.1 respectivamente, $p<0.05$) (cuadro 3).

7.4. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la capacitación *in vitro* por 4.5 h en el estado funcional de los espermatozoides.

El semen fresco y el semen diluido los días 0, 2 y 4 de almacenamiento sometido a capacitación *in vitro* durante 4.5 h, presentaron proporciones similares de espermatozoides capacitados (23±2.7, 25.3±2.3, 24.4±3.3, 24.5±2.3

respectivamente, p>0.05), pero al sexto y octavo día los porcentajes se incrementaron significativamente (30.9±3.3, 34.7±3.0 respectivamente, p<0.05).

CUADRO 3. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN PORCINO EN EL ESTADO FUNCIONAL DE LOS ESPERMATOZOIDES (n=10) (% PROMEDIO ± EE).

Estado Funcional	Semen Fresco	Días de almacenamiento				
		0	2	4	6	8
No capacitado	84.2±2.0[a]	85.2±1.1[a]	77.6±1.9[a]	66.6±3[b]	55.5±4.6[b]	41.8±6.1[b]
Capacitado	4.3±0.7[a]	4.8±0.9[a]	10.7±1.8[a]	18.7±2.5[b]	28.8±2.8[b]	37.2±3.3[b]
RA	5.7±1.0[a]	7.2±1.1[a]	6.0±0.9[a]	7.8±1.2[a]	8.8±1.3[a]	12.2±2.7[a]

Literales distintas entre filas son significativamente diferentes (p<0.05) con respecto al día 0.

Una situación parecida se observó en el comportamiento de los espermatozoides con RA. Los porcentajes de espermatozoides reaccionados fueron similares en el semen fresco y diluido, los días 0, 2 y 4 de almacenamiento (18.1±1.9, 19.9±1.4, 18.6±1.3, 19.3±2.3 respectivamente, p>0.05)), pero se incrementaron significativamente los días 6 y 8 (27.4±4, 33.3±5.4 respectivamente, p<0.05). El aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados (RA) al sexto y octavo días de almacenamiento, produjo una reducción significativa (p<0.05) en la proporción de los espermatozoides no capacitados (cuadro 4).

CUADRO 4. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN Y LA CAPACITACIÓN *IN VITRO* POR 4.5 H EN EL ESTADO FUNCIONAL DE LOS ESPERMATOZOIDES (n=10) (% PROMEDIO ± EE).

Estado funcional	Semen Fresco	Días de almacenamiento				
		0	2	4	6	8
No capacitado	48.9±3.6[a]	44.0±3.7[a]	45.1±2.9[a]	44.3±4.2[a]	30.3±4.8[b]	18.0±3.9[b]
Capacitado	23.0±2.7[a]	25.3±2.3[a]	24.4±3.3[a]	24.5±2.3[a]	30.9±3.3[b]	34.7±3.0[b]
RA	18.1±1.9[a]	19.9±1.4[a]	18.6±1.3[a]	19.3±2.3[a]	27.4±4.0[b]	33.3±5.4[b]

Literales distintas entre filas son significativamente diferentes ($p<0.05$) con respecto al día 0.

7.5. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la adición de P_4 (por 15 min.) en el estado funcional de los espermatozoides.

El semen fresco y el semen diluido al día 0 de almacenamiento a los que se les adicionó P_4, presentaron porcentajes similares de espermatozoides capacitados (8.0±1.3, 8.1±1.1% respectivamente, $p>0.05$)), incrementándose significativamente ($p<0.05$) a partir del segundo día almacenamiento (17.1±2.9) hasta alcanzar 36.3±4% al octavo día. El análisis estadístico mostró que este incremento fue debido a un efecto significativo ($p<0.05$) del tiempo de almacenamiento y no de la P_4. Los porcentajes de espermatozoides con RA se mantuvieron sin diferencias significativas ($p>0.05$) en el semen fresco y diluido en todos los tiempos de almacenamiento, excepto para el octavo día (17.4±1.6, $p<0.05$). Complementariamente, la proporción

de espermatozoides no capacitados fue elevada en el semen fresco y en el semen diluido al día 0 de almacenamiento (76.8±1.3, 77.4±3.0 respectivamente, $p>0.05$), pero en los días 2, 4, 6 y 8 los valores disminuyeron significativamente (67.3±3.3, 62.6±3.4, 41.8±4.2, 37.7±6.0 respectivamente, $p<0.05$) (cuadro 5).

CUADRO 5. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN Y LA ADICIÓN DE P_4 POR 15 MIN. EN EL ESTADO FUNCIONAL DE LOS ESPERMATOZOIDES (n=10) (% PROMEDIO ± EE).

Estado funcional	Semen Fresco	Días de almacenamiento				
		0	2	4	6	8
No capacitado	76.8±1.3[a]	77.4±3.0[a]	67.3±3.3[b]	62.6±3.4[b]	41.8±4.2[b]	37.7±6.0[b]
Capacitado	8.0±1.3[a]	8.1±1.1[a]	17.1±2.9[b]	20.0±2.9[b]	34.0±3.1[b]	36.3±4.0[b]
RA	10.2±1.7[a]	10.6±1.6[a]	10.0±1.0[a]	11.4±1.6[a]	15.9±1.8[a]	17.4±1.6[b]

Literales distintas entre filas son significativamente diferentes ($p<0.05$) con respecto al día 0.

7.6. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen y la capacitación *in vitro* +P_4 en el estado funcional de los espermatozoides.

El tiempo de almacenamiento cambió significativamente ($p<0.05$) la proporción de los patrones de fluorescencia en los espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro* por 4.5 h + P_4 durante 15 min. Proporciones similares de espermatozoides capacitados se observaron en el semen fresco y en el diluido los

días 0 y 2 de almacenamiento (24.9±4.3, 23.8±2.4, 25.5±1.8 % respectivamente, $p>0.05$), pero al cuarto, sexto y octavo días se incrementaron significativamente (30.3±2.2, 34.7±3.3, 37.7±4.1 respectivamente, $p<0.05$). El porcentaje promedio de espermatozoides con RA en el semen fresco fue de 21±0.9 % y no varió significativamente en el semen diluido, del 0 al sexto día de almacenamiento, pero al octavo día se incrementó significativamente (36.3±4.7 $p<0.01$). El aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados al cuarto, sexto y octavo días de almacenamiento, produjo una reducción significativa ($p<0.05$) en la proporción de los espermatozoides no capacitados (cuadro 6).

CUADRO 6. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN Y LA CAPACITACION *IN VITRO* + P_4 EN EL ESTADO FUNCIONAL DE LOS ESPERMATOZOIDES (% PROMEDIO ± EE) (n=10).

Estado funcional	Semen Fresco	Días de almacenamiento				
		0	2	4	6	8
No capacitado	47.0±3.8[a]	41.7±3.0[a]	41.8±3.5[a]	32.1±3.8[b]	28.8±5.2[b]	13.9±2.5[b]
Capacitado	24.9±4.3[a]	23.8±2.4[a]	25.5±1.8[a]	30.3±2.2[b]	34.7±3.3[b]	37.7±4.1[b]
RA	21.0±0.9[a]	25.1±2.2[a]	24.1±2.4[a]	28.6±3.7[a]	28.7±3.8[a]	36.3±4.7[b]

Literales distintas entre filas son significativamente diferentes ($p<0.05$) con respecto al día 0.

7.7. Efecto de cuatro tratamientos del semen porcino en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide.

En este apartado se presentan los resultados de una manera integral, con el propósito de realizar un análisis comparativo entre los cuatro tratamientos (tiempo de almacenamiento, capacitación *in vitro*, adición de P_4 y capacitación *in vitro*+P_4) sobre la proporción de espermatozoides capacitados (figura 4A) y reaccionados (figura 4B). Esto es posible debido a que los cuatro tratamientos se realizaron simultáneamente. Los valores para espermatozoides no capacitados son complementarios a los porcentajes de capacitados y reaccionados y no se muestran en la figura 4.

Como se indicó previamente, el almacenamiento del semen indujo un incremento de la proporción de células capacitadas a partir del cuarto día y se incrementó paulatinamente hasta el octavo día. La proporción de células con RA se mantuvo constante en todos los tiempos de almacenamiento.

La adición de P_4 durante 15 min. al semen fresco y diluido, no incrementó significativamente ($p>0.05$) el porcentaje de espermatozoides capacitados, ni tampoco el de los espermatozoides reaccionados, con respecto al tratamiento testigo (efecto del tiempo de almacenamiento).

El tratamiento de capacitación *in vitro* durante 4.5 h produjo un aumentó significativo en el porcentaje de espermatozoides capacitados, en el semen fresco y en el diluido con 0 y 2 días de almacenamiento (23±2.7, 25.3±2.3 y 24.4±3.3 % respectivamente, $p<0.05$). Sin embargo, después de cuatro, seis y ocho días los porcentajes de espermatozoides con patrón de capacitación (24.5±2.34, 30.9±3.34, 29.7±3.02 %, respectivamente) no difirieron ($p>0.05$) con respecto al tratamiento testigo. La capacitación *in vitro*, también incrementó ($p<0.05$) el porcentaje de espermatozoides con RA en el semen fresco y diluido en todos los tiempos de almacenamiento; con respecto al tratamiento testigo.

La capacitación *in vitro* + P_4 incrementó significativamente ($p<0.05$) el porcentaje de espermatozoides capacitados en el semen fresco y diluido durante 0, 2 y 4 días de almacenamiento, pero al sexto y el octavo días, este efecto ya no se presentó con respecto al tratamiento testigo ($p>0.05$). También, aumentó significativamente ($p<0.05$) el porcentaje de espermatozoides reaccionados en el semen fresco y diluido, en todos los tiempos de almacenamiento, con respecto al tratamiento testigo.

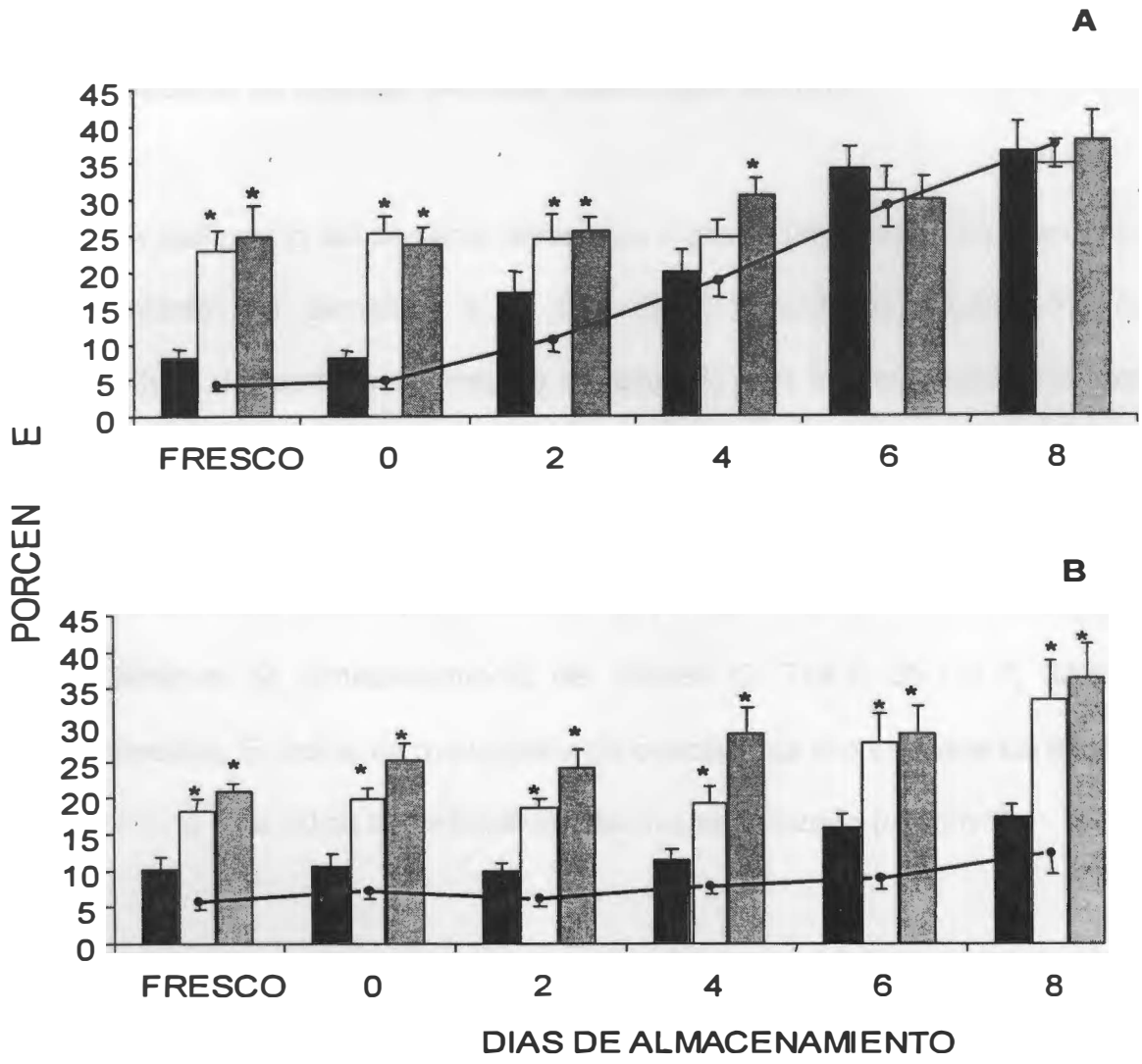

Figura. 4. Estado fisiológico de la membrana plasmática determinado por CTC en espermatozoides sometidos a cuatro tratamientos. Porcentaje promedio (±EE) de espermatozoides capacitados (A) y con RA (B). La línea continua indica el efecto del almacenamiento del semen a 16°C (tratamiento testigo); las barras negras indican el efecto de la adición de P_4; las barras transparentes indican el efecto de la capacitación *in vitro* durante 4.5 h y las barras punteadas muestran el efecto del tratamiento combinado (capacitación *in vitro*+P_4). El estado fisiológico de la membrana espermática fue determinado mediante la tinción de CTC fluorescente. Los espermatozoides capacitados se determinaron por fluorescencia en la región acrosomal y una banda no teñida en la región postacrosomal; los espermatozoides con RA no mostraron fluorescencia en la cabeza excepto una banda en la región ecuatorial. * indica diferencias significativas ($p<0.05$) con respecto al tratamiento testigo.

7.8. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino sobre la capacidad de fertilizar ovocitos homólogos *in vitro.*

En la realización del presente ensayo se eligieron únicamente tres tiempos de almacenamiento del semen (0, 4 y 8 días), considerados como los más representativos del periodo de estudio de acuerdo con los resultados mostrados previamente. El porcentaje de ovocitos fertilizados fue similar cuando se usó semen de 0, 4 y 8 días de almacenado (72.3±3.6, 67.3±3.6, 67.2±3.6 respectivamente, $p>0.05$). De la misma manera, el porcentaje de polispermia se mantuvo constante en los tres tiempos de almacenamiento del semen (37.7±4.3, 35.7±4.3, 30.8±4.9, respectivamente). El índice de maduración de ovocitos fue alto en todos los ensayos, de 80 a 85%, lo cual indica la confiabilidad del modelo utilizado (cuadro 7).

CUADRO 7. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN SOBRE LA CAPACIDAD DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (% PROMEDIO ± EE) (n=6).

Días de almacenamiento del semen	No de ovocitos	% Ovocitos maduros	% FIV	% Polispermia
	308	85.4±2.0	72.3±3.6[a]	37.7±4.3[a]
4	374	80.2±2.1	67.3±3.6[a]	35.7±4.3[a]
8	218	83.5±2.2	67.2±3.6[a]	30.8±4.9[a]

[a] literales distintas entre columnas son significativamente diferentes ($p<0.05$).

8. DISCUSION.

En el presente trabajo se encontró que a medida que avanza el almacenamiento del semen porcino a 16°C en un diluyente de larga duración (Reading) se suscitan cambios en las membranas espermáticas parecidos a la capacitación. A este evento lo hemos denominado *capacitación por almacenamiento*, para distinguirlo de la capacitación *in vitro* y de la causada por otros procesos de manipulación (citometría de flujo, congelación-descongelación). Thundathil *et al.* [71] utilizaron el término *capacitación prematura* para referirse a la capacitación que experimentan los espermatozoides de bovino sometidos a congelación-descongelación.

La capacitación espermática por almacenamiento se presentó espontáneamente a partir del cuarto día de conservación y continuó hasta el octavo día. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de Maxwell y Johnson [49] y Watson [81], quienes encontraron que el enfriamiento del semen de 38°C a 15°C indujo cambios en las membranas espermáticas parecidos a la capacitación y/o la RA, pero difirieron con respecto a la velocidad con que se producen. Maxwell y Johnson [49] observaron que estos cambios se presentan después de 180 min. de almacenamiento en solución Tyrode o en PBS, mientras que aquí encontramos que son más lentos. En efecto, en los primeros dos días de almacenamiento se observó un ligero incremento de los espermatozoides capacitados y solo fue significativo a

partir del cuarto día. Probablemente ello se deba a que en este caso, utilizamos un diluyente de larga duración (Reading), que contiene trehalosa y cloruro de potasio, los cuales estabilizan la bicapa de lípidos de las membranas espermáticas y ejercen una acción protectora contra el frío [61]. El diluyente también contiene EDTA, el cual ejerce una acción quelante de los iones divalentes, como el Ca^{2+} y limita su ingreso a la célula espermática [39]. De esta manera, el Reading puede proteger transitoriamente (48 a 96 h) a los espermatozoides de la capacitación por almacenamiento.

Watson [81] discute varios mecanismos mediante los cuales el frío (5 y 15 °C) puede inducir cambios en las membranas espermáticas. Primero, plantea que conforme la temperatura del semen desciende, de 30 a 5°C, se producen cambios en la composición y en la organización de la bicapa de lípidos de las membranas, aumenta su permeabilidad y los iones de Ca^{2+} libres en el medio pueden entrar a la célula. Consecuentemente, se estimulan los mecanismos dependientes del Ca^{2+} asociados con la capacitación y la RA. Alternativamente, el frío puede inhibir los mecanismos diseñados para mantener la asimetría de la bicapa, resultando en una membrana más fusogénica y de esta manera la capacitación se efectúa por mecanismos diferentes a los tradicionales. Una tercera posibilidad es que las bajas temperaturas influyan en el citoesqueleto, el cual es el responsable de la estabilidad de las membranas y un recalentamiento puede desestabilizarlas y prepararlas para la fusión, constituyendo un mecanismo de capacitación alternativo. Green y Watson [25] investigaron la naturaleza de los cambios de las membranas espermáticas

inducidos por el frío a 5°C y los compararon con los de la capacitación *in vitro*, concluyendo que ambos estímulos siguen rutas diferentes para alcanzar un mismo propósito: la capacitación.

Es posible que el frío no sea el único responsable de la capacitación espermática por almacenamiento. El bicarbonato de sodio presente en el Reading, también puede producir cambios en las membranas espermáticas. Harrison *et al.* [28] observaron que el bicarbonato de sodio/CO_2 indujo un incremento en los patrones de capacitación espermática, debido a modificaciones rápidas y reversibles en la arquitectura de los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides; ocasionando un incrementó del Ca^{2+} al interior de la célula y estimulando la cadena de señales de transducción asociada a la capacitación [38]. Si bien es cierto que el bicarbonato de sodio/CO_2 actúa a temperaturas superiores de 30°C, no se descarta que a 16°C también mantengan la acción desestabilizadora en las membranas espermáticas. Así lo sugiere el trabajo de Maxwell y Johnson [49], quienes encontraron un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados cuando el semen se resuspendió en una solución con bicarbonato de sodio (Tyrode) *vs* una solución sin bicarbonato de sodio (PBS), a 15°C (37 % *vs* 27 %). Puesto que el diluyente Reading contiene 20.8 mM [61] de bicarbonato de sodio de sodio, y la solución Tyrode contiene 25 mM [10], es posible que este componente induzca cambios en la estructura de la MP, pero es un aspecto que debe ser aún estudiado.

También, se ha observado que una excesiva dilución del semen puede conducir a una perdida de la movilidad, de la actividad metabólica y de la capacidad fertilizante *in vivo*, a esto se le conoce como "efecto de dilución" y una situación similar se puede presentar durante el almacenamiento del espermatozoide, durante el cual la dilución remueve proteínas, antioxidantes y otros componentes del plasma seminal. La remoción o alteración de estas moléculas sobre la superficie del espermatozoide está asociada a procesos de capacitación. Asimismo, el plasma seminal incrementa la resistencia de los espermatozoides de cerdo al shock por frío y su adición a una suspensión de espermatozoides capacitados por acción del bicarbonato de sodio reestablece la arquitectura original de las membranas [48]. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el almacenamiento a 16°C en diluyentes de larga duración induce la capacitación espermática deben ser motivo de una mayor investigación.

Contrariamente a nuestras expectativas, la capacitación *in vitro* del semen después de cuatro, seis y ocho días de conservación, no superó el porcentaje de espermatozoides capacitados obtenidos solamente por efecto del almacenamiento, y pareciera que se ha reducido el potencial de capacitación en los espermatozoides con más 4 días de almacenamiento. Además el porcentaje de espermatozoides reaccionados, también se incrementa con la capacitación *in vitro*. Mattioli *et al.* [47] informaron que el semen almacenado en BTS por 1 y 3 días requiere menor tiempo de capacitación que el semen fresco (90 *vs* 180 min., respectivamente). Puesto que

en el presente estudio el periodo de incubación *in vitro* fue de 4.5 h, la capacitación pudo ocurrir rápidamente y los espermatozoides haber experimentado RA espontánea. Pero esto no fue posible observarlo, debido a que la evaluación espermática se realizó después de ese tiempo.

En otros trabajos [26, 85] se informa de la posibilidad de que los espermatozoides eyaculados de cerdo alcancen espontáneamente el estado de RA, después de un periodo de capacitación *in vitro*. La RA que ocurre en ausencia de un estimulo natural, como la P_4 o la ZP, se le ha denominado como reacción acrosomal espontánea (RAE) [85]. Barboni *et al.* [5], en el semen fresco, encontraron 14 % de RAE, después de 4 h de capacitación *in vitro* y Vázquez *et al.* [74] encontraron 9 a 10 % de RAE, después de 40 min. de capacitación *in vitro*. Estos valores, son inferiores a los encontrados en el presente trabajo, probablemente debido a que, en nuestro caso, el periodo de capacitación empleado fue mayor (4.5 h). Sin embargo, este evento no está documentado para el caso de los espermatozoides conservados a 16°C en diluyentes de larga duración. En el presente trabajo se observó que la capacitación *in vitro* de los espermatozoides diluidos en Reading, produjo un incrementó en el porcentaje RAE en todos los tiempos de almacenamiento, siendo más consistente este aumento al sexto y octavo días. Lo anterior sugiere que la capacitación *in vitro* durante 4.5 h estimula no solo la capacitación espermática, sino también la RA.

La adición de P_4 al semen fresco y diluido sin capacitación *in vitro* previa, tuvo como propósito probar la siguiente hipótesis: si los espermatozoides habiendo experimentado durante el almacenamiento cambios de membrana parecidos a la capacitación, entonces la adición de un inductor de RA, como la P_4, producirá un incremento en la proporción de espermatozoides con RA. Sin embargo, en el presente trabajo la P_4 no fue capaz de inducir la RA particularmente entre el cuarto y el octavo día de almacenamiento, ya que en este lapso se incrementa la proporción de espermatozoides capacitados por almacenamiento. Estos resultados no coinciden con estudios previos, ya que la acción no genómica de la P_4 es bien conocida [4] y ha sido utilizada con éxito como un inductor de la RA, cuando se adiciona a espermatozoides capacitados de cerdo [51].

El tratamiento de capacitación *in vitro* + P_4, fue diseñado para inducir simultáneamente un aumento de la capacitación espermática y de la RA, tanto en el semen fresco, como en el diluido, cosa que efectivamente ocurrió. Sin embargo, el incremento de la RA más que un efecto de la P_4, fue debido esencialmente al tratamiento de capacitación *in vitro* al que se sometieron los espermatozoides durante 4.5 h antes de adicionar la P_4. Asimismo, el aumento en la proporción de los espermatozoides capacitados, también, se debió a un efecto de la capacitación *in vitro*, pero esto solamente ocurrió en el semen fresco y diluido, con 0, 2 y 4 días de almacenamiento, pero, entre el sexto y octavo día ya no se observó este efecto, con respecto al tratamiento testigo.

Se observó que la viabilidad espermática y la movilidad progresiva, aún cuando experimentan un descenso significativo en sus valores promedio, a partir del segundo día de almacenamiento, al final del mismo se mantuvieron por arriba de los valores límite consignados en la literatura. Para el caso de la viabilidad espermática, los resultados del presente trabajo coinciden con Johnson *et al.* [38] y Jounala *et al.* [41] quienes encontraron 90 % y 82 % de células vivas a los 9 y 7 días de almacenamiento, respectivamente, con diferentes temperaturas y tipos de diluyentes. Asimismo, en el presente trabajo la movilidad progresiva al octavo día de almacenamiento fue superior al 60 %, valor considerado por Flowers [20] como límite para evitar una disminución de la fertilidad o del tamaño de camada. Jounala *et al.* [41] mencionan que el valor limite de movilidad progresiva para el semen almacenado en un diluyente de larga duración es del 45%. En conjunto, nuestros resultados indican que el diluyente Reading es capaz de mantener elevada la viabilidad espermática hasta el final del periodo de estudio y una movilidad progresiva dentro de los valores límites aceptables. Por esto consideramos que la reducción de la capacidad fertilizante del semen después de cinco días de almacenamiento, reportada por Revell y Glossop [61], no puede ser atribuible solo a estas variables.

Para determinar si los espermatozoides capacitados por almacenamiento experimentan disminución en su capacidad fertilizante, se realizó un ensayo de FIV. Los resultados indican que el semen almacenado hasta por 8 días conserva su capacidad fertilizante, bajo condiciones *in vitro*. Originalmente se esperaba que no

fuera así, debido a los cambios de membrana que experimentan los espermatozoides durante el almacenamiento, particularmente cuando se reporta un incremento de la RA [49]. Adicionalmente, Vazquez *et al* [75] encontraron una descenso constante de la capacidad fertilizante del semen almacenado en MR-A a partir del segundo día y hasta el noveno. Sin embargo, parece que nuestros resultados son correctos debido a que la capacitación espermática es una etapa de preparación de la célula, en la cual adquiere la habilidad de interaccionar y penetrar al ovocito y de [85].

Los resultados del presente trabajo tienen importantes **implicaciones prácticas** para el manejo del semen conservado en diluyentes de larga duración en programas de IA. De acuerdo a la movilidad y viabilidad mostradas en el presente trabajo, el semen de 4 a 8 días de almacenamiento puede ser utilizado en la inseminación de las cerdas. Sin embargo, el almacenamiento del semen produce un incrementó en la capacitación espermática y consecuentemente la estructura celular en un eyaculado se va haciendo más heterogénea conforme avanza el tiempo de almacenamiento. Así, el semen fresco tiene una estructura celular más homogénea que el semen diluido con cuatro, seis y ocho días de almacenamiento. El semen fresco está constituido principalmente por espermatozoides no capacitados (84 % de la población celular total) y a partir del cuarto día de almacenamiento, la población celular se va diversificando, hasta alcanzar, al octavo día, la siguiente estructura: 42

%, 37 %, 12 % de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados, respectivamente y, 9 % de espermatozoides muertos (datos no mostrados).

¿Cuál es el efecto de esta heterogeneidad celular sobre la capacidad fertilizante del semen almacenado?. En realidad, el incremento de la población celular capacitada en una dosis de semen no significa que exista disminución de la capacidad fertilizante, por el contrario, los espermatozoides almacenados han adquirido la habilidad de reaccionar y fertilizar a los ovocitos. Así lo confirman los resultados encontrados en el presente trabajo, en donde la tasa de fertilización de ovocitos fue similar cuando se inseminaron con semen de 0, 4 y 8 días de almacenamiento. Sin embargo, si este mismo semen se utilizara en la inseminación de cerdas el resultado probablemente sería diferente, ya que el 25%, 36% y 49 % de los espermatozoides presentan desestabilización de membranas (capacitación y RA). Los espermatozoides que se depositan en el tracto genital de la hembra en etapa de RA ya no son capaces de fusionarse a los ovocitos, porque han perdido los receptores de membrana para interaccionar con la ZP y mueren rápidamente; mientras que los espermatozoides que ingresan en la etapa de capacitación son poco hábiles para adherirse a las células del epitelio del oviducto [18], permanecen libres en el lumen por poco tiempo, experimentan RAE y mueren [59]. Otros autores [39, 74] han confirmado el corto periodo de vida de los espermatozoides capacitados. De esta manera, los espermatozoides capacitados por almacenamiento no serían capaces de sobrevivir en el tracto genital de la hembra por un periodo de 12 a 24 h en espera de que ocurra la ovulación [78]. En este sentido, la capacitación

por almacenamiento, es un proceso no deseable que se debe retrasar, para permitir que este proceso se lleve a cabo en el tracto reproductor de la hembra.

9. CONCLUSION.

La conservación del semen porcino a 16°C en un diluyente de larga duración (Reading) produjo un incremento de la capacitación espermática a partir del cuarto día (capacitación por almacenamiento). Consecuentemente, un estimulo adicional como la capacitación *in vitro* no aumentó los niveles de espermatozoides capacitados, pero si incrementó la RA espontánea. En ensayos de FIV la capacitación por almacenamiento no produjo disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, pero en programas de IA es muy posible que esta sea una de las causas que disminuyen la habilidad fertilizante del semen porcino.

10. LITERATURA CITADA.

1. Abeydeera R, Wang W, Cantley T, Prather R, Day N (1998): presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. Mol. Reprod. Dev. 51:395-401.
2. Abeydeera R, Wang W, Prather R, Day N (1998): Maturation *in vitro* of pigs oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod. 58:1316-1320.
3. Althouse G (1997): Comparison of current used semen extenders in the swine industry. Compend Cont Educ Pract Vet 19:777-782.
4. Baldi E, Krausz C, Forti G (1995): Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. Trends Endocrinol. Metab. 6:198-205.
5. Barboni B, Mattioli M, Seren E (1995): Influence of progesterone on boar sperm capacitation. J Endocrinol 144:13-18.
6. Bearer EL, Friend DS (1990): Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. J. Electron Microscopy Technique. 16:281-297.
7. Benoff S (1997): Carbohydrates and fertilization: an overview. Mol. Human Reprod 3:599-637.
8. Berger T (1990): *Pissum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenology 33:689-695.

9. Berger T, Kenneth OT, Meizel S, Hedrick JL (1989): Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. Biol. Reprod. 40:525-530.

10. Betancourt R, Fierro M, Ambriz D (1993): In vitro fertilization of pig oocytes maturated in vitro. Theriogenology 40:1155-1160.

11. Carbonell RM, Navarro FR (1990): Evaluación Económica de la inseminación artificial en semen congelado en cerdas. Vet-Méx 21:17-21.

12. Clarke R, Johnson L (1987): Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. Gamete Research 16:193-204.

13. Conejo-Nava J (1995): La inseminación artificial en la producción intensiva del cerdo. En: La Producción Porcicola en México: Contribución al Desarrollo de una Visión Integral. Kato L (Ed). 1a. ed. Morelia, Michoacán: UAM-Azcapotzalco-UMSNH, pp 249-274.

14. Conejo-Nava J, Becerril A, Ochoa V, Ortega G (1997): Conservación de semen porcino en diluyentes de largo plazo. En: Memoria 1er Curso Int. Reprod. Porcina. Valencia M, Zúñiga M, Saharrea M (Ed). México: Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C., pp 93-106.

15. Decuadro-Hansen G (1999): Avances en inseminación artificial porcina. In: Memorias Curso de Inseminación y Manejo Reproductivo del Cerdo. Piedad. (Ed). 1a ed. La Piedad, Michoacán, México: LAPISA-IMV., pp 1-21.

16. Dostalova Z, Calvette J, Sanz L, Töpfer -P, E (1994): Quantitation of boar spermadhesins in accesory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta 1200:48-54.

17. Eddy EM, O'Brien DA (1994): The spermatozoon. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neil JD (Ed). Second ed. New York: Raven Press, Ltd., pp 29-77.

18. Fazeli A, Ducan A, Watson P, Holt W (1999): Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated to oviductual epithelial cells in porcine species. Biol Reprod 60:879-886.

19. Flesch FM, Gadella MB (2000): Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. Biochim. Biophys. Acta 1469:197-235.

20. Flowers W (1998): Boar fertility and artificial insemination. In: Proc 15th Int Pig Vet Soc Congress. (Ed). Birmingham, UK: Nottinham University Press, pp 45-52.

21. Fraser L, Herold E (1990): Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. Mol Reprod Dev 40:233-241.

22. Galvan GJ (1993) Inseminación de la cerda con semen congelado-descongelado: Revisión Bibliográfica. En: Galvan GJ (ed. UMSNH, Morelia, Mich. , Mexico

23. Garner D, Hafez E (1993): Spermatozoa and plasma seminal. In: AI and Reproduction in Farm Animals. Hafez E (Ed). 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, pp 165-187.

24. Glossop C (1996): New Concepts and technologies for boar semen. In: Glossop C (ed). Amer. Assoc. Swine Pract., Hasting, U.S.A., pp 26-35

25. Green CE, Watson PF (2001): Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. Reproduction 122:889-898.

26. Harrison R (1996): Capacitation mechanisms and, the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fert Dev 8:581-594.

27. Harrison R, Aswhorth P, Miller N (1996): Assessment of sperm function under fertilizing conditions. Reprod. Dom. Anim. 31:25-30.

28. Harrison RA, Mairet B, Miller NG (1993): Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. Mol Reprod Dev 35:197-208.

29. Hoffmo P, Blichfeldt T, Almlid T (1989): Liquid preservation of boar semen. Fertility results obtained by Large-Scale AI in Norway. In: Hoffmo P, Blichfeldt T, Almlid T (eds). University of Nottingham, Loughborough, U.K.

30. Hooper P (1981): Spanish success with farm AI. Pig International :17-22.

31. Hooper P, Green C, Mercer R, Glossop C (1988): The current international explotation of liquid boar semen exports from the U.K. In: Hooper P, Green C, Mercer R, Glossop C (eds). IPVS, Rio de Janeiro, Brazil, p 315

32. Huinker C (1998): Effect of boar semen age on fertility. In: Huinker C (ed) 1th ed. IPVS, Birmingham, England, p 240

33. Hunter R (1982) : Reproduction of Farm Animals. London, U.K.: Longman,

34. Hunter R (1996): How, when and where do spermatozoa gain their fertilizing ability *in vivo*. Reprod. Dom. Anim. 31:51-53.

35. Hunter R (1999): Factors influencing sperm migration in the fallopian tubes. Reprod. Dom. Anim. 34:227-235.

36. Hunter R, Hagbard P, Greve T (1999): Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca^{2+} ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir. Mol. Reprod. Dev. 54:283-291.

37. Jimenéz I., González-Marquez H., Herrera, JA., García A., Betancourt M., Fierro R. (2003): Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. Theriogenology 59:1171-1180.

38. Johnson L, Maxwell W, Dobrinski J, Welch G (1996): Staining sperm for viability assessment. Reprod. Dom. Anim. 31:37-47.

39. Johnson L, Weitze K, Fiser P, Maxwell W (2000): Storage of boar semen. Anim Reprod Sci 62:143-172.

40. Johnson LA (1998): Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: Johnson LA (ed) 1th ed. IPVS, Birmingham, U.K., pp 225-230

41. Jounala T, Salonen E, Nurttila T, Anderson M (1999): Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. Reprod Dom Anim 34:83-87.

42. Kan FWK, Lin Y (1996): Topographical distribution of phospholipids in boar sperm plasma and intracellular membranes as revealed by freeze-fracture cytochemistry. J. Histochem. Cytochem. 44:687-701.

43. Laforest J, Allard D (1996): Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. Reprod. Dom. Anim. 31:275-276.

44. Lyczynski A, Kolat A (1996): Boar preservation in MR-A diluent. Reprod. Dom. Anim. 31:271-272.

45. Martínez E., Vazquez JM., Roca J., Blanco O., Lucas X., Matas C., Gil MA. (1998): Relationship between homologous in vitro penetration assay and boar semen fertility. Theriogenology 49:371.

46. Martín-Rillo S (1982): Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Barcelona, España: Aedos, pp 124.

47. Mattioli G, Barboni B, Lucidi P, Seren E (1996): Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline. Theriogenology 45:373-381.

48. Maxwell W, Johnson L (1999): Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of plasma seminal. Theriogenology 52:1353-1362.

49. Maxwell WM, Johnson LA (1997): Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. Mol Reprod Dev 46:408-418.

50. Mburu J, Einarsson S, Lundeheim N, Rodriguez-Martínez H (1996): Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. Anim. Reprod. Sci. 45:109-121.

51. Melendrez C, Meizel S, Berger T (1994): Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. Mol Reprod Dev 39:433-438.

52. Morisawa M (1994): Cell signalling mechanisms for sperm motility. Zool. Sci 11:647-662.

53. Mortimer ST (1997): A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Human Reproduction Update 3:403-439.

54. Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowiski A, Herman A (1994): protein dependent translocation of aminophopholipids and asymmetric transbilayer distribution in the plasma membrane of ram sperm cells. Biochem. 33:9968-9974.

55. Myles G, Primakoff P (1997): Why did the sperm cross the cumulus? to get to the oocyte. Function of the sperm surface protein PH-20 and fertilin in arriving at, fusing with, the egg. Biol. Reprod 56:320-327.

56. Nixon B, Lu Q, wassler M, Foote C, Ensslin A, Shur B (2001): galactoyltransferase function during mammalian fertilization. Cell Tissues Organs 168:46-57.

57. Peters R, Wells K (1993): culture of pigs embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 48:61-73.

58. Peterson RN, Rusell LD, Hunt WP (1984): Evidence for specific binding of uncapacitated boar spermatozoa to porcine zonae pellucidae in vitro. J. Exp. Zool. 231:137-147.

59. Petrunkina A, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E (2001): Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca^{2+} concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. Reproduction 122:469-480.

60. Reed HCB (1982): Artificial insemination. In: Control of pig Reproduction. Cole, DJA., Foxcroft ,G.R. (Ed). 1th ed. London, U.K.: Butterworth, pp 65-90.

61. Revell S, Glossop C (1989): A long-time ambient temperature diluent of boar semen. Anim Prod 84:579-584.

62. Roldan ERS (1990): Physiological stimulators of the acrosome reaction. In: Fertilization in Mammals. Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (Ed). 1st ed. Norwell, Massachusetts: Serono Symposia, USA, pp 197-204.

63. Rozeboom K, Troedsson M, Crabo B (1998): Characterization of the post-mating uterine inflammatory response in the gilts. J. Reprod. Fert. 78:195-199.

64. Rozeboom K, Troedsson M, Molitor T, Crabo B (1999): The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into uterus of gilts. J. Anim. Sci. 77:2202-2206.

65. Rozeboom K, Troedsson M, Rocha G, Crabo B (2001): The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro. J. Anim. Sci. :996-1002.

66. Saling M, Storey B (1979): Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. J. Cell. Biology 83:544-555.

67. Scott M (2000): A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and ephitelial interaction in the female reproductive tract. Anim. Reprod. Sci. 60-61:337-348.

68. Smith T (1998): The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. Biol. Reprod. 58:1102-1104.

69. Talbot P, Shur B, Myles D (2003): Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zone pellucida interactions, and sperm-egg fusion. Biol. Reprod. 68:1-9.

70. Tardif S, Dubé C, Bailey J (2003): Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. Biol. Reprod. 68:207-213.

71. Thundathil J et al. (1999): Premature capacitation and fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. Theriogenology 51:351.

72. Töpfer-Petersen E (1996): Molecular mechanism of fertilization in the pig. Reprod. Dom. Anim. 31:93-100.

73. Töpfer-Petersen E, Killian G, Way A, Engel B, Wolders H (1999): Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract of the zona binding ability of bull spermatozoa. J. Reprod. Fert. 115:175-183.

74. Vazquez J, Martinez E, Roca J, Coy P, Pastor L (1993): Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. Mol Reprod Dev 36:84-88.

75. Vazquez J, Martínez E, Roca J, Matas C, Blanco O (1998): The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen. Reprod. Dom. Anim. 33:267-270.

76. Vishwanath R, Shannon P (1997): Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. Reprod. Fert. Dev. 9:321-331.

77. Waberski D, Meding S, Dirksen G, Weitze K, Leiding C, Willmen T (1992) Fertility results of extender boar semen stored up to five days. A comparison of dilution media. In: Waberski D, Meding S, Dirksen G, Weitze K, Leiding C, Willmen T (eds). ICAR, The Hague, Netherlands, pp 1608-1610

78. Waberski D et al. (1994): The initial fertilizing capacity of longterm-stored boar semen following pre- and posvulatory insemination. Theriogenology 41:1367-1377.

79. Wang W, Niwa K (1995): Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. Zygote 3:345-350.

80. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K (1995): Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. J Reprod Fertil 104:305-313.

81. Watson WP (1996): Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reprod Dom Anim 31:135-140.

82. Weitze K (1990): The use of "long-term extender" in pig IA- a view of the international situation. Pig News Infor. 11:23-26.

83. WHO (1998) : WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University press, pp 107.

84. Wolfe CA, James PS, Mackie AR, S. L, Jones R (1998): Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. Biol. Reprod. 59:1506-1514.

85. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J (Ed). New York: Raven Press, pp 189-317.

86. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers G (1976): The use of zone-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15:471-476.

87. Yoshida M, Mizoguchi K, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T (1993): Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocyte matured in vitro. Theriogenology 39:1303-1311.

88. Zar J (1996): Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, pp 662.

11. APENDICE.

11.1. Resultados del análisis de varianza.

Variable	Fuentes de Variación					
	Tiempo	Cap *in vitro*	P_4	T*Cap	Cap*P_4	T*Cap*P_4
Viabilidad	0.0004	---	---	---	---	---
Movilidad	0.0001	---	---	---	---	---
No capacitado	0.0001	0.0001	ns	0.0005	ns	ns
Capacitado	0.0001	0.0067	ns	0.0001	ns	ns
RA	0.0001	0.0002	ns	ns	ns	ns
% Fertilización	ns	---	---	---	---	---
% polispermia	ns	---	---	---	---	---

11.2. Composición de los medios utilizados en el ensayo de FIV.

Medio de maduración de ovocitos TCM 199-modificado (libre de proteínas).

Componente	Concentración (mM)	g/100 ml
TCM 199	-	100 ml
PVA	-	0.1000 (0.1%)
D-glucosa	3.05	0.05496
Piruvato de sodio	0.91	0.0100
Penicilina	-	0.0075
Estreptomicina	-	0.0050

El medio se esteriliza en filtros Millipore de 0.22 μm y se almacena en refrigeración hasta su uso (preparar cada 15 días para evitar contaminación).

El medio se suplementa el día de uso con:

Cisteína: 0.57 mM

EGF : 10.0 ng/ml.

Las hormonas se agregan hasta que se inicia la maduración de los ovocitos:

LH: 0.5 μg/ml

FSH: 0.5 μg/ml

Medio TALP-Hepes-PVA modificado

(para lavar ovocitos recientemente colectados).

Componente	Concentración (mM)	g/1000 ml	g/2000 ml
Na Cl	114.00	6.6633	13.3266
KCl	3.2	0.2386	0.4772
NaH_2PO_4	0.34	0.0408	0.0816
Lactato Na*	10.00	1.4 ml	2.8 ml
$MgCl_2.6H_2O$	0.50	0.1017	0.2034
HEPES	10.00	2.3830	4.7660
Piruvato Na	0.20	0.0220	0.0440
Sorbitol	12.00	2.1860	4.3720
$NaHCO_3$	2.00	0.1680	0.3360
$CaCl_2.2H_20$**	2.00	0.2940	0.5880
Gentamicina	-	0.0250	0.0500
Penicilina	-	0.0650	0.1300
PVA	-	0.1000	0.2000

*60 % (peso/peso).

**Añadir al último.

Ajustar el PH a 7.3-7.4.

Esterilizar y almacenar a 4°C.

Medio TBM (Tris-buffer medium) para dilución de espermatozoides y fertilización *in vitro*.

Componente	**Concentración (mM)**	**g/100 ml**	**g/200 ml**
Na Cl	113.1	0.6611	1.3222
KCl	3.0	0.0224	0.0448
$CaCl_2.2H_20$	7.5	0.1102	0.2204
Tris*	20.0	0.2423	0.4846
Glucosa	11.0	0.1982	0.3964
Piruvato de Na	5.0	0.0550	0.1100

*TRIS base libre cristalizada (Fisher).

Después de la preparación el pH del medio es de 10 aproximadamente (no ajustarlo).

Almacenar a 4°C y utilizarlo en 2-3 semanas.

Medio de desarrollo embrionario North Carolina University (NCSU-23) (libre de BSA).

Componente	Concentración (mM)	g/100 ml	g/500 ml
Na Cl	108.73	0.6355	3.1775
KCl	4.78	0.0356	0.1780
KH_2PO_4	1.19	0.0162	0.0810
$MgSO_4.7H_2O$	1.19	0.0293	0.1465
D-glucosa	5.55	0.1000	0.500
Glutamina	1.00	0.0146	0.0730
Taurina	7.00	0.0876	0.4380
Hipotaurina	5.00	0.0546	0.2730
$NaHCO_3$	25.07	0.2106	0.0530
$CaCl_2.2H_20$	1.70	0.0250	0.1250
Penicilina G	75 μg/ml	0.0075	0.0375
Estreptomicina	50 μg/ml	0.0050	0.0250

Ajustar el pH a 7.2-7.3 y filtrar.

Almacenar a 4°C.

Usarlo dentro de 3 semanas.

12. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

12.1. Articulo científico.

Conejo-Nava J., Fierro R., Gutierrez C., Betancourt M. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16° C. ***Archives of Andrology***. 49: 287-295 (2003).

12.2. Artículos *in extenso*.

Conejo N. J., Fierro R., Gutiérrez C., Zayas H., Casas E., Betancourt M. Patrones de fluorescencia con clorotetraciclina de espermatozoides porcinos almacenados durante 8 días a 16° C y sometidos a capacitación y reacción acrosomal. ***XXVI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR).*** Acapulco, Gro. 2001.

Conejo-Nava. J., Fierro R., Gutiérrez C., Betancourt M. Fisiología del espermatozoide porcino almacenado en diluyentes de larga duración a 16°C e implicaciones prácticas. ***Memorias IV Jornada Internacional en Producción Porcina***, 45-52. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, DF., 22-23 de mayo, 2003.

12.3. Resúmenes.

Conejo N. J., Fierro R., Gutiérrez C., Zayas H., Casas E., Betancourt M. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino a 16° C sobre la desestabilización de membranas espermáticas, la capacitación y la reacción acrosomal. ***Memoria del VI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud.*** Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa 19-21 de septiembre de 2001.

Conejo N. J., Betancourt M., Zayas H. Aplicación de las técnicas fluorescentes en la predicción de la capacidad fertilizante del semen porcino. ***VII Simposio la Investigacion y el Desarrollo Tecnológico en Michoacán.*** CONACYT-UMSNH. Morelia, Michoacán, México.2000.

Conejo N. J., Fierro R., Gutiérrez C., Zayas H., Casas E., Betancourt M. Efecto del tiempo de almacenamiento del semen porcino a 16° C sobre la desestabilización de membranas espermáticas, la capacitación y la reacción acrosomal. ***XI Simposio la Investigación y el Desarrollo Tecnológico en Michoacán.*** CONACYT-UMSNH. Morelia, Michoacán, México.2001.

3b2 Version Number : 7.51c/W (Jun 11 2001)
File path : p:/Santype/Journals/Taylor&Francis/Aan/49(4)/49(4)-7603/AAN49(4)-7603.3d
Date and Time : 10/4/03 and 04:11

ARCHIVES OF ANDROLOGY 49:1–9 (2003)
Copyright © 2003 Taylor & Francis
0148-5016/03 $12.00 + .00
DOI: 10.1080/01485010390204931

Taylor&Francis healthsciences

MEMBRANE STATUS AND IN VITRO CAPACITATION OF PORCINE SPERM PRESERVED IN LONG-TERM EXTENDER AT 16°C

J. CONEJO-NAVA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

R. FIERRO

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF

C. G. GUTIERREZ

Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, DF

M. BETANCOURT

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF, México

Preservation of porcine semen in long-term extenders at 15–18°C for more than 5 days results in decreased farrowing rates and reduced litter size after artificial insemination, despite the high progressive motility rates of sperm. To improve this preservation system it is necessary to understand sperm physiology under storage conditions. The purpose of this study was to determine the effect of storing diluted porcine semen (during 0, 2, 4, 6, and 8 days) on the sperm membranes status and the ability of sperm to respond to in vitro capacitation treatment. Ten semen samples from 5 adult boars were analyzed. Two aliquots were obtained from the sperm-rich fraction: one was used to assess fresh semen and the other was diluted in Reading extender and stored at 16°C. Both semen samples were stained with chlortetracycline to assess the status of sperm membranes and with Hoechst 33258 to determine viability. Semen storage for 4–8 days increased the proportion

Address correspondence to Dr. Miguel Betancourt, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, AP 55-535, CP 09340, México, DF, México. E-mail: bet@xanum.uam.mx
This study was supported by Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo (México) and Secretaría de Educación Pública (P/PROMEP: UMICH-99-11-01) with a scholarship to JCN. We gratefully thank Eduardo Casas and Hector Zayas for its excellent technical support and the critical reading of the manuscript, and H. González-Márquez for help in editing the manuscript.

of prematurely capacitated sperm. After 4 days of storage, in vitro capacitation treatment did not increase the percentage of capacitated sperm, but increased the percentage of acrosome reacted sperm. This phenomenon could explain the reduced fertilizing ability of porcine semen stored at 16°C for over 4 days, in spite of the acceptable sperm viability and progressive motility.

Keywords acrosome reaction, boar sperm, capacitation, chlortetracycline, long-term extenders, membrane status, semen preservation

Despite high motility rates, pig semen stored in long-term extenders at 15–18°C for more than 5 days results in decreased farrowing rates and lower litter sizes when used in artificial insemination (AI) [1, 4, 12]. It has been observed that porcine sperm cooled in tyrode solution or phosphate-buffered saline (PBS) from 38 to 15°C during 90 min shows capacitation-like changes and acrosome reaction (AR) [16]. Under similar preservation conditions, Watson [21] found increased sperm capacitated while AR did not change. Mattioli et al. [14] indicate that preservation of sperm in Beltsville Thaw Solution (BTS) for 1 and 3 days significantly reduced sperm capacitation times when compared to fresh boar sperm. Membrane changes could affect porcine sperm fertilizing capacity, making it necessary to confirm if these changes occur during storage in long-term extender to 16°C.

During capacitation plasma membrane sperm undergo sequential molecular changes leading to decreased fluidity and increased permeability in preparation for the fusion to oocyte zona pellucida [22]. A procedure that permits the study of the changes in the plasma membrane during capacitation utilizes chlortetracycline (CTC) stain. This fluorescent stain crosses the sperm plasma membrane and binds to free intracellular Ca^{2+}. The CTC-Ca^{2+} complex binds preferentially to hydrophobic regions of the plasma and acrosome membranes, and its distribution determines the functional status of the sperm (noncapacitated, capacitated, and acrosome reacted) [16].

To test the hypothesis that boar sperm plasma membrane may undergo capacitation-like changes and/or AR when stored in long-term extenders at 16°C during 8 days and to evaluate their effects on the ability of sperm to respond to capacitation conditions in vitro, we used the CTC/Hoechst stains and the progressive motility test.

MATERIAL AND METHODS

Collection, Dilution, and Preservation of Semen

Ten semen samples were obtained from 5 adult boars (2 ejaculates per boar) with at least 3 days of sexual abstinence. Semen was collected by the gloved-hand technique, removing the gelatinous fraction. The sperm-rich fraction was transported to the laboratory at 37°C within 1 h for basic evaluation. Only ejaculates showing 85% progressive motility and less than 10% sperm abnormalities were used.

All reagents were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. The water used to prepare solutions was Milli Quality (Millipore). A 1-mL aliquot of the fresh sperm-rich fraction was used to analyze membrane status before dilution (fresh) of the sperm. Within 1 h of arrival, the remainder ejaculate was isothermically diluted at 30°C in Reading extender as described by Revell and Glossop [18], and 1 mL was used to analyze membrane status (it was considered time 0). Dilutions

containing 2.5×10^9 sperm in 50 mL were prepared and bottled in sterile poliethylen-tereftalate containers. Diluted semen samples were kept at room temperature for 1 h before being stored in an incubator (IVM, France) at 16 ± 1°C for up to 8 days.

Assessment and Treatment of Semen

The sperm were analyzed in fresh semen and after dilution and storage for 0, 2, 4, 6, and 8 days. Parameters determined at time 0 were considered as basal within treatment. The stored semen was considered as its own control. Progressive motility, sperm viability, and the proportion of noncapacitated, capacitated, and acrosome reacted sperm were determined.

Progressive Motility, Viability, and Membrane Status

Progressive motility percentages were determined after incubating 1.0 mL semen at 39°C for 10 min. A 20-μL drop of semen was placed on a slide at 37°C and progressive motility was assessed under a light field microscope (200 × magnification).

Sperm viability was determined with Hoechst 33258 (H-33258) according to the methods described by Berger [2]. Status of the plasma and acrosomal membranes was assessed by CTC staining as described by Fraser and Herold [7]. Double-stained slides (CTC/H-33258) were analyzed with an epifluorescence microscope (Carl Zeiss) at 1000 × magnification. Sperm viability was assessed under 360-nm ultraviolet light, and sperm showing evenly distributed fluorescence on the head were considered to be dead. Membrane status was analyzed under 495-nm UV according to the following criteria: sperm with a uniform distributed fluorescence over the whole head and intact acrosome were considered *noncapacitated*; sperm showing bright fluorescence in the acrosomal region beside a fluorescence-free band in the postacrosomal region with an intact acrosome were considered *capacitated*; sperm with dull fluorescence over the whole head except for a thin, bright band in the equatorial segment were considered *acrosome-reacted* [16, 19]. At least 200 sperm cells were analyzed per slide.

In Vitro Capacitation

Sperm were separated from the seminal plasma by placing 1 mL of fresh semen or 1.5 mL diluted semen in a tube containing 2 mL TALP-Hepes medium at 39°C and centrifuging at 320*g* for 5 min. The supernatant was removed and the pellet resuspended in 1 mL TALP-Hepes capacitation medium supplemented with BSA (6 mg/mL) and 1 mM sodium pyruvate at pH 7.4. Aliquots containing 15×10^6 sperm were placed in a 4-well plastic dish (Nunc-Denmark) and incubated at 39°C for 4.5 h in a humid atmosphere with 5% CO_2 [3].

Statistical Analysis

Response variables (motility, viability, and membrane status) were expressed as percentages. Arcsine transformation was performed to correct variance heterogeneity for progressive motility and sperm viability. All variables were analyzed using mixed variance

analysis for repeated measures. Statistical differences between day 0 and other days were analyzed with Dunnett's test. Statistical significance was considered to be at $p < .05$ [23].

RESULTS

Mean sperm viability was $91.4 \pm 1.9\%$ in fresh semen and was not altered in diluted semen stored during 0, 2, and 4 days ($p > .05$). However, viability decreased significantly at 6 and 8 days of storage (87.9 ± 1.9 and $86.9 \pm 1.9\%$, respectively, $p < .05$). Fresh sperm showed the highest progressive motility, which was not different from diluted sperm on day zero (87.5 ± 1.6 and $84.9 \pm 1.6\%$, respectively, $p > .05$). After 2 days, sperm motility decreased significantly ($p < .05$) reaching the lowest motility at 8 days of storage ($62.8 \pm 1.6\%$) (Table 1).

The percentages of capacitation patterns were low in fresh and diluted semen samples of days 0 and 2 (4.3 ± 0.7, 4.8 ± 0.9 and $10.7 \pm 1.8\%$, respectively, $p > .05$), but the capacitation patterns increased significantly at 4, 6, and 8 days of storage (18.7 ± 2.5, 28.8 ± 2.9, and $37.2 \pm 3.3\%$, respectively, $p < .05$). Only $5.7 \pm 1\%$ of sperm showed AR pattern in fresh semen. This percentage increased slightly at day 8 of storage without significative differences ($p > .05$, Table 2).

In vitro capacitation treatment for 4.5 h significantly increased the percentage of sperm with capacitation pattern of fluorescence in fresh and diluted semen stored for 0 and 2 days (23 ± 2.7, 25.3 ± 2.3 and $24.4 \pm 3.3\%$, respectively, $p < .05$). However, the percentage of capacitation pattern after 4, 6, or 8 days of storage (25 ± 2.3, 31 ± 3.3, and $30 \pm 3\%$, respectively) did not differ from that of the control group ($p > .05$, Figure 1A). Nonetheless, in vitro capacitation increased the percentage of acrosome-reacted sperm in fresh and diluted semen at all storage times with respect to the control group ($p < .05$, Figure 1B).

DISCUSSION

Our results show that semen storage at 16°C in a long-term extender (Reading) induces capacitation-like changes in porcine sperm membrane. We have called this phenomenon "storage-induced capacitation" (SIC) to distinguish it from capacitation that occurs by in vitro incubation at 39°C or by other handling processes (flow

Table 1. Viability and progressive motility of fresh semen and semen after dilution in long-term extender (Reading) and preserved for up to 8 days at 16°C

		Diluted semen (days of storage)				
	Fresh semen	0	2	4	6	8
Viability(%)	91 ± 1.9^a	89 ± 1.9^a	89 ± 1.9^a	90 ± 1.9^a	87 ± 1.9^b	86 ± 1.9^b
Motility(%)	87 ± 1.6^a	84 ± 1.6^a	80 ± 1.6^b	76 ± 1.6^b	72 ± 1.6^b	62 ± 1.6^b

Note. Mean (±SEM) of sperm viability or motility having different superscripts differ from that of day 0 ($p < .05$; $n = 10$).

Table 2. Percentage of noncapacitated, capacitated, and acrosome-reacted sperm in fresh and diluted semen in long-term extender (Reading) and preserved for up to 8 days at 16°C

		Diluted semen (days of storage)				
Membrane status	Fresh semen	0	2	4	6	8
Noncapacitated	84 ± 2.0^a	85 ± 1.1^a	77 ± 1.9^a	66 ± 3.0^b	55 ± 4.6^b	41 ± 6.1^b
Capacitated	4.3 ± 0.7^a	4.8 ± 0.9^a	10 ± 1.81^a	18 ± 2.5^b	28 ± 2.9^b	37 ± 3.3^b
Acrosome reacted	5.7 ± 1.0^a	7.3 ± 1.1^a	6.0 ± 0.88^a	7.8 ± 1.2^a	8.8 ± 1.3^a	12 ± 2.7^a

Note. Mean ($\pm$SEM) of specific membrane status having different superscript differ from that of day 0 ($p < .05$; $n = 10$).

cytometry, freezing–thawing, etc). Specifically, SIC increased significantly after 4 days and continued until 8 days of storage. These results are in agreement with those of other authors [16, 21], who found that cooling boar semen from 38 to 15°C induced sperm membrane changes that are alike to those seen under capacitation condition. Maxwell and Johnson [16] observed these changes as soon as 90 min of storage in Tyrode solution or PBS. Under our experimental conditions, slight but not significant changes occurred after 2 days of storage and became significant after 4 days. The differences in sperm capacitation during preservation could be due to the nature of the preservation solution. We used a long-term extender (Reading) containing trehalose and potassium chloride, which according to Revell and Glossop [18] stabilizes the lipid bilayer and protects the membrane from cold temperatures. This extender also contains EDTA, a chelator divalent ions, limiting Ca^{2+} movement across the plasma membrane during dilution and cooling [12, 20]. According to our results, Reading extender could protect sperm from SIC during the first 2–3 days in storage.

Three mechanisms have been proposed to explain why cooling to 5 and 15°C may induce sperm membrane changes [21]. First, as sperm temperature decreases from 30 to 5°C, the lipid bilayer undergoes compositional and organizational changes increasing the membrane permeability and free Ca^{2+} influx, stimulating the Ca^{2+}-dependent mechanisms associated with capacitation and the AR. Alternatively, cooling could also influence the lipid architecture of the membranes, perhaps inhibiting mechanisms designed to maintain asymmetry in the bilayer, resulting in a more fusogenic membrane, bypassing the normal mechanisms capacitation. A third possibility is that the low temperature might influence the cytoskeletal elements responsible for membrane stabilizing. On rewarming, the membranes could thus be unstable and ready for fusion, bypassing the capacitation changes. Green and Watson [8] observed that cooling sperm to 5°C results in a similar endpoint to that observed in capacitated cells in terms of reactive membranes and changes in intracellular ion concentration, which may account for their comparable functionality. However, these modifications are not completely analogous and should not be considered true capacitation, but rather a bypassing of the capacitation process.

Cooling is not the only factor involved in preservation-induced sperm capacitation. Harrison et al. [9, 10] found that bicarbonate/CO_2 induces rapid and reversible changes of the sperm membrane lipid architecture, increases Ca^{2+} influx and stimulates a capacitation signal transduction pathway. Although bicarbonate/CO_2 is known to function at

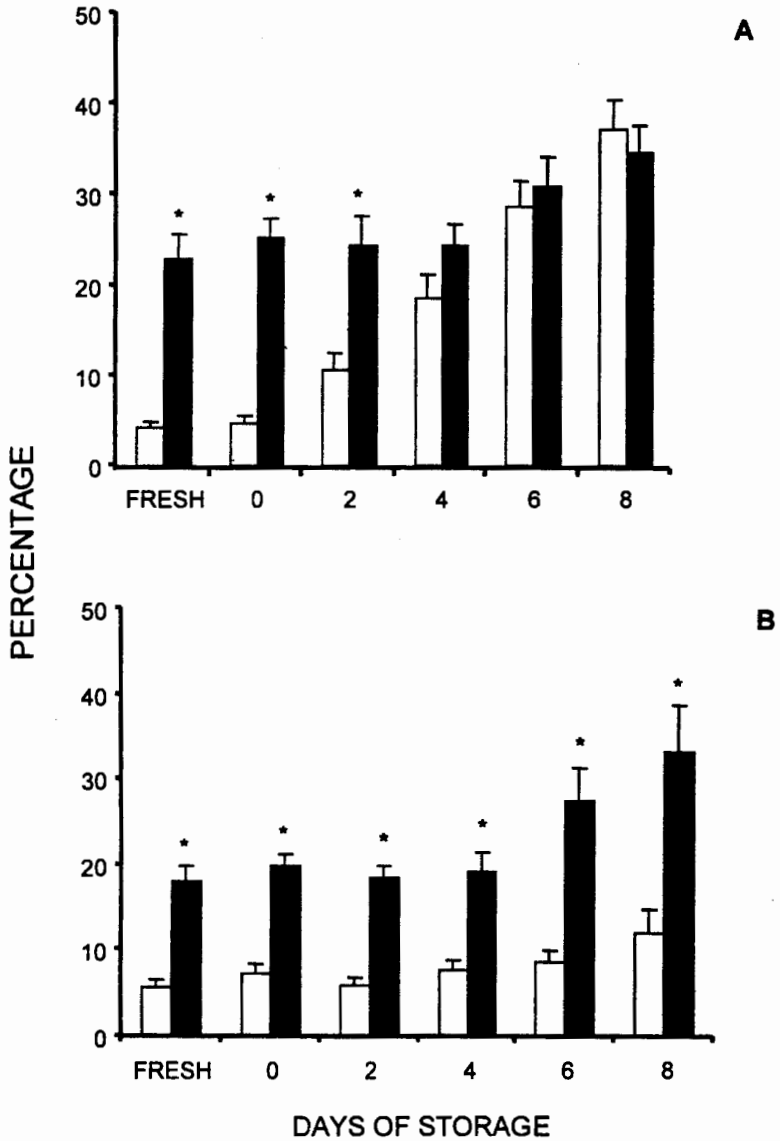

Figure 1. Status of the plasma membrane determined by CTC staining in sperm stored in long-term extender and in vitro capacitated. Mean ($\pm$SEM) percentage of capacitated (A) and acrosome-reacted sperm (B) before (open bars) or after (closed bars) 4.5 h capacitation in vitro in fresh and diluted stored semen. Sperm status was determined with CTC staining where a capacitated sperm appreciated with fluorescence in the acrosomal region beside a fluorescence-free band in the post-acrosomal region of head and intact acrosome and acrosome-reacted sperm appreciated as dull fluorescence over the whole head except for a thin, bright band in the equatorial segment. * Indicates significant differences ($p < .05$) between treatments.

temperatures above 30°C, it may induce its sperm membrane destabilizing action at 16°C. Maxwell and Johnson [16] found higher percentages of capacitated sperm when semen was resuspended in a bicarbonate-containing solution (Tyrode) as compared to a bicarbonate-free solution (PBS) at 15°C. Reading extender has 80% of the bicarbonate content of Tyrode [3, 18], which may explain the structural membrane changes observed. Further studies must be done to determine the effect of bicarbonate on sperm membrane stability at low temperature.

Apart of the above-mentioned effect on membrane status, semen dilution itself could alter sperm membranes. Indeed, excessive semen dilution causes loss of sperm motility, metabolic activity, and fertilizing ability in vivo, which is known as the "dilution effect." A similar situation occurs during sperm storage as dilution removes proteins, antioxidants, and other seminal plasma components from the surface sperm membrane [15]; removal of these molecules is involved in the capacitation processes [22]. When seminal plasma is added to sperm capacitated in bicarbonate-supplemented medium, the original membrane architecture is reestablished [9]. Nevertheless, the mechanism by which storage at 16°C induces sperm capacitation needs further investigation.

Contrary to our expectation, in vitro capacitation after 4, 6, and 8 days of semen preservation did not increase the number of capacitated sperm beyond that reached with storage alone. Therefore, it seems that the capacitation potential of the cells preserved for over 4 days is reduced. Nonetheless, the number of sperm with acrosomal reaction did increase after in vitro capacitation. It has been reported that after 1–3 days of semen preservation the time needed for semen to capacitate is reduced [14]. Since in the present study the period for capacitation was 4.5 h, semen could have capacitated early and undergone spontaneous AR, which would not have been observed when evaluation took place after 4.5 h.

It has been reported that fresh porcine sperm undergoes spontaneous AR after in vitro capacitation [2, 21]. This event has not been documented for semen preservation at 16°C. We found that in vitro capacitation for 4.5 h of semen diluted in Reading not only increases the number of sperm with capacitated patterns but also increases the AR percentage at all storage times, being more evident at 6 and 8 days of storage.

It was observed that even though sperm viability and progressive motility decreased significantly after storage, they are still above the values reported previously. As regards sperm viability, our results are consistent with those of Jounala et al. [13] and Johnson et al. [11], who reported 82 and 90% living cells after 7 and 9 days of storage, respectively. Progressive motility after 8 days of storage was higher than 60%, considered the limit to avoid decreased fertility or reduced litter size [6]. Our results indicate that Reading extender can maintain high sperm viability and acceptable progressive motility levels for up to 8 days. Therefore, the reduced fertilizing ability of semen stored for more than 5 days reported by Revell and Glossop [18] cannot be attributed to decreased viability and motility of sperm.

The results presented here have important practical implications in semen handling and use of long-term extenders for AI programs. Semen storage increases sperm capacitation, modifying in this way the proportion of noncapacitated and AR patterns as a function of storage time. Fresh ejaculates contained 84% sperm with a noncapacitated pattern. In contrast, in diluted semen at the eighth day of storage noncapacitated sperm decreased to

42%, while capacitated patterns increased to 37% and acrosome reacted to 12%. When viability and motility are high, the proportion of noncapacitated sperm should be a prerequisite to consider an ejaculate suitable for AI. Based on the present results, we suggest that the fertilizing ability of an ejaculate is determined by the proportion of noncapacitated sperm.

Capacitated sperm are known to have a shorter life span than noncapacitated sperm; even the life span of reacted sperm is still shorter [21]. Thus, after storage sperm may not survive in the female genital tract for the 12- to 24-h period, in expecting for ovulation [21]. This may occur because capacitated sperm are less able to adhere to the oviduct epithelial cells, thus shortening survival [5]. Indeed, Petrunkina et al. [17] demonstrated that sperm bound to the oviduct have low Ca^{2+} concentrations and low tyrosine phosphorylation levels, delaying capacitation and prolonging the sperm life span.

In conclusion, preservation of semen at 16°C in a long-term extender increases sperm capacitation from the 4th day of storage. Additionally, in vitro capacitation treatment did not enhance the percentage of capacitated sperm, but increases the percentage of acrosome reacted sperm from 4 to 8 days. These results could explain the reduced fertilizing ability of porcine semen stored at 16°C for more than 4 days, in spite of the acceptable sperm viability and progressive motility percentages, when it is used for AI.

REFERENCES

1. Althouse G (1997): Comparison of current used semen extenders in the swine industry. Compend Cont Educ Pract Vet 19:777–782.
2. Berger T (1990): *Pissum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenology 33:689–695.
3. Betancourt R, Fierro M, Ambriz D (1993): In vitro fertilization of pig oocytes maturated in vitro. Theriogenology 40:1155–1160.
4. Conejo-Nava J, Becerril A, Ochoa V, Ortega G (1997): Pig sperm conservation in long-term extenders. In: International Course on Pig Reproduction. Valencia M, Zuñiga M, Saharrea M (Eds). México: Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C., pp 93–106. (in spanish)
5. Fazeli A, Ducan A, Watson P, Holt W (1999): Sperm–oviduct interaction:induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated to oviductual epithelial cells in porcine species. Biol Reprod 60:879–886.
6. Flowers W (1998): Boar fertility and artificial insemination. In: Proc 15th Int Pig Vet Soc Congress. Birmingham, UK: Nottingham University Press, pp 45–52.
7. Fraser L, Herold E (1990): Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. Mol Reprod Dev 40:233–241.
8. Green CE, Watson PF (2001): Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. Reproduction 122:889–898.
9. Harrison RA, Ashworth P, Miller N (1996): Bicarbonate/CO_2, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. Mol Reprod Dev 45:378–391.
10. Harrison RA, Mairet B, Miller NG (1993): Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. Mol Reprod Dev 35:197–208.

11. Johnson L, Maxwell W, Dobrinski J, Welch G (1996): Staining sperm for viability assessment. Reprod Dom Anim 31:37–47.
12. Johnson L, Weitze K, Fiser P, Maxwell W (2000): Storage of boar semen. Anim Reprod Sci 62:143–172.
13. Jounala T, Salonen E, Nurttila T, Anderson M (1999): Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. Reprod Dom Anim 34:83–87.
14. Mattioli G, Barboni B, Lucidi P, Seren E (1996): Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline. Theriogenology 45:373–381.
15. Maxwell W, Johnson L (1999): Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of plasma seminal. Theriogenology 52:1353–1362.
16. Maxwell WM, Johnson LA (1997): Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. Mol Reprod Dev 46:408–418.
17. Petrunkina A, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E (2001): Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca^{2+} concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. Reproduction 122:469–480.
18. Revell S, Glossop C (1989): A long-time ambient temperature diluent of boar semen. Anim Prod 84:579–584.
19. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K (1995): Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. J Reprod Fertil 104:305–313.
20. Watson P (1990): Artificial insemination and preservation of semen. In: Marsall's Physiology of Reproduction. Lamming G (Ed). Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, pp 747–869.
21. Watson WP (1996): Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reprod Dom Anim 31:135–140.
22. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J (Eds). New York: Raven Press, pp 189–317.
23. Zar J (1996): Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, pp 662.