

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto sobre la viabilidad espermática epididimaria en
condiciones hipotérmicas de *Carpa hircus*
“macho cabrio”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología
Edisson Ruben Jurado Remicio

Lima, Perú

2015

Dedicatoria:

A mis padres Haroldo y Hilda A mis hermanos LLinder, Freddy,
Willner, Madeleyne, Hilda por el apoyo incondicional.

A mi esposa Silvia el amor de mi vida y en especial a mis Hijos
Emanuel y Nicolas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Ricardo Palma, mi alma mater en donde pude lograr y formarme como profesional.

Al Dr. Hugo Gonzales Figueroa quien me ayudo a formarme como investigador.

Al Magister Mauricio Gonzales Molfino, mi asesor quien me permitió concluir mi trabajo de investigación.

Al grupo de estudio, que en su mejor momento comenzamos a descubrir el encanto y la pasión por investigar: Daniel, Javier, Isela, Mikelo, Rosa, Mauricio y Janet.

Al Magister Cesar Puicón por el apoyo en la evaluación de resultados.

A todos aquellos que formaron parte de mi desarrollo de estudiante de pregrado, mis profesores forjadores de buenos profesionales.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la viabilidad espermática epididimaria en condiciones hipotérmicas de *carpa hircus* “macho cabrio”. El tipo de estudio es observacional, descriptivo, prospectivo, transversal y comparativo. Se utilizaron un total de 30 pares de testículos se planteó 3 diseños experimentales: El primero consistió en evaluar los patrones de motilidad espermática en espermatozoides recién obtenidos y en los preservados en condiciones hipotérmicas, el segundo consistió en evaluar a los espermatozoides utilizando la técnica de reacción hiposmótica de la membrana celular (RHE) y el tercero se evaluó el estado de la cromatina nuclear de los espermatozoides sometidos a condiciones hipotérmicas. Como resultados obtuvimos que a 48 horas en la cabeza (caput) se encontró 90% y un 87% en la cola (cauda), a 96 horas en caput se encontró 78% y un 72% en cauda, a 120 horas en caput se encontró 70% y un 63 % en cauda, a 168 horas en caput se encontró 60% y un 60% en cauda ,a 216 horas en caput se encontró 52% y un 49 % en cauda, de porcentaje máximos de espermatozoides vivos respetivamente. Con respecto a RHE se encuentra que en caput es menos la reacción que en cauda en todos los tiempos de preservación, a medida que avanza en el tiempo la RHE disminuye. Con respecto a la evaluación de la condensación de la cromatina espermática (CROMAT) se encontró un 51% en el caput y un 85% en la cauda a las 48 horas versus un 21% caput y un 69% en cauda, a las 216 horas de evaluación respetivamente. En conclusión es factible comprobar que la preservación hipodérmica de caudas epididimarias, colectados de animales sacrificados, se puede conservar las células espermáticas potencialmente fértiles.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of epididymal sperm viability in hypothermic conditions hircus "goat". The type of study is observational, descriptive, prospective, transversal and comparative. We used a total of 30 pairs of testicles 3 experimental designs were raised: The first was to assess patterns of sperm motility in sperm newly obtained and preserved in hypothermic conditions, the second was to assess the sperm using the technique of reaction hyposmotic cell membrane (RHE) and the third state and the nuclear chromatin of sperm under hypothermic conditions was evaluated. As a result we obtained that 48 hours in the head (caput) 90% and 87% in the tail (cauda), 96 hours caput found 78% and 72% in cauda found, 120 hours caput found 70% and 63% in cauda, 168 hours caput 60% and 60% in cauda, 216 hours caput 52% and 49% in cauda, maximum percentage of live respetivamente sperm was found was found. Regarding RHE is that the reaction caput is less than cauda at all times of preservation, as it progresses over time EBRT decreases. With regard to the assessment of sperm chromatin condensation (CROMAT) 51% in the caput and cauda 85% in 48 hours versus 21% caput and cauda 69%, to 216 hours was found evaluation respectively. In conclusion it is feasible to verify that hypodermic preservation of epididymal tails, collected from slaughtered animals can preserve potentially fertile sperm cells.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
III. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	14
3.2. OBTENCIÓN DE LOS EPIDIDIMOS.....	14
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.	15
3.3.1 Evaluación de los patrones de motilidad espermática en espermatozoides recién obtenidos y en los preservados en condiciones hipotérmicas de cabra doméstica.....	15
3.3.2 Evaluación de la Reacción Hiposmótica de la Membrana Celular (RHE) (Jeyendra et,al. 1984)	16
3.3.3 Evaluación de la condensación de la Cromatina Nuclear (CROMAT) en condiciones hipotérmicas (Terquem y Dadoune 1983).....	16
3.4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	17
IV. RESULTADOS	18
4.1 ANÁLISIS DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA:	18
4.2 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN HIPOSMÓTICA DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA:	19
4.3 ANÁLISIS DE LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (CROMAT)	20
V. DISCUSIÓN.....	21
VI. CONCLUSIONES.	23
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	24
VIII. ANEXOS.....	28

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA N° 01: TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DEL ESPERMATOZOIDE EN CAPUT	28
TABLA N° 02: TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DEL ESPERMATOZOIDE EN CAUDA	28
TABLA N° 03 ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS VARIABLE DEPENDIENTE: PORCENTAJE DE SOBREVIVIENTES	29
TABLA N° 04 TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD	30
TABLA N° 05 REACI3N HIPOSM3TICA DEL ESPERMATOZOIDE DEL CAPUT	30
TABLA N° 06 RHE DEL ESPERMATOZOIDE CAUDA	31
TABLA N° 07 ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS VARIABLE DEPENDIENTE:PORCENTAJE DE RHE	31
TABLA N° 08 TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE RHE	32
TABLA N° 09 CROMAT DEL ESPERMATOZOIDE CAPUT	33
TABLA N° 10 CROMAT DEL ESPERMATOZOIDE CAUDA	33
TABLA N° 11 ESTADISTICO DESCRIPTIVO VARIABLE DEPENDIENTE : PORCENTAJE DE CROMAT	34
TABLA N° 12 TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE CROMAT	35
TABLA N° 13 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO SAN MARCOS	36
CUADRO N° 01 MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE MOTILIDAD	37
CUADRO N° 02 MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE MOTILIDAD	38
CUADRO N° 03 MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE RHE	39
CUADRO N° 04 MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE RHE	40
CUADRO N° 05 MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE CROMAT	41
CUADRO N° 06 MEDIAS MARGINALES DE PORCENTAJE DE CROMAT	42
FOTO N° 01 FRONTIS DES CAMAL DE YERBATEROS, DISTRITO DE LA VICTORIA – LIMA.	43
FOTO N° 2	43
FOTO N° 03 EPIDIDIMO	44
FOTO N° 04 ALMACENAJE DEL EPIDIDIMO EN EL TUBO C3NICO	45
FOTO N° 05 MICROFOTOGRAFIA DE ESPERMATOZOIDES COLOREADOS CON AZUL DE ANILINA, OBSERVADOS EN MICROSCOPIO 3PTICO A 1000 X.	46

I. INTRODUCCIÓN

La preservación térmica de espermatozoides ha llegado a ser un procedimiento importante en ganadería y medicina para obtener altas tasas de sobrevivencia y además estudiar los cambios celulares ocurridos durante este proceso.

La capacitación espermática es un proceso complejo que confiere al espermatozoide capacidad fecundante. Existen evidencias que el frío provoca una capacitación prematura. El conocimiento de esta hipotética crio-capacitación resultaría de gran importancia para la comprensión de las alteraciones producidas por la exposición al frío, especialmente en especies mamíferas que muestran una gran susceptibilidad a los procesos de crio-conservación. Existen evidencias que durante estos procesos, se producen alteraciones morfológicas, principalmente en la membrana plasmática y en el acrosoma del espermatozoide que disminuirían su viabilidad y por consiguiente fertilidad cuando son usados en los programas de inseminación artificial.

El epidídimo es un órgano crucial, puesto que cuando el espermatozoide atraviesa este conducto logrando una serie de condiciones que modulan su condición fértil, la membrana plasmática llega a su madurez, permitiendo el flujo de moléculas que influirán en el inicio de la motilidad, simultáneamente el núcleo espermático inicia la condensación de su cromatina.

Por esta razón el objetivo de esta investigación es evaluar la viabilidad del espermatozoide de *Capra hircus* en condiciones hipotérmicas, evaluando la motilidad, la reacción hiposmótica de la membrana plasmática (RHE) y la condensación de la cromatina nuclear (CROMAT) en espermatozoides mantenidos en caudas epididimarias en el medio de incubación San Marcos (SM) a temperatura de 5°C, (Frigider) el cual será cambiado cada 2 días, durante un periodo de 10 a 11 días.

II. ANTECEDENTES

El espermatozoide mamífero recién eyaculado necesita adquirir capacidad fértil a través de cambios concurrentes que ocurren en el tracto genital de la hembra, denominados “capacitación” (Bedford, 1970). Aunque los mecanismos moleculares de la capacitación no están completamente aclarados, muchos estudios han demostrado la participación de numerosas modificaciones estructurales y bioquímicas en los espermatozoides, como cambios en la composición y fluidez de la membrana (Langlais & Roberts, 1985; Harrison et al., 1996; Lin & Kan, 1996), aumento del calcio intracelular (Visconti et al., 1995), alcalización del citoplasma (Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995), activación de canales iónicos (Florman et al., 1998), y la generación de especies oxígeno reactivas entre otros. De la misma manera, existen evidencias de que la capacitación está asociada con la fosforilación de proteínas en tirosina (Chamberland et al., 2001), que se modula a través de una vía dependiente del AMPc en muchas especies, incluyendo ratón (Visconti et al., 1995), humanos (Galantino-Homer et al., 1997), toro (Leclerc et al., 1996) entre otros. La capacitación de los espermatozoides de mamíferos también puede ocurrir *in vitro* en medios químicamente definidos o en medios suplementados con algunas macromoléculas o moléculas energéticas (Gonzales-Figueroa & Gonzales-Molfino, 2001).

Existen evidencias de que los procedimientos de crio-conservación (Dilución, refrigeración, congelación estándar y verificación) inducen cambios, en los espermatozoides, similares a los que ocurren en la capacitación fisiológica, por lo que a estos cambios se le conocen como “crio-capacitación” y se le asocia con la baja fertilidad que se encuentra en las inseminaciones que se realizan con el semen descongelado.

Durante el proceso de refrigeración y/o preservación hipotérmica se ha detectado cambios en el espermatozoide similares a los que ocurren durante la capacitación (Watson, 1996) como alteración de la fluidez de la membrana y cambios en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del Ca^{2+} , entre otros (Green & Watson, 2001).

Además, el aumento de Ca^{2+} intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa parecida a una reacción del acrosoma, pero que ocurre de manera precoz y que haría a estos espermatozoides incapaces de fecundar el ovocito (Watson, 2000). Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios que ocurren durante la capacitación *in vitro*, dando lugar a un estado de capacitación “intermedia” que haría que los espermatozoides no tengan el tiempo suficiente de viabilidad para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales *in vivo*. Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones en la organización de la membrana plasmática, que es la estructura más sensible a la refrigeración, ya que presenta áreas completamente diferentes en cuanto a la disposición de los lípidos y proteínas, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas en áreas diferentes. La conservación de dichas áreas resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada una asume una función muy específica en la fecundación (Parks & Graham;1992), La deformación acrosómica y lesiones en las mitocondrias son otras de las alteraciones que provoca la baja de temperatura.

La preservación hipotérmica consiste en colocar, inmerso en un medio sin macromoléculas, epidídimos de mamíferos, sellar la superficie con aceite mineral y mantener el tubo de cultivo a 5°C (Temperatura similar a la usada en la refrigeración), recambiando el medio cada 48 h. Usando este método se ha mantenido la sostenibilidad de los espermatozoides de cuy hasta por 15 días, los de macho cabrío hasta 12 días y los espermatozoides de alpaca hasta por 10 días inclusive. Es interesante comprobar que cultivando epidídimos colectados después de la muerte del animal, las células espermáticas permanecen, potencialmente, fértiles por varios días (Gonzales-Figueroa et al., 1999).

La sostenibilidad de los espermatozoides de cuy se expresó por la supervivencia de 15 días en condiciones hipotérmicas, y además por el acortamiento en 60 min. del tiempo de la hiperactivación después de las 24 h. de preservación hipotérmica y que se mantuvo hasta los 11 días inclusive (González-Figueroa, 1988), a juzgar por la penetración en ovocitos de hámster sin zona pelúcida. Si bien es cierto que el frío daña la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide (Breitbart et al., 2005), en cuy pareciera existir una correlación entre la capacidad fecundante y la dispersión gradual de la matriz acrosómica en condiciones hipotérmicas (González-Figueroa & Valdivia, 1992). Los cambios morfológicos que conducen a la dispersión de la matriz se inician con una pérdida progresiva de la electrodensidad en la porción apical del acrosoma, a partir de las 72 h. de incubación hipotérmica. La membrana externa del acrosoma adopta forma globular a las 120 h., apreciándose gránulos densos y pequeñas vesículas en la matriz acrosómica. Esta dispersión ocurre porque la preservación hipotérmica promueve una permeabilización gradual de la matriz espermática, con características muy similares a la permeabilización inducida por agentes como digitonina (Noland, 1990).

En cuanto a los daños provocados por la congelación y la vitrificación, las evidencias demuestran que siempre las membranas celulares son más sensibles a los daños que provocan las bajas temperaturas, en relación al núcleo y al segmento intermedio del espermatozoide. En relación al acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna y la matriz acrosomal (Salamon & Maxwell, 1995). Durante los procesos de congelación y descongelación las membranas son sensibles a los cambios de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico, también deben incluirse las alteraciones del volumen de la célula, provocado por la adición del crio protector antes de la congelación, las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, la deshidratación derivada de la congelación, las fases de transición de los fosfolípidos de membrana, así como los efectos de la elevada concentración de solutos y la formación intracelular de hielo (Parks y Graham, 1992).

Estas evidencias indican que los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica, además de la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante los procesos de congelación y descongelación (Ollero et al., 1998).

La preservación hipotérmica de caudas epididimarias de mamífero constituyen una excelente alternativa para obtener espermatozoides con capacidad fértil (Gonzales-Figueroa.,1988).

(Gonzales-Figueroa et al, 1993), pudieron estudiar la motilidad de los espermatozoides obtenidos de caudas epidídimarios de macho cabrío las cuales fueron conservadas en condiciones hipotérmicas por un periodo de 11 días. (Gonzales-Figueroa et al, 1993),

El epidídimo de mamífero es una cámara de maduración del espermatozoide la cual ocurre través de la secreción de proteínas androgenas esto se debe a una interacciono gameto – epidídimo (Burgos et al.;1993).

La condensación de cromatina nuclear es un indicador de la madures del espermatozoide epididimario y está relacionada con la madures de membrana plasmática durante la cual ocurre en el transito epididimario (Maxwell., wm, & Johnson., la. 1997).

La capacitación es un fenómeno multifacético correlacionado con cambios en el metabolismo espermático, concentración iónica intracelular relacionados con la fluidez de la membrana plasmática, lo que involucra una reorganización de la membrana, cambios en el pH intracelular, concentración de AMPc intracelular y presencia de especies oxígeno reactivas (Jha et al., 2003).

La capacitación espermática inducida por hipotermia o crio preservación se le denomina crio capacitación y afecta la calidad espermática, de manera que en los espermatozoides descongelados el porcentaje de fecundación disminuye considerablemente. En los espermatozoides de cerdo, la crio capacitación es la expresión celular de la fosforilación de proteínas espermáticas en tirosina y por lo tanto posible el nivel de fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas de los espermatozoides podría ser utilizado para detectar los cambios inducidos durante la crio preservación de semen de cerdo (Wysocki et al., 2009).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron un total de 30 pares de testículos de macho cabrio "*Capra hircus*" para el presente trabajo, los que fueron obtenidas de animales sacrificados para el consumo humano, del camal de Yerbateros – Ate Vitarte – Lima.

Estos testículos se lavarón con suero fisiológico, luego fueron colocados en tubos cónicos de 50ml de polietileno (Falcon®), que contenía 10 ml de solución fisiológica salina al 0.9% NaCl con antibióticos (100UI/mL penicilina y 100 mg/ml estreptomicina) para evitar los contaminantes.

Posteriormente fueron transportados a temperatura de 5°C en caja de tecnopor hacia el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

3.2. OBTENCIÓN DE LOS EPIDÍDIMOS

En el laboratorio los testículos se lavaron 05 veces con una solución buffer (PBS) a 37°C, secándose con papel absorbente. Luego se procedió a separar los epidídimos y el conducto deferente mediante un corte con tijera recta.

Una vez obtenidos los epidídimo estos se y se colocaron en tubos de polipropileno cónico con tapa de 50 ml estéril, al cual se le adicionó medio de cultivo SM (San Marcos) al final de este proceso se colocó 1 ml de aceite mineral.

Posteriormente se llevó a la refrigeradora a una temperatura de 5°C, el medio de cultivo SM fue renovado cada 48 horas, se utilizó una membrana filtrante de Poliestersulfona de 0.2 µm de poro y 47 mm de diámetro en un sistema de filtración al vacío Marca Pall código 4241, todo el sistema de filtración será previamente esterilizado en autoclave).

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.3.1 Evaluación de los patrones de motilidad espermática en espermatozoides recién obtenidos y en los preservados en condiciones hipotérmicas de cabra doméstica

Con la finalidad de cumplir con este objetivo se cortó un pedazo de segmento de caput y una de cauda del epidídimo por separado, estos fueron colocados en placas Falcón estériles de polipropileno de 37 mm de diámetro y 8 mm de altura previamente rotulados con un lápiz de diamante y se añadió 1.5 ml de medio de cultivo SM estéril, posteriormente con una pinza de punta fina estéril se procedió a triturar los segmentos de caput y cauda, esto facilitó la salida de los espermatozoides para ser evaluados, al terminó de este proceso se colocó 1.5 ml de aceite mineral, con la finalidad de cubrir por completo la placa Falcón.

Se preparó una suspensión stock, diluyendo el triturado, para evaluar la motilidad espermática desde las 0 horas, 48 h, 96 h, 120 h, 168 horas y 216 h respectivamente.

Para observar la motilidad espermática se utilizó un microscopio compuesto de un campo claro. Se contaron 100 espermatozoides de la cabeza epidídimo (CAPUT) y de la cola (CAUDA) tomando 4 categorías :

- a.- Motilidad Progresiva lineal rápido.
- b.- Motilidad Progresiva lineal lenta.
- c.- Motilidad Rotatoria.
- d.- Inmóvil.

3.3.2 Evaluación de la Reacción Hiposmótica de la Membrana Celular (RHE) (Jeyendra et,al. 1984)

Con la finalidad de cumplir con este objetivo se colocó 100µl de espermatozoides en un vial de plástico y se adicionará 1 ml de solución hiposmótica, luego será incubado a 37 °C por 45 min.

Una vez transcurido el tiempo se retiró de la incubadora y se observó la muestra en el microscopio compuesto de campo claro a 400 X. Se contó 200 espermatozoides en cuatro campos diferentes de la lámina porta objeto.

La evaluación consistió en observar alguna anormalidad en la cola del espermatozoide. Se analizarán 04 epidídimos. (Por cada intervalo de tiempo).

3.3.3 Evaluación de la condesación de la Cromatina Nuclear (CROMAT) en condiciones hipotérmicas (Terquem y Dadoune 1983)

Con la finalidad de cumplir con este objetivo se colocó 500 µl de espermatozoides y se añadió 1.5 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,2 M (pH 7.5) a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml (estéril).

Posteriormente se centrifugó 3 veces a 1500 rpm por 10 min, eliminando en cada centrifugada el sobrenadante, para obtener el pellet para luego ser re-suspendido en 100 µl PBS.

De este último se tomó una gota y se colocó en una lámina porta objeto realizándose un frotis con la finalidad de ser fijados con glutaraldehído al 3 % por 30 minutos. Posteriormente se utilizó el colorante de Azul de Anilina por 10 minutos. Al término se lavarán con agua destilada y se dejará secar al medio ambiente.

Se observarán al microscopio compuesto de campo claro con objetivo de inmersión y se contarán 200 espermatozoides en 4 campos diferentes.

3.4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se utilizó el programa estadístico ANOVA un factor de clasificación, para evaluación de la motilidad, de la reacción hiposmótica y de la condensa de la cromatina nuclear.

La evaluación se realiza desde 0 h., 48 h., 96 h., 120 h., 168 h. y 216 h. de preservación hipotérmica.

IV. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA:

La motilidad espermática en espermatozoides epididimarios son parámetros que nos indican en una primera evaluación, la calidad de los espermatozoides de la especie en estudio.

Se observa que el porcentaje de Motilidad es diferente entre las dos partes (caput y cauda) y en todos los tiempos de evaluación que se observa en las medidas marginales de porcentaje de motilidad. (Cuadro N° 2).

La motilidad espermática en el primer día de evaluación fue alta 95% (caput) y 92% en cauda pero fue disminuyendo conforme pasaban las horas de preservación hipotérmica aumentando el número de espermatozoides muertos (Tabla N° 1 y 2). A 48 horas en Caput se encontró 90% y un 87 % en Cauda, a 96 horas en Caput se encontró 78% y un 72% en cauda, a 120 horas en Caput se encontró 70% y un 63 % en Cauda, a 168 horas en Caput se encontró 60% y un 60% en cauda ,a 216 horas en Caput se encontró 52% y un 49 % en Cauda, de porcentaje máximos de espermatozoides vivo (Cuadro N°1) , es interesante resaltar que los espermatozoides del caput del epidídimo mostraron un desplazamiento progresivo cuando estos fueron incubados en el medio SM.

Estos resultados corresponden al análisis estadístico descriptivos de la variable dependiente en porcentaje de sobrevivencia. (Tabla N° 03)

Se observó una población muy baja del espermatozoide en el segmento de Caput (cabeza) aumentando gradualmente hasta la Cauda (cola) del Epidídimo, el porcentaje de motilidad promedio es diferente en los tiempos de supervivencia ($P=0.000$). (Tabla N° 04)

4.2 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN HIPOSMÓTICA DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA:

La evaluación de la integridad de la membrana citoplasmática espermática, encontramos en una muestra tomada de la gota de dilución un alto porcentaje de colas hinchadas a 0 horas de evaluación encontramos en Caput 57% y en Cauda 93%, a 48 horas de evaluación encontramos en Caput 61% y en Cauda 90%, a 96 horas de evaluación encontramos en Caput 62% y en Cauda 78%, a 120 horas de evaluación encontramos en Caput 40% y en Cauda 69%, a 168 horas de evaluación encontramos en Caput 20% y en Cauda 72%, 216 horas de evaluación encontramos en Caput 12% y en Cauda 75%, como porcentajes máximos obtenidos de colas hinchadas, estos valores de RHE + se incrementa desde el caput a la cauda epididimaria, esto indica la progresión de madurez del espermatozoide durante el transito epididimario (Tabla N°05).

El análisis de la integridad funcional de la membrana plasmática indica el grado de madurez del espermatozoide en los diferentes segmentos del epidídimo (Tabla N°06).

Estos resultados corresponden al análisis estadístico descriptivos de la variable dependiente en porcentaje de RHE. (Tabla N°07).

Además de existe diferencia significativa del porcentaje promedio de RHE entre las dos partes del epidídimo ($P = 0.000$) (Tabla N° 08).

En el análisis estadístico de las medias marginales estimadas de porcentaje de RHE se encuentra que en caput es menos la reacción que en cauda en todos los tiempos de preservación, a medida que avanza en el tiempo la RHE disminuye (Cuadro N° 03) y (Cuadro N° 04).

4.3 ANÁLISIS DE LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (CROMAT)

La evaluación de la condensación de la cromatina espermática, encontramos en una muestra tomada de la gota de muestra procesada un alto porcentaje de células coloreadas (Tabla 9 y 10) a 0 horas de evaluación encontramos en Caput 51% y en Cauda 85%, a 48 horas de evaluación encontramos en Caput 56% y en Cauda 81%, a 96 horas de evaluación encontramos en Caput 61% y en Cauda 76%, a 120 horas de evaluación encontramos en Caput 42% y en Cauda 68%, a 168 horas de evaluación encontramos en Caput 21% y en Cauda 69%, 216 horas de evaluación encontramos en Caput 21% y en Cauda 70%, como porcentajes máximos obtenidos. El porcentaje de espermatozoides condensados y semicondensados indican que la condensación de la cromatina nuclear ocurre en forma similar a la madurez de la membrana plasmática durante el tránsito epidídimo (Tabla N° 11).

Las media marginal estimada de porcentaje en cromat muestra que la mejor parte para obtener los espermatozoides es en cauda (Cuadro N° 05) y (Cuadro N° 06).

Existe diferencia significativa de cromat entre las dos partes del cuerpo con respuesta al porcentaje promedio de cromat. ($P = 0.000$) (Tabla N° 12).

V. DISCUSIÓN

El método de preservación hipotérmica mantiene la supervivencia del espermatozoide de macho cabrio, almacenados en epidídimos, hasta por 12 días inclusive, permitiendo entender algunos procesos involucrados en la maduración post testicular.

Es interesante comprobar que cultivando epidídimo, colectados después de la muerte del animal, se pueden conservar las células espermáticas potencialmente fértiles. En efecto, se ha demostrado que espermatozoides de cobayo no sólo sobreviven 15 días en condiciones hipotérmicas sino que, además los de 11 días inclusive penetran en un alto porcentaje en ovocitos de hámster sin zona pelucida (Gonzales-Figueroa, 1988).

En macho cabrio pareciera suceder algo similar a juzgar por la similitud en los cambios de los espermatozoides de cauda epididimaria de 24 a 264 horas en incubación hipotérmica, la evidencia experimental aún no se ha presentado.

Los espermatozoides del caput del epidídimo, mantenidos a 5°C por 12 días, no muestran cambios notables en su proceso de maduración, la gota citoplasmática permanece en el segmento intermedio, la permeabilidad de la membrana no tiene variación significativa en relación a los de 0 horas de incubación hipotérmica, sin embargo cuando se incuban a 37°C por 3 a 4 horas en el medio SM con piruvato se encuentra, que los del control de 0 horas como los que permanecieron por largo tiempo a baja temperatura, un desplazamiento lineal progresivo en relación al movimiento pendular o inmovilidad observada cuando se incuban en una solución fisiológica sin piruvato. Esto indicaría que en una fuente de energía exógena puede inducir cambios progresivos en la mortalidad, en relación al patrón característico de cada segmento epididimario, a lo mejor activando los procesos involucrados en el metabolismo respiratorio (Garbers, et al. 1971).

Por otro lado, existen evidencias (Pariset, et al.1985) que la concentración de quinasas epididimaria, varían en las distintas regiones del epidídimo, sugiriendo que serían las que modularían el inicio de la motilidad espermática.

La aparición de la motilidad ocurriría en dos fases. El movimiento flagelar se adquiere para que el espermatozoide pase la parte anterior del cuerpo del epidídimo, mientras que la motilidad progresiva se desarrolla cuando el espermatozoide ingresa a la región distal de la cauda del epidídimo. El patrón de motilidad progresiva ocurre sin ningún cambio detectable en la actividad de la proteína quinasa A, en cambio el batimiento del flagelo está íntimamente relacionado con un incremento dramático de la quinasa A cuando el espermatozoide.

VI. CONCLUSIONES.

Es factible la preservación de células espermáticas potencialmente fértiles de animales sacrificados

La supervivencia de los espermatozoides almacenados en el epidídimo en condiciones hipotérmicas puede llegar hasta 216 horas.

El análisis de RHE indica la madurez del espermatozoide en los diferentes segmentos del epidídimo.

El grado de condensación de cromatina nuclear es un buen indicador para la evaluación de la madurez nuclear de la población espermática en los diferentes segmentos del epidídimo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bedford, JM. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 128-158.

Burgos, MH. 1993. El proceso de maduración del espermatozoide durante el tránsito epididimario. En: *Progresos en Biología Celular* (Becerra J., Pérez Figares JM., Fernández – Llebreg P. eds.). *Archivos de Biología y Medicina Experimental* 22: 99 -103.

Breitbart, H; Cohen, G. & Rubinstein, S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction, *Reproduction*. 263–268.

Chamberland, A; Fournier, V; Tardif, S; Sirard, MA; Sullivan, R. & Bailey, JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*. 55:823– 835.

Florman, HM; Arnoult, C; Kazam, IG; Li, C. & O'toole, CM. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*. 59:12–26.

Galantino-homer, HL; Visconti, PE. & Kopf, GS. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3959-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod*. 56:707– 719.

Garbers, DL; Lust, WD; First, NL; Lardy, HA. 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10:1825-1831

González-Figueroa, H. 1988: Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epidídimo. Tesis Doctoral UNMSM 141 pp.

González-Figueroa, H; Yañez, D; Brescia, G; Pacheco, F. & Stuchi, M. 1993. Manejo reproductivo integral en caprinos: supervivencia del espermatozoide epididimario en condiciones hipotérmicas. Tradición 1: 83-86.

González- Figueroa, H; Longa, J. Jurado, E. & González - Molino, HM. 1999. Preservación hipotérmica de epidídimos de mamíferos. Scientia 1:171-185.

González- Figueroa, H. & Valdivia, M. 1992. Modificaciones de la matriz acrosomal del espermatozoide de cobayo, en condiciones hipotérmicas. Res.V Cong.Iberoamer. Biol.Cel. pp. 114.

González- Figueroa, H. & González – Molino, HM. 2001. Capacidad fértil del espermatozoide de mamífero. Scientia 3:99-111.

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

Harrison, RA; Ashworth, PJ. & Miller, NG. 1996 Bicarbonate/CO₂, 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.

Jha, KN; Kameshwari, DB; Shivaji S. 2003. Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. Cell Mol. Biol 49:329–340.

Jeyendra, RS; Vandeerven, HH. & Perez Pelaez, M. 1984 Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and the relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility 70: 219 – 228

Langlais, J. & Roberts, KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* 12:183–224.

Leclerc, P; De Lamirande, E. & Gagnon, C. 1996. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*. 55:684–692.

Lin, Y. & Kan, FW. 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Biology of Reproduction* 55:1133–1146.

Longa, J. 1999: Evaluación de la calidad Espermática en *Lama pacos* “Alpaca”. Tesis de Licenciatura URP 16-36.

Maxwell, WM, & Johnson, LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction Development*. 46:408–418.

Noland, TD. 1990. Regulation of acrosomal matrix dispersion in digitonin-permeabilized guinea pig spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 42: 252-259.

Ollero, M; Bescós, O; Cebrian-Peréz, JA. & Muiño-Blanco, T. 1998. Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49: 547-555.

Parks, JE. & Graham, JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.

Pariset, CC; Feinberg, JMF; Dacheux, JL; Weisman, SJ. 1985. Changes calmodulin level and cAMP- dependent protein kinasa activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*. 74:105-112

Salamón, S. & Maxwell, WMC. 1995. Frozen storage of ram semen II.

Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science* 38:1-36

Terquen, A. & Dadoune, P. 1983. Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: Evaluation of nuclear maturation. In : *The sperm cell*. André J, ed. The Hague, Martinus, Nyhoff Publishers. 249 – 252.

Visconti, PE; Bailey, JL; Moore, GD; Pan, D; Olds-Clarke, P. & Kopf, GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa, I: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129–1137.

Visconti, PE; Moore, GD; Bailey, JL; Leclerc, P; Connors, SA; Pan, D; Olds-Clarke, P. & Kopf, GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa, II: protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121:1139–1150.

Vredenburg - Wilberg, WL. & Parrish, JJ. 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction Development*. 40:490– 502.

Watson, PF. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction Domestic Animal*. 31:135-140.

Watson, PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-492.

Wysocki, P; Koncicka, K. & Strzezek, J. 2009. Is the phosphorylation status of tyrosine proteins a marker for the cryo-capacitation of boar spermatozoa. *Bull Vet Inst Pulawy* 53: 229-232.

VIII. ANEXOS

TABLA N° 01:

TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DEL ESPERMATOZOIDE EN CAPUT

0 horas	48 horas	96 horas	120 horas	168 horas	216 horas
91 %	90 %	78 %	70 %	60 %	50 %
90 %	87 %	75 %	68 %	59 %	51 %
95 %	89 %	76 %	69 %	58 %	52 %
92 %	90 %	72 %	68 %	58 %	50 %

TABLA N° 02:

TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DEL ESPERMATOZOIDE EN CAUDA

0 HORAS	48 HORAS	96 HORAS	120 HORAS	168 HORAS	216 HORAS
90 %	86 %	72 %	62 %	60 %	49 %
91 %	87 %	69 %	60 %	58 %	47 %
92 %	84 %	71 %	63 %	59 %	46 %
90 %	83 %	70 %	61 %	57 %	48 %

TABLA N° 03
ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS
VARIABLE DEPENDIENTE: PORCENTAJE DE SOBREVIVIENTES

TIEMPO DE PRESERVACIÓN	PARTE DEL EPIDIDIMO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	N
0 HORAS	CAPUT	90,7500	,95743	4
	CAUDA	55,5000	1,29099	4
	TOTAL	73,1250	18,87127	8
48 HORAS	CAPUT	85,0000	1,82574	4
	CAUDA	59,5000	1,29099	4
	TOTAL	72,2500	13,70870	8
96 HORAS	CAPUT	70,5000	1,29099	4
	CAUDA	60,7500	,95743	4
	TOTAL	65,6250	5,31675	8
120 HORAS	CAPUT	61,5000	1,29099	4
	CAUDA	37,7500	1,70783	4
	TOTAL	49,6250	12,77204	8
168 HORAS	CAPUT	58,5000	1,29099	4
	CAUDA	19,0000	,81650	4
	TOTAL	38,7500	21,13731	8
216 HORAS	CAPUT	47,5000	1,29099	4
	CAUDA	11,2500	,95743	4
	TOTAL	29,3750	19,40499	8
TOTAL	CAPUT	68,9583	15,42578	24
	CAUDA	40,6250	20,12097	24
	TOTAL	54,7917	22,79320	48

TABLA N° 04**TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD**

ORIGEN	SUMA DE CUADRADOS TIPO III	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIGNIFICACIÓN ESTADISTICA VALOR P
Partes del Epididimo	143,521	1	143,521	64,787	0,000
Tiempo de Cultivo	10721,938	5	2144,388	967,999	0,000
Partes del epididimo/tiempo	63,104	5	12,621	5,697	0,000
Error	79,750	36	2,215	-----	0,001
Total	11008,313	47			

*R Cuadrado =0,998 (R cuadrado corregida = 0,998)

TABLA N° 05**REACI3N HIPOSM3TICA DEL ESPERMATOZOIDE DEL CAPUT**

0HORAS	48 HORAS	96 HORAS	120 HORAS	168 HORAS	216 HORAS
55 %	59 %	62 %	40 %	19 %	11 %
57 %	60 %	61 %	38 %	20 %	12 %
56 %	61 %	60 %	37 %	18 %	10 %
54 %	58 %	60 %	36 %	19 %	12 %

TABLA N° 06
RHE DEL ESPERMATOZOIDE CAUDA

0HORAS	48 HORAS	96 HORAS	120 HORAS	168 HORAS	216 HORAS
93 %	89 %	78 %	69 %	72 %	75 %
92 %	89 %	77 %	68 %	71 %	74 %
92 %	90 %	76 %	68 %	70 %	73 %
91 %	88 %	75 %	67 %	68 %	75 %

TABLA N° 07
ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS
VARIABLE DEPENDIENTE:PORCENTAJE DE RHE

PARTES DEL EPIDIDIMO	HORAS	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	N
CAPUT	0 horas	55,5000	1,29099	4
	48 horas	59,5000	1,29099	4
	96 horas	60,7500	,95743	4
	120 horas	37,7500	1,70783	4
	168 horas	19,0000	,81650	4
	216 horas	11,2500	,95743	4
	Total	40,6250	20,12097	24
CAUDA	0 horas	92,0000	,81650	4
	48 horas	89,0000	,81650	4
	96 horas	76,5000	1,29099	4
	120 horas	68,0000	,81650	4
	168 horas	70,2500	1,70783	4
	216 horas	74,2500	,95743	4
	Total	78,3333	9,30949	24
TOTAL	0 horas	73,7500	19,53568	8
	48 horas	74,2500	15,80009	8
	96 horas	68,6250	8,48423	8
	120 horas	52,8750	16,21672	8
	168 horas	44,6250	27,42229	8
	216 horas	42,7500	33,68658	8
	Total	59,4792	24,56774	48

TABLA N° 08**TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE RHE**

ORIGEN	SUMA DE CUADRADOS TIPO III	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA VALOR P
PARTES DEL EPIDIDIMO	17063,021	1	17063,021	12600,385	0,000
TIEMPO DE CULTIVO	8396,854	5	1679,371	1240,151	0,000
PARTES DEL EPIDIDIMO/TIEMPO	2859,354	5	571,871	422,305	0,000
ERROR	48,750	36	1,354	-----	-----
TOTAL	198181,000	48			

a. R Cuadrado =0,998 (R cuadrado corregida = 0,998)

TABLA N° 09
CROMAT DEL ESPERMATOZOIDE CAPUT

0HORAS	48 HORAS	96 HORAS	120 HORAS	168 HORAS	216 HORAS
50 %	56 %	60 %	41 %	31 %	20 %
51 %	55 %	61 %	42 %	29 %	21 %
52 %	54 %	59 %	40 %	30 %	19 %
51 %	55 %	60 %	41 %	31 %	20 %

TABLA N° 10
CROMAT DEL ESPERMATOZOIDE CAUDA

0HORAS	48 HORAS	96 HORAS	120 HORAS	168 HORAS	216 HORAS
84 %	81 %	75 %	68 %	69 %	70 %
83 %	80 %	76 %	67 %	68 %	69 %
85 %	81 %	74 %	68 %	67 %	70 %
82 %	80 %	75 %	66 %	67 %	69 %

TABLA N° 11
ESTADISTICO DESCRIPTIVO
VARIABLE DEPENDIENTE : PORCENTAJE DE CROMAT

parte del cuerpo	tiempo expuesto	Media	Desviación típica	N
caput	0 horas	51,0000	,81650	4
	48 horas	55,0000	,81650	4
	96 horas	60,0000	,81650	4
	120 horas	41,0000	,81650	4
	168 horas	30,2500	,95743	4
	216 horas	20,0000	,81650	4
	Total	42,8750	14,42013	24
cauda	0 horas	83,5000	1,29099	4
	48 horas	80,5000	,57735	4
	96 horas	75,0000	,81650	4
	120 horas	67,2500	,95743	4
	168 horas	67,7500	,95743	4
	216 horas	69,5000	,57735	4
	Total	73,9167	6,48689	24
Total	0 horas	67,2500	17,40074	8
	48 horas	67,7500	13,64604	8
	96 horas	67,5000	8,05339	8
	120 horas	54,1250	14,05538	8
	168 horas	49,0000	20,06418	8
	216 horas	44,7500	26,46696	8
	Total	58,3958	19,19302	48

TABLA N° 12

TABLA ANOVA BIFACTORIAL PARA EL PORCENTAJE DE CROMAT

ORIGEN	SUMA DE CUADRADOS TIPO III	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIGNIFICACIÓN ESTADISTICA VALOR P
PARTES DEL EPIDIDIMO	11563,021	1	11563,021	15275,917	0,000
TIEMPO DE CULTIVO	4332,104	5	866,421	1144,629	0,000
PARTES DEL EPIDIDIMO/TIEMPO	1391,104	5	278,221	367,558	0,000
ERROR	27,250	36	0,757	-----	-----
TOTAL	17313,479	47			

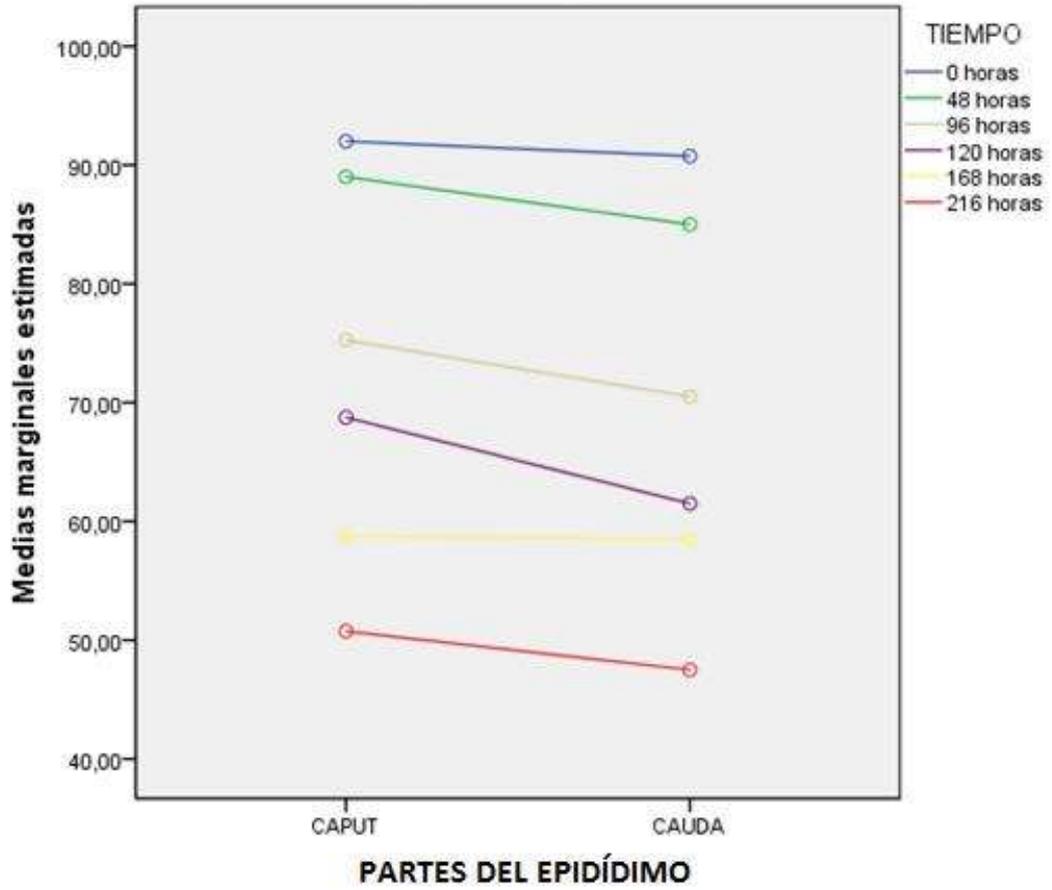
a. R Cuadrado =0,998 (R cuadrado corregida = 0,998)

TABLA N° 13
COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO SAN MARCOS

COMPONENTES	mM
NaCl	113.69
KCl	5.34
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.76
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1.03
Na H ₂ PO ₄	0.3
NaHCO ₃	11.89
Piruvato - Na	22.3
d - Glucosa	5.56

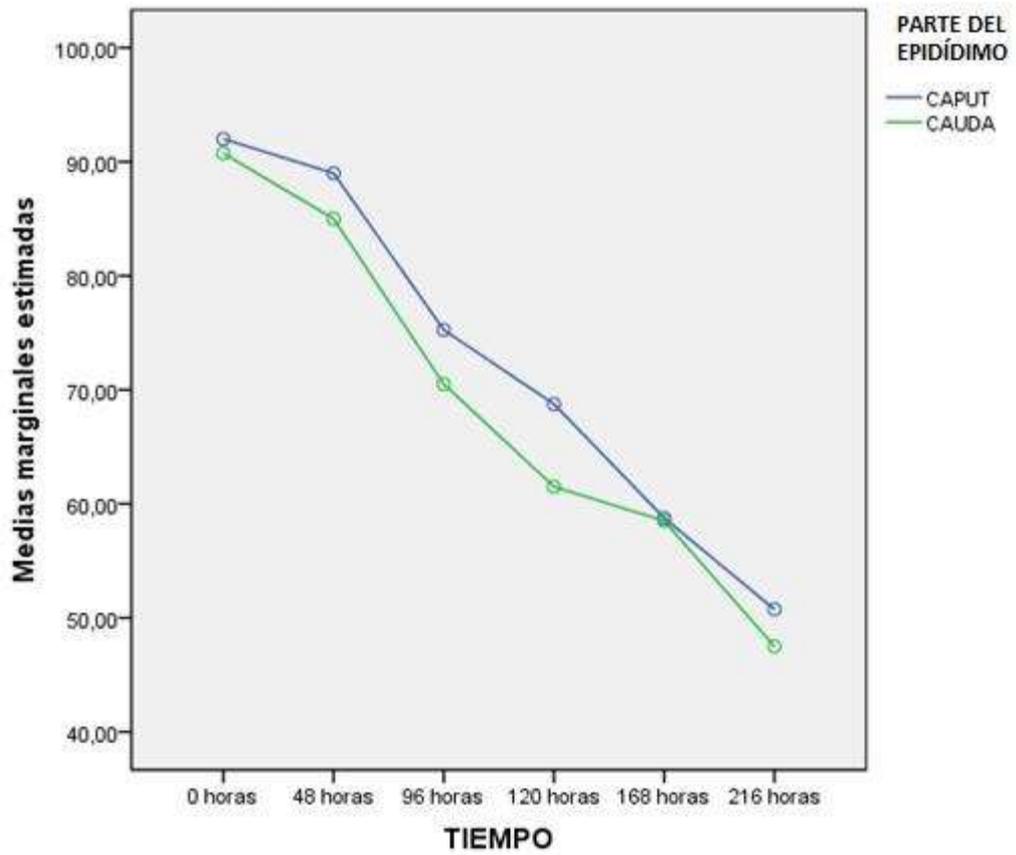
CUADRO N° 01

MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE MOTILIDAD



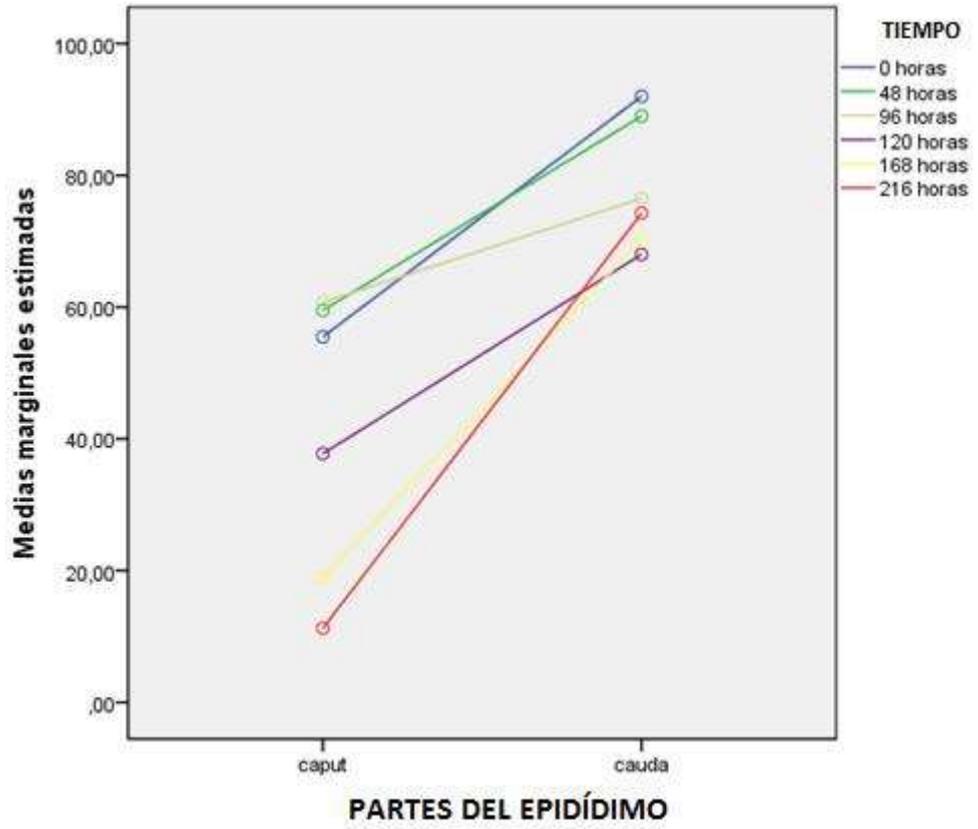
CUADRO N° 02

MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE MOTILIDAD



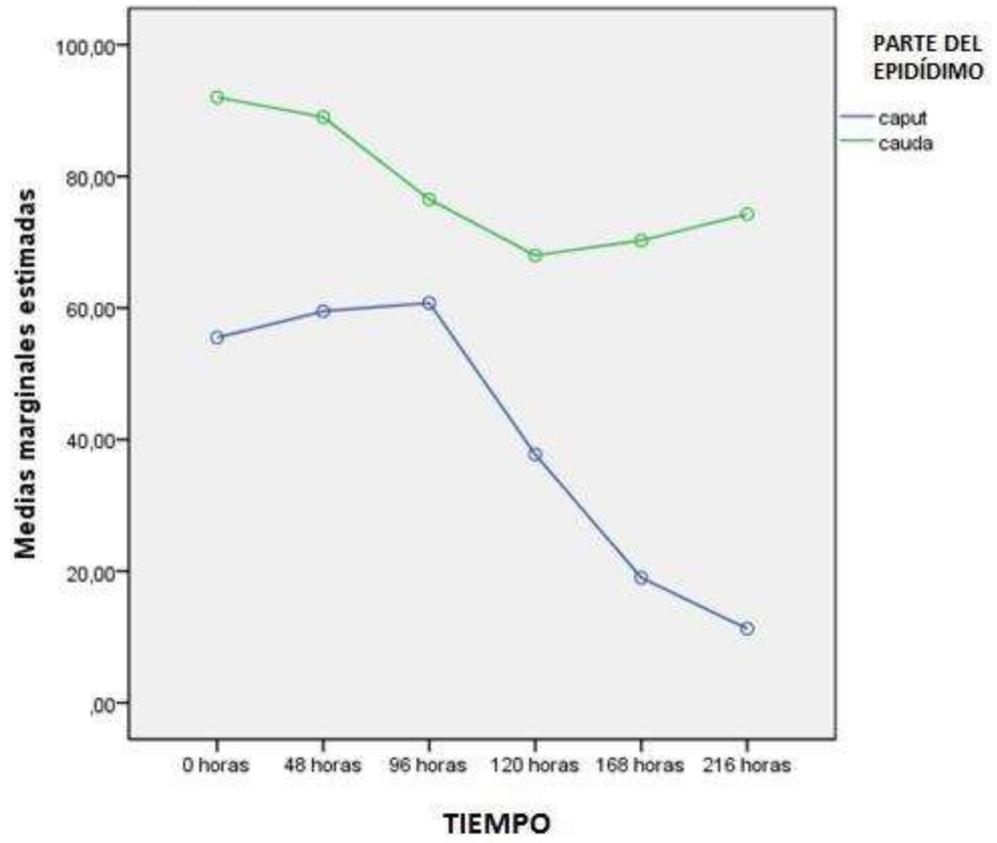
CUADRO N° 03

MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE RHE



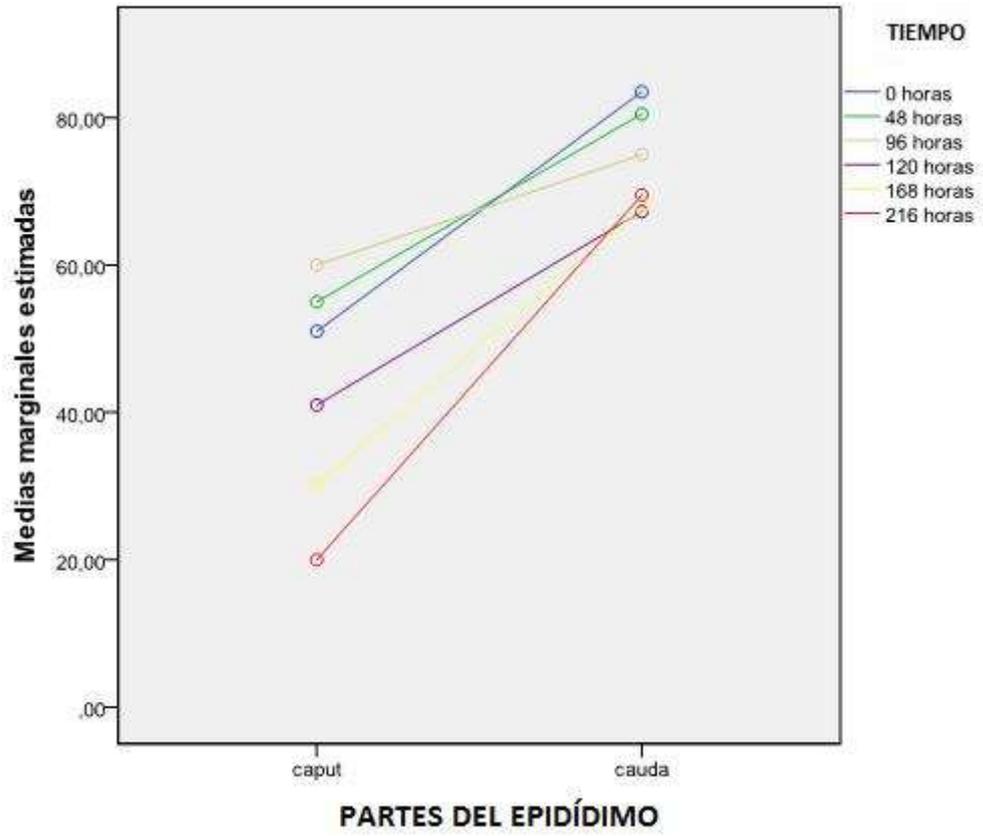
CUADRO N° 04

MEDIDAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE RHE



CUADRO N° 05

MEDIAS MARGINALES ESTIMADAS DE PORCENTAJE DE CROMAT



CUADRO N° 06

MEDIAS MARGINALES DE PORCENTAJE DE CROMAT

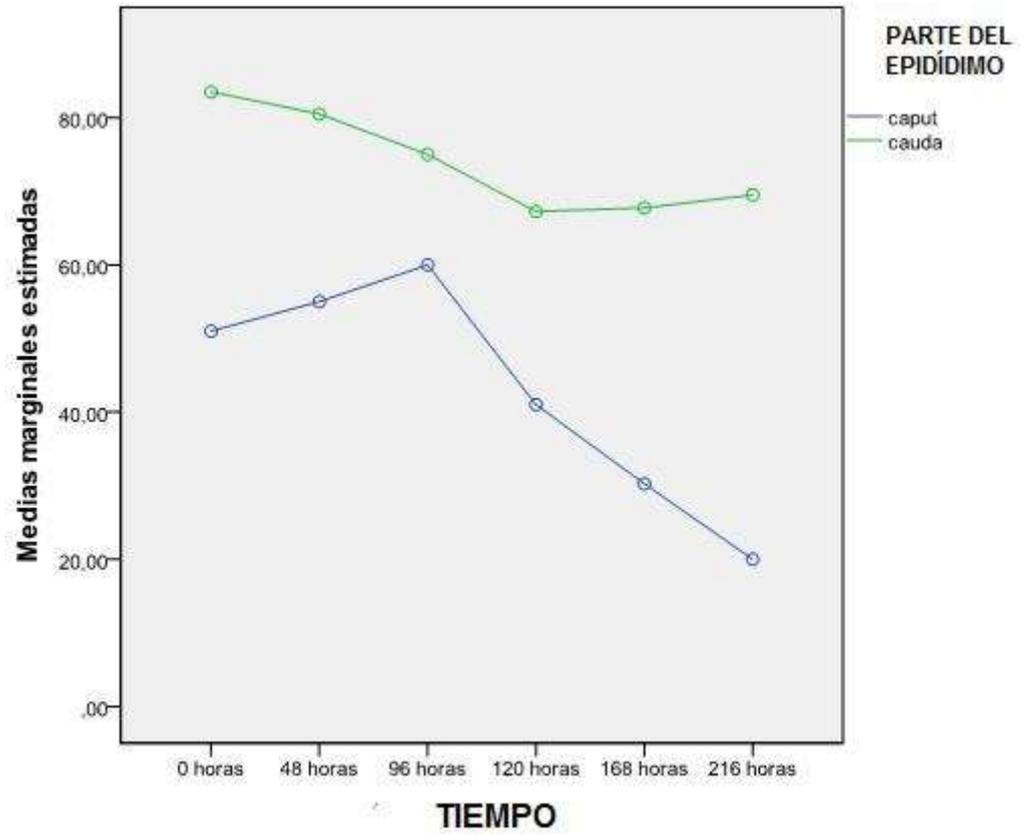
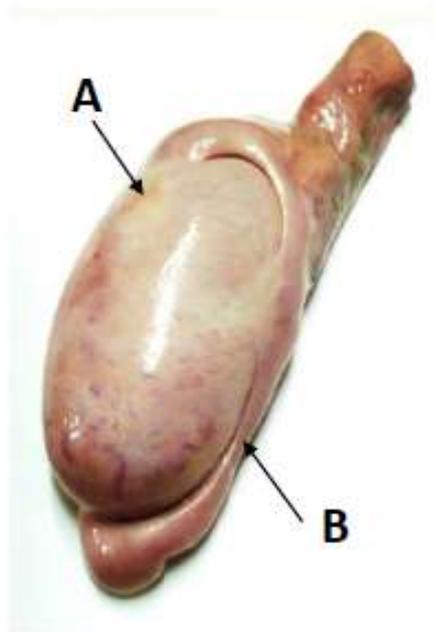


FOTO N° 01
FRONTIS DES CAMAL DE YERBATEROS,
DISTRITO DE LA VICTORIA – LIMA.



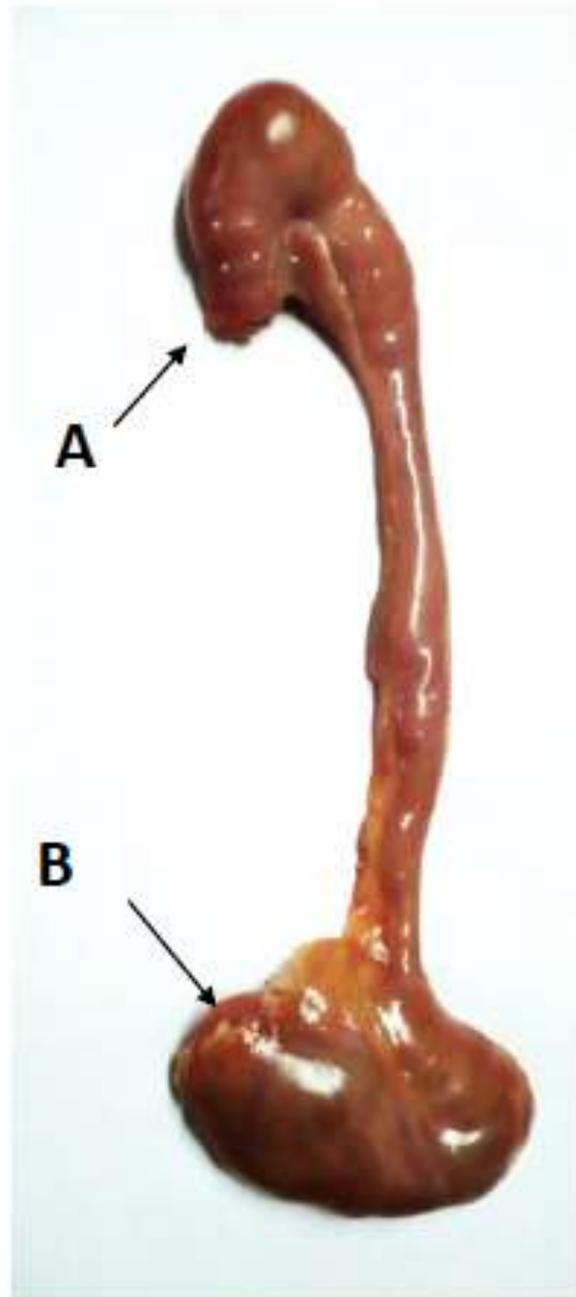
FOTO N° 2



A TESTICULO **B** EPIDIDIMO

FOTO N° 03

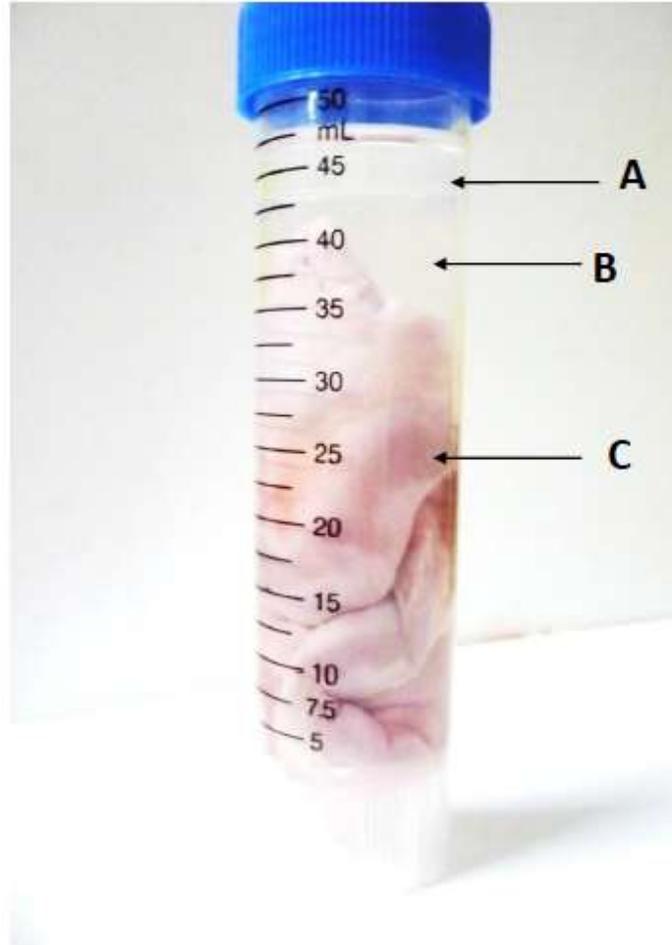
EPIDIDIMO



A CABEZA **B** CAUDA

FOTO N° 04

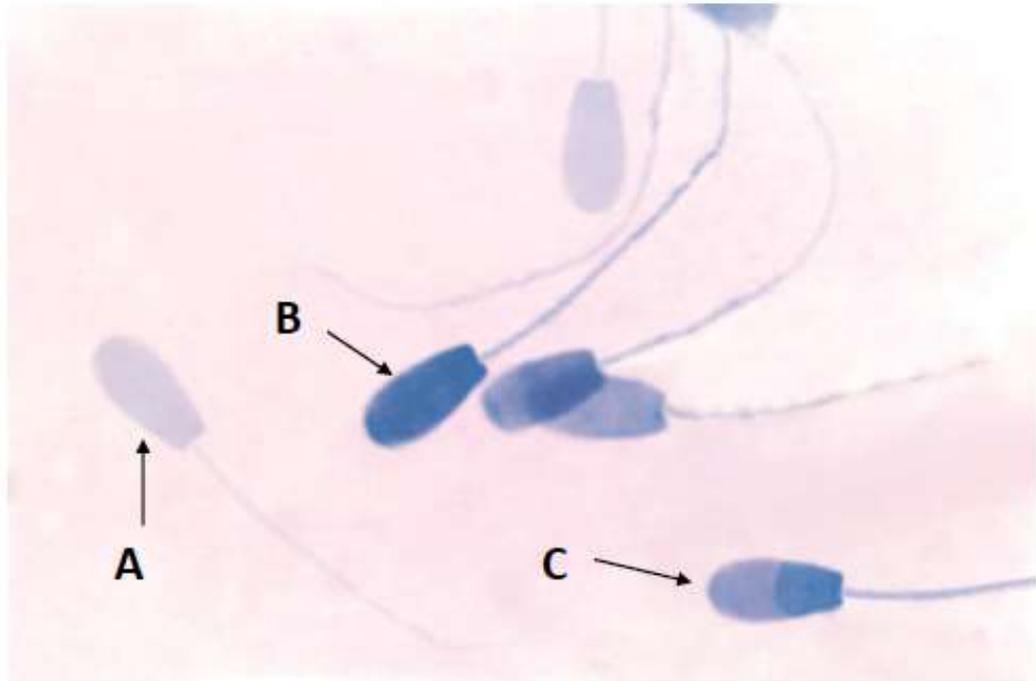
ALMACENAJE DEL EPIDIDIMO EN EL TUBO CÓNICO



A ACEITE MINERAL **B** MEDIO "SM" **C** EPIDIDIMO

FOTO N° 05

MICROFOTOGRAFIA DE ESPERMATOZOIDES COLOREADOS CON AZUL DE ANILINA, OBSERVADOS EN MICROSCOPIO ÓPTICO A 1000 X.



A.-ESPERMATOZOIDE CONDENSADO

B.- ESPERMATOZOIDE DESCONDENSADO.

C.- ESPERMATOZOIDE PARCIALMENTE DESCONDENSADO.

