



**INMUNOFLUORESCENCIA DEL RECEPTOR DE OPIOIDES  $\mu$  EN  
ESPERMAS DE EQUINO CON ALTA Y BAJA MOTILIDAD**

**POR:**

**I. Z. S. P. MARTHA PATRICIA FLORES URANGA**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

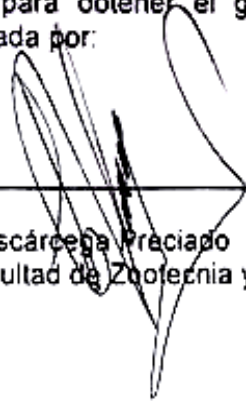
**Área Mayor: Reproducción y Genética Animal**


**Universidad Autónoma de Chihuahua**

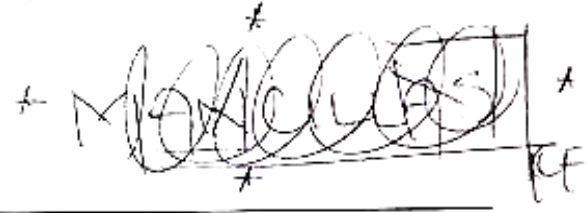
**Facultad de Zootecnia y Ecología**

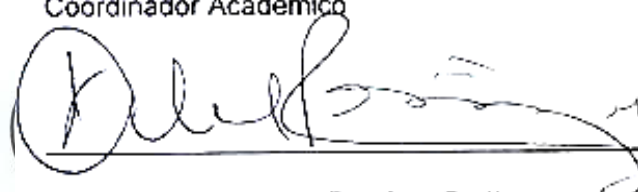
**Secretaría de Investigación y Posgrado**

Inmunofluorescencia del receptor de opioides  $\mu$  en espermias de equino con alta y baja motilidad. Tesis presentada por Martha Patricia Flores Uranga como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

  
\_\_\_\_\_  
M. A. Luis Raúl Escárcega Preciado  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

  
\_\_\_\_\_  
M. C. Antonio Humberto Chávez Silva  
Secretario de Investigación y Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores  
Coordinador Académico

  
\_\_\_\_\_  
Ph. D. José Alejandro Ramírez Godínez  
Presidente

JULIO 06 - 2016

Fecha

Comité:

Ph. D. José Alejandro Ramírez Godínez  
Dr. Everardo González Rodríguez  
Dr. Eduardo Santellano Estrada  
M. C. Alberto Flores Mariñelarena

© Derechos Reservados

**MARTHA PATRICIA FLORES  
URANGA**

DIRECCIÓN: PERIFÉRICO  
FRANCISCO R. ALMADA KM. 1,  
CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO  
C.P. 31453

JULIO 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento a Dios, por haberme permitido llegar a la culminación de mis estudios de Maestría en Genética y Reproducción Animal, así como el apoyo incondicional de mi esposo Jesús Caraveo Cabrera y mis padres Martha Patricia. Uranga Camarena y Marcos Flores Escoto.

Mi agradecimiento a las Facultades de Zootecnia y Ecología y Ciencias Químicas por el financiamiento brindado y apoyo técnico y profesional para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también al CONACYT por el apoyo económico brindado para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

De manera especial, agradezco al Ph.D. José Alejandro Ramírez Godínez por su apoyo, orientación y dedicación. A los integrantes de mi comité de tesis, por brindarme su tiempo, apoyo y asesorías Dr. Everardo González Rodríguez, Dr. Eduardo Santellano Estrada y al M. C. Alberto Flores Mariñelarena.

## **DEDICATORIA**

A todos los profesionistas amantes de los equinos, para seguir fomentando el estudio y la investigación en esta área.

A mi esposo por su incondicional apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mi familia, que con este tipo de logros les hago saber lo agradecida que estoy con ellos por todo lo que me han dado en la vida.

A Dios por permitirme crecer una vez más en el aspecto profesional.

## CURRICULUM VITAE

La autora nació el 27 de febrero de 1985 en Chihuahua, Chihuahua, México.

2004-2008

Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología.

2010-2012

Maestría en Ciencias en la Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua.

## RESUMEN

### INMUNOFLORESCENCIA DEL RECEPTOR DE OPIOIDES $\mu$ EN ESPERMAS DE EQUINO CON ALTA Y BAJA MOTILIDAD

POR:

I. Z. S. P. MARTHA PATRICIA FLORES URANGA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaria de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. José Alejandro Ramírez Godínez

Se localizó por medio de inmunofluorescencia el receptor de opioides  $\mu$  en el esperma equino comparando su ubicación en espermatozoides con alta y baja motilidad. Se trabajó con cuatro garañones de la raza Cuarto de Milla con una edad de 6-8 años con un peso de 600 kg. Se evaluó el semen y se clasificaron los eyaculados, dos de estos considerados de baja motilidad (< 50 %) y dos de alta (70 % a 90 %). Además, se determinó la concentración (C), volumen (V), tamaño testicular (TT), motilidad (M) y presencia de fluorescencia en cabeza (FC) y en cabeza y cola (FCC). El semen se lavó con Percoll y se inició con el protocolo de inmunofluorescencia estandarizado del (anticuerpo primario Rabbit anti- $\mu$  (mu) opioid receptor polyclonal) y (anticuerpo secundario goat anti-rabbit igg (h+l) fluorescein conjugated). Se utilizó la prueba exacta de Fisher a través del procedimiento FREQ de SAS. Los espermatozoides con alta motilidad presentaron fluorescencia en la cabeza con disminución en el acrosoma, en parte media del espermatozoide y desapareció en la cola. Los de

baja motilidad (< 50 %) presentaron fluorescencia en todo el espermatozoide. Además, estos últimos presentaron anormalidades y apariencia porosa. Se apreció el color resplandeciente en la cola en los de baja motilidad. Existió diferencia en la ubicación del receptor de opioides  $\mu$  entre los espermatozoides de alta y baja motilidad. Se concluye que existió diferencia en la localización del receptor de opioides  $\mu$  en los espermias obtenidos de los garañones de alta y baja motilidad.

## **ABSTRACT**

### **IMMUNO FLUORESCENCE OF OPIOID $\mu$ RECEPTOR IN EQUINE SPERMS WITH HIGH AND LOW MOTILITY**

**BY:**

**MARTHA PATRICIA FLORES URANGA**

It was located by using immunofluorescence  $\mu$  opioid receptor in the equine sperm comparing its location in high and low sperm motility. We worked with four stallions in Quarter Horse race with an age of 6-8 years with a weight of 600 kg. Semen ejaculates was assessed and two of these motility considered low (< 50 %) and two high (70 % to 90 %) were classified. Further, the concentration (C), volume (V), testicular volume (TT), motility (M) and presence of fluorescence head (FC) and head and tail (FCC) was determined. The semen is washed with Percoll and began with the protocol standardized immunofluorescence (primary antibody Rabbit anti- $\mu$  (mu) opioid receptor polyclonal) and (secondary antibody goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugated fluorescein). Fisher's exact test was used through the FREQ procedure of SAS. Sperm motility showed high fluorescence in the head with the acrosome decreased in half of the sperm tail and disappeared. The low motility (< 50 %) had sperm fluorescence throughout. Moreover, the latter showed abnormalities and porous appearance. The bright color is appreciated in line at the low motility. There was a difference in the location of the  $\mu$  opioid receptor between high and low sperm motility. In conclusion there was difference in location  $\mu$  opioid receptor in sperm collected from stallions of high and low motility.





## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Características Físicoquímicas del Semen del Garañón.....	3
Factores que Influyen Sobre la Calidad del Semen del Garañón..	5
Capacitación espermática.....	6
Daño oxidativo.....	6
Biotecnologías del Semen Equino.....	7
Péptidos opioides endógenos (POE).....	8
Control hormonal de la función reproductiva por medio	
del sistema opioide.....	9
Receptores de los POE.....	11
Receptor $\mu$ .....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Descripción del Área de Estudio.....	14
Descripción de la Población.....	14
Metodología.....	14
Selección de garañones.....	14



Recolección de muestras.....	15
Volumen de las muestras.....	15
Morfología.....	15
Estimación del porcentaje de motilidad.....	16
Concentración espermática.....	16
Traslado de las muestras.....	16
Purificación con percoll.....	16
Inmunofluorescencia.....	17
Variables a Evaluar.....	19
Análisis Estadístico.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	25
LITERATURA CITADA.....	26



## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características seminales de garañones Cuarto de Milla con alta y baja motilidad.	21



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del espermatozoide equino.....	4
2	Control reproductivo del macho por medio del sistema opioide y sus múltiples niveles.....	10
3	Espermatozoides del garañón 1 con 80 % de motilidad.....	22
4	Espermatozoides del garañón 3 con 50% de motilidad.....	23



## INTRODUCCIÓN

En el equino la estacionalidad del macho resulta menos marcada que la de la yegua, teniendo la capacidad de reproducirse a lo largo de todo el año; sin embargo, se ve afectado el volumen seminal, la concentración espermática en la fracción libre de gel, número de montas y reacción para montar a la yegua; además, la producción de células espermáticas es continua durante todo el año sin una regulación hormonal (Bustos y Torres, 2012). Los espermatozoides fuera de la estación reproductiva tienen reducida capacidad fecundante, e irónicamente en esta época surge el interés de preñar yeguas y obtener crías destinadas a ciertos deportes como las carreras de caballos, donde la más temprana fecha de nacimiento le brinda a la cría una ventaja competitiva sobre las demás. El interés de cubrir yeguas fuera de temporada; así como, la insistencia a utilizar garañones subfértiles de alto valor económico y deportivo, ha creado la incertidumbre sobre cambios o procesos que posiblemente afecten la calidad del semen del garañón. Una de las más recientes biotecnologías en el semen equino ha sido la de estudiar la posible relación del sistema opioide con la reproducción. El sistema opioide está relacionado en diversas áreas como el comportamiento y psiquiatría del apetito y estrés, no obstante recientes investigaciones comprueban su importancia dentro de la reproducción de mamíferos (Castañeda y Ardilla, 2008).

Albrizio *et al.* (2005) reportaron los efectos de los opiáceos sobre la motilidad y la morfología de los espermatozoides del equino, lo que sugiere que un análisis profundo de los componentes del sistema opioide posiblemente permitiría comprender los problemas de fertilidad por causas desconocidas del



funcionamiento espermático, ya que Aguirregoitia (2008) reportó que la concentración de opioides internos presentes en tracto reproductivo la yegua condicionará la motilidad del esperma. La presencia de estos receptores en el esperma equino y su importante relación en la reproducción, abre un abanico de oportunidades de detectar problemas de infertilidad desligados de infecciones cotidianas, estacionalidad o malformaciones del tracto reproductor con la finalidad de diseñar tratamientos que beneficien el proceso de fecundación.

Considerando la importancia de los opioides en la reproducción equina, el objetivo del presente estudio fue localizar el receptor de opioides  $\mu$  en el esperma equino por medio de inmunofluorescencia y comparar su ubicación en espermatozoides con alta y baja motilidad.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### Características Físicoquímicas del Semen del Garañón

El espermatozoide equino al igual que el de todos los mamíferos consta de cinco regiones: cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Figura 1). Los principales lípidos que contiene la membrana basal son fosfolípidos y colesterol; la relación entre estos es diferente entre especies. Por ejemplo, los conejos y los humanos poseen una relación colesterol/fosfolípidos muy alta. Los equinos tienen una relación molar colesterol/fosfolípidos de .36 (Mesa, 2010). Ortega *et al.* (2009) publicaron que el espermatozoide equino se diferencia de los demás debido a que su membrana lipídica está caracterizada por su bajo contenido de colesterol, lo que le confiere menos tolerancia a la congelación.

Los lípidos de la membrana participan en la capacitación espermática, reacción acrosomal y en los daños ocurridos en la misma. Parte del proceso de capacitación, están el flujo de colesterol desde la membrana plasmática, la disminución en la relación colesterol/fosfolípidos y por lo tanto, la desestabilización de esta. Se ha reportado que los espermatozoides equinos pierden aproximadamente el 28 % del colesterol en la membrana después de que el semen ha sido criopreservado. Esta pérdida puede estar relacionada con el proceso de capacitación prematura que sufren los espermatozoides congelados. También puede explicar el por qué las células criopreservadas no permanecen viables en el tracto reproductivo de la hembra tanto tiempo como el semen fresco y, por lo tanto se requiere inseminar lo más cercano al tiempo de la ovulación (Mesa, 2010).

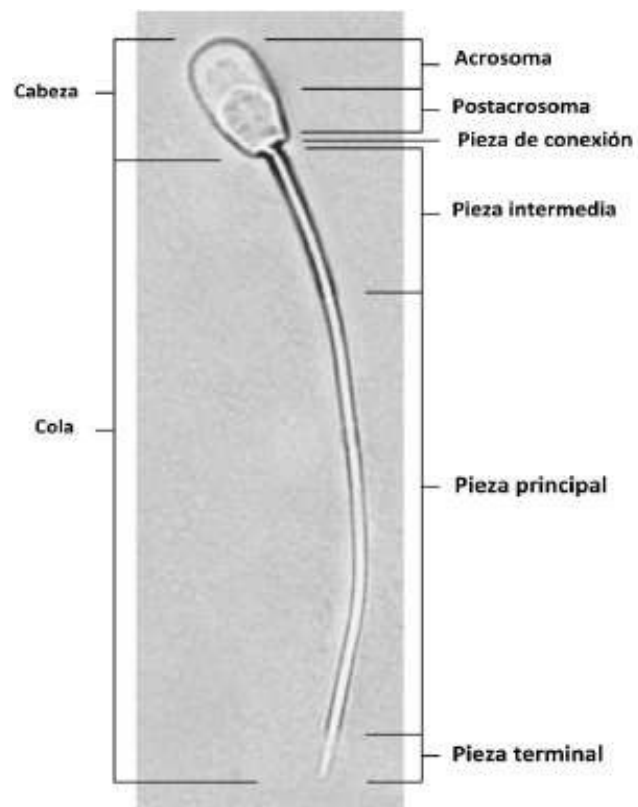


Figura 1. Estructura del espermatozoide equino.  
Ortega, 2011





## **Factores que Influyen Sobre la Calidad del Semen del Garañón**

Para poder determinar la calidad de un eyaculado equino y de alguna manera pronosticar la eficiencia del semen, Borg *et al.* (1997) señalaron las características funcionales básicas las cuales son; volumen, concentración, morfología, porcentaje de células vivas o muertas, pH y motilidad.

La motilidad espermática es una característica de suma importancia en lo que a este proyecto de investigación concierne y se manifiesta en dos tipos de movimiento; el primero (activo), se caracteriza por ser simétrico y progresivo y con muy baja amplitud de onda, el segundo (hiperactivo), es propio de los espermatozoides capacitados, es asimétrico y de mayor amplitud ya con el objetivo de penetrar la membrana del ovocito. La estructura que le provee la motilidad al espermatozoide se la da el anoxema, el cual necesita ATP (Trifosfato de Adenosina) para poder realizar el movimiento de la cola. Las mitocondrias son los orgánulos encargados de producir el ATP, el cual se difunde hasta alcanzar la totalidad de la cola. Otros autores afirman que el ATP también puede provenir del metabolismo anaeróbico de sustratos extracelulares tales como la glucosa o fructosa (Ortega, 2011).

La motilidad es considerada una característica fundamental en la evaluación del semen, debido a que es la única cualidad que nos da una indicación sobre el potencial de la fertilidad del garañón. Esta característica también ayuda a predecir la resistencia a la criopreservación del semen, la cual debe ser mayor del 30 % de células motiles para poder comercializarse. Desafortunadamente la falta de uniformidad de los técnicos en la apreciación visual de la motilidad, la variabilidad de las calibraciones de los aparatos CASA



(Computer Assisted Sperm Analyzer) y la multitud de factores que influyen en esta característica, han hecho difícil la definición de los valores estándar para determinar el movimiento normal de los espermatozoides (MacKinnon *et al.*, 2011).

**Capacitación espermática.** El proceso de la capacitación espermática implica una serie de eventos en los espermatozoides que los prepara para llevar a cabo la reacción acrosomal (Suarez, 1996). Más específicamente la célula espermática sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales que le darán la capacidad de fecundar el ovocito; además, ocurre la pérdida de proteínas que envuelven al espermatozoide y que están presentes en el plasma seminal. Estas sustancias son llamadas factores decapacitantes, que inhiben la habilidad del espermatozoide de fecundar. También se produce un cambio en la distribución de los lípidos presentes en la membrana espermática, este cambio es necesario para que se lleve a cabo el reconocimiento y la fusión con el ovocito.

El colesterol de la membrana limita su permeabilidad iónica, lo cual aporta mayor rigidez y estabilidad. La pérdida del colesterol aumenta la fluidez de la membrana haciéndola más permeable a los iones. Posteriormente los niveles de Ca (calcio),  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sodio), y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogeno) intracelular aumentan, activando la adenil ciclasa para producir AMP cíclico (Adenosin Monofosfato). El aumento de éste activa la proteína kinasa A (PKA), la cual fosforila ciertas proteínas (Ortega, 2011).

**Daño oxidativo.** El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción excesiva o la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)



y a un mecanismo antioxidante deteriorado. Las células vivas almacenadas bajo condiciones aeróbicas (por ejemplo, los espermatozoides), durante la refrigeración, congelación, descongelación e incubación, requieren oxígeno (O<sub>2</sub>) para apoyar su metabolismo normal. Un exceso de ROS, puede sin embargo, causar daño celular o apoptosis. Estos daños pueden ser mayores en espermatozoides que provienen del epidídimo que en los de eyaculado (vagina artificial o electroeyaculación), ya que los últimos contienen mecanismos antioxidantes que provienen de las glándulas sexuales accesorias, los cuales contrarrestan los efectos dañinos de las ROS. Una alta peroxidación lipídica produce: disminución de la movilidad, alteración de la capacidad fecundante del espermatozoide, inhibición de la respiración, pérdida de enzimas intracelulares y daño estructural de la membrana, particularmente en la región del acrosoma y también se le ha relacionado con la producción de daños en el ADN espermático (Domínguez, 2010).

Raut y Rao, (2007) encontraron que la inducción de estrés oxidativo neuronal por medio de una toxina llamada 3 nitropropionic acid (3-NPA), disminuyo la cantidad de receptores MOR, mientras que los DOR y KOR mantuvieron sus niveles.

### **Biotechnologías del Semen Equino**

La tecnología reproductiva que se ha desarrollado en esta especie empezó en la última década, el elevado valor económico de los productos y subproductos de la especie equina ha promovido que las biotecnologías, se hayan convertido en un área de gran interés en esta industria. Investigadores del área trabajan arduamente en combatir las debilidades del semen equino con



el propósito de mejorar los protocolos de criopreservación y determinar las posibles causas de la baja eficiencia reproductiva del garañón. Por ejemplo, disminuir el estrés oxidativo de las células espermáticas (Córdoba *et al.*, 2009), combatir la gran cantidad de flora microbiana en el semen equino disminuir la presión osmótica causada por la criopreservación o la reducción de daños ocasionados en la manipulación en el procesamiento del mismo (Ortega *et al.*, 2009). Investigaciones reportan la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar la fertilidad del garañón, eficientando una de las características básicas funcionales del semen, la motilidad. Estos autores estudian la intervención del sistema opioide con la reproducción, y más específico, su relación con el comportamiento espermático (Albrizio *et al.*, 2005).

**Péptidos opioides endógenos (POE).** Los péptidos opioides endógenos (POE) son un grupo de compuestos, producidos por el organismo, fueron llamados así debido a que su actividad es muy parecida a la de los derivados de los opioides (Cervantes, 1994).

Estos tienen funciones multifacéticas tales como, la regulación de la respiración, función cardiovascular, motilidad gastrointestinal entre otras (Albrizio *et al.*, 2005). Investigaciones comprueban su relación con la modulación de la actividad reproductiva interviniendo en la secreción hormonal, especialmente con la hormona luteinizante (LH) actuando de manera inhibitoria (Hernández *et al.*, 2006).

Los POE son localizados en diversas partes del cuerpo tales como: la medula adrenal, los islotes pancreáticos, la pituitaria, mucosa bronquial e intestinal y en los órganos reproductores (Albrizio *et al.*, 2005).



Los POE se clasifican en tres grupos encefalinas, dinorfinas y endorfinas, los cuales ejercen su actividad según su afinidad por los diferentes receptores opiáceos:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\Delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon),  $\kappa$  (kappa),  $\lambda$  (lambda),  $\mu$  (mu) y  $\Sigma$  (sigma). Actualmente ya está fundamentado que en algunas especies animales y en el hombre, existe la interacción de los POE en las funciones reproductivas (Hernández *et al.*, 2006).

**Control hormonal de la función reproductiva por medio del sistema opioide.** Las hormonas FSH (Hormona Folículo Estimulante) y LH (Hormona Luteinizante) son secretadas por la pituitaria anterior y actúan directamente sobre los testículos, estimulando a las células somáticas a contribuir a la espermatogénesis (Figura 2). La síntesis y liberación de estas hormonas es controlada por la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo. El receptor de la FSH (FSHR) se expresa únicamente en las células de Sertoli mientras que el de la LH (LHR) lo hace principalmente en las células de Leydig y ligeramente en las células espermáticas. La principal función de la FSH es la de estimular la proliferación de células de Sertoli durante la pubertad mientras que la de la LH es la de regular la síntesis de testosterona por las células de Leydig en testículos adultos. La administración de algún opiáceo como la morfina se asocia con la supresión de la LH, pero la de un antagonista como la naloxona produce un incremento en sus niveles, en humanos y en algunos animales. El abuso de opiodes causa hipogonadismo, disminuye la libido, provoca disfunción eréctil e infertilidad. Varios estudios muestran claramente que los POE regulan la función reproductiva mediante la secreción de la GnRH a nivel del sistema nervioso central (Subiran *et al.*, 2011).

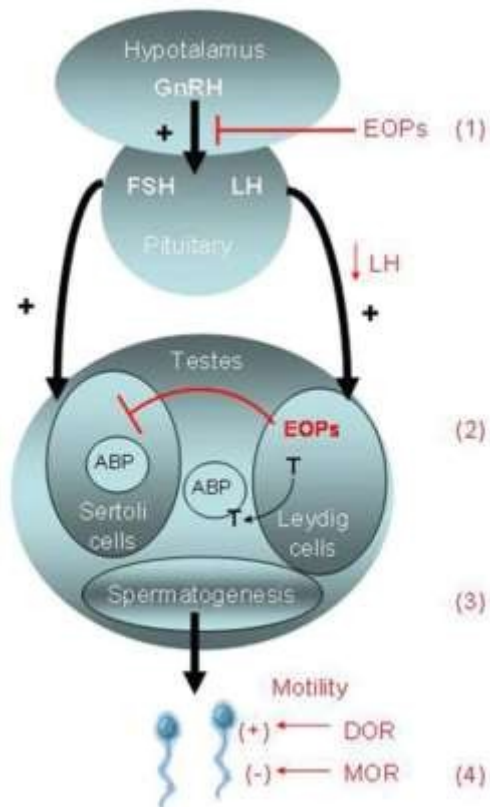


Figura 2. Control reproductivo del macho por medio del sistema opioide y sus múltiples niveles. (1)

Al nivel del Sistema Nervioso Central, los péptidos opiodes endógenos (EOP) inhiben la secreción de Hormona Reguladora de Gonadotropinas (GnRH), suprimiendo así la liberación de Hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis. (2) A nivel de los testículos, los (EOP) se sintetizan principalmente en las células de Leydig después de la estimulación de (LH), ejerciendo un efecto inhibitor sobre las células de Sertoli. En particular, (EOP) pueden regular los niveles de testosterona (T) indirectamente, inhibiendo la producción de Proteína Ligadora de Androgenos (ABP) que es estimulada por hormona del folículo estimulante (FSH) en las células de Sertoli. (3) Los genes que codifican los precursores de péptidos opioides se expresan diferencialmente en las células germinales, células somáticas y de los testículos y su transcripción no se traduce de manera eficiente en las células germinales de espermatogénesis. (4) En los espermatozoides, el sistema opioide regula la motilidad del esperma de una manera distinta por la activación de receptores distintos. Tomado de (Subiran *et al.*, 2011).



Albrizio *et al.* (2005) utilizaron otro antagonista Naltrindiole en el esperma equino pero en este caso fue para estudiar el receptor  $\Delta$ , encontrando que bajos niveles de nantrindiole aumentaban la motilidad en el esperma mientras que altos niveles causaban el efecto opuesto.

**Receptores de los POE.** Este tipo de receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, y se caracterizan por su estructura que consiste en un dominio N terminal extracelular, siete dominios de transmembranales, y una parte intracelular terminal C. Los receptores de opioides son el principal sitio de acción para los opioides endógenos. Estos actúan convirtiendo señales extracelulares en una respuesta intracelular a través de la activación de proteínas G intracelulares acopladas las cuales activan cierto número de moléculas intracelulares. Una subfamilia de los receptores de opioides se conforma por receptores  $\mu$ ,  $\Delta$  y  $\kappa$  (MOR, DOR y KOR); también conocidos como receptores MOP; KOP y DOP), los cuales se distribuyen en el cerebro y en la médula espinal. Estos receptores son activados por péptidos endógenos Met- y Leucoencefalinas, betaendorfinas y dinorfinas y por opioides exógenos como la morfina (Castañeda y Ardilla, 2008).

Los receptores que se unen a los opioides y a sus antagonistas se encuentran confinados en su mayoría al tejido nervioso, son estereoespecíficos (solo reconocen a uno de los isómeros ópticos de los opioides). Según este autor se ha demostrado que este tipo de receptores se encuentran dentro del área preóptica y la eminencia media del cerebro (Cervantes, 1994). Numerosos autores reportan también su presencia en los diferentes tipos de células testiculares; así como, el receptor  $\Delta$ ,  $\mu$  y  $\kappa$  en los testículos de la rata (Subiran *et*



*al.*, 2011). Recientemente Albrizio *et al.* 2005 demostraron la presencia del receptor  $\mu$  y  $\kappa$  en el espermatozoide del equino. Aguirregoitia (2008) por primera vez, demuestra que en el esperma humano se encuentran tres tipos de receptores de opioides (DELTA, KAPPA y MU) además de receptores de cannabinoides, mencionando que todos ellos se encuentran en la cabeza, pieza intermedia y cola de los espermatozoides.

**Receptor  $\mu$ .** Albrizio *et al.* (2005) reportaron por vez primera la presencia del receptor  $\mu$  localizado en la cola y cabeza de espermatozoide equino, desapareciendo en la zona de la reacción acrosomal revelado por medio de dos bandas de 50 a 65 kDa.

Referente a las funciones de este tipo de receptor en el caso de humanos, Aguirregoitia (2008) encontró que la activación del receptor  $\mu$  inhibe la movilidad de los espermatozoides, es decir, que los hace más lentos, mientras que para mantenerse activos los espermatozoides debe existir un mínimo de receptores  $\Delta$ . Este autor concluye algo muy importante en su trabajo de investigación mencionando que el tipo y concentración de opioides y cannabinoides internos que encuentre el espermatozoide en su camino hacia el óvulo condicionará su movilidad.

Los receptores  $\mu$  se definieron así por su afinidad con la morfina. Aun no se han establecido ligandos (cualquier sustancia que actúa sobre receptores del organismo) endógenos para este receptor, pero algunos de los POE tienen afinidad por este. Las  $\beta$ -endorfinas y encefalinas tienen una gran afinidad por el receptor  $\mu$ . Recientes investigaciones han identificado la morfina endógena en el encéfalo, por lo tanto pudiera ser un ligando natural de este sitio. Se han





desarrollado agonistas muy selectivos para este tipo de receptor, pero los antagonistas han sido de gran ayuda para definir efectos farmacológicos de este receptor. Por ejemplo la  $\beta$ -funaltrexina ( $\beta$ -FNA) bloquea irreversiblemente al receptor  $\mu$ , mientras que la naloxona antagoniza de manera selectiva a un subtipo del receptor  $\mu_1$  (Hernández *et al.*, 2006).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el rancho El Corcel, localizado en el municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua, a 28024' latitud N y 106052' longitud O, a una altura de 2063 msnm. Cuenta con clima semiárido extremoso con vientos dominantes del suroeste. La temperatura media anuales de 10 °C a 14 °C, oscilando de 30 °C a -10.6 °C como máxima y mínima. La precipitación media anual es de 500 a 600 mm (Álvarez, 2011).

Los muestreos se realizaron durante el inicio de primavera hasta mediados de verano (época de reproducción del equino), con la finalidad de que no existieran diferencias algunas por el cambio de temporada y que el semen estuviera en su máximo potencial.

### Descripción de la Población

Se analizó la información de muestras de semen provenientes de cuatro garañones equinos, con una edad de entre seis a ocho años y un peso mínimo de 600 kg. Los cuatro garañones pertenecían a la raza Cuarto de Milla, aportando cada uno dos eyaculados en diferentes fechas, con el primero solo se confirmaron los porcentajes de motilidad requeridos para el trabajo experimental y el segundo eyaculado fue con el que se trabajó la inmunofluorescencia.

### Metodología

**Selección de garañones.** Con anterioridad se tenía noción de la calidad espermática de cada uno de los 4 garañones, datos que fueron obtenidos por medio del médico veterinario encargado del criadero. La selección de



garañones se realizó bajo los siguientes criterios: De 70 a 90 % se consideró la muestra de alta motilidad mientras que valores por debajo del 50 % se considera de baja motilidad (Borg *et al.*, 1997). Fue de esta manera que se obtuvieron dos garañones con baja motilidad y dos de alta para el estudio.

**Recolección de muestras.** Se realizó la recolección del semen de los cuatro garañones, mediante una vagina artificial tipo americana en un maniquí impregnado de feromonas que figuró la yegua, el cual es montado por el garañón obteniendo un eyaculado por cada animal. El semen recién recolectado contiene gel el cual fue removido por medio del filtro que tiene el bote colector que tiene la vagina artificial.

**Volumen de la muestra.** Primero se midió el volumen de cada eyaculado por medio de un matraz graduado, evitando su agitación. Los matraces en donde se depositó el semen para medirlo, fueron previamente esterilizados y calentados a una temperatura de 37 °C.

**Morfología.** Para la determinación de la morfología espermática fue realizado un frotis por medio de una alícuota seminal de 20  $\mu$ L y la adición de una gota de Eosina – Nigrosina ambos a temperatura corporal. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente, durante 15 minutos, se realizó la evaluación con la ayuda de un microscopio óptico 600X marca Hongrui de contraste de fases utilizando un aumento de 100X, se observaron al azar 100 células contando cuántos de ellos fueron normales o anormales. Las anormalidades fueron determinadas analizando cabeza, pieza media y flagelo. Las muestras de semen de alto porcentaje de motilidad se mantuvieron por debajo del 10 % de anormalidades ya que arriba de este porcentaje se



consideran alteraciones en la fertilidad (Borg *et al.*, 1997).

**Estimación del porcentaje de motilidad.** Esta práctica se realizó a cabo mediante apreciación visual, confirmada por el médico veterinario encargado del criadero. Se realizó mezclando el semen con el diluyente Equiplus (1:1), esto debido a que tiende a aglomerarse en condiciones naturales, el cual no permite su evaluación. Se colocó una gota de este en un portaobjetos y encima de este un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas, el portaobjetos se colocó en una platina térmica en un microscopio de preferencia de contraste de bases y se realizó la estimación del porcentaje de células motiles, considerando que 70 a 90 % fue alta motilidad y baja motilidad debajo del 50 % (Borg *et al.*, 1997).

**Concentración espermática.** Para calcular la concentración espermática se utilizó el método del hemocitómetro, empleando una dilución final del semen (1:100) con solución salina formolada al 3 %. Posteriormente, se realizó el conteo individual de los espermatozoides en la cámara de Neubauer (Bright Line, Labor Optik, Shanghai, China), expresando la concentración en millones de espermatozoides por ml.

**Traslado de las muestras.** Al finalizar la estimación del porcentaje de motilidad, el semen se incorporó con el diluyente Equiplus (1:20), en un tubo graduado cubierto con papel aluminio y dentro de una hielera, procedimiento que se realizó para el traslado del semen el cual fue de 45 min.

**Purificación con percoll.** En un tubo de 15 ml se colocaron 2 ml de percoll al 90 % después se agregó con una pipeta serológica 2 ml de percoll al 45 % encima del percoll de 90 %, despacio evitando que se mezclaran (El



percoll de 90 y 45 % fue preparado de acuerdo a lo mencionado en el apéndice).

En un ángulo de 40° se vació despacio el semen fresco con diluyente de transportación en el tubo con percoll sin agitar. Se procedió a la centrifugación por 20 min a 12,000 rpm. Se removió el sobrenadante del tubo con percoll + semen y se dejó solo el pellet (despacio). Al pellet que queda en el tubo, se le agregaron 5 ml de HCDM (handling médium) previamente equilibrado y se centrifugó por 5 min más dando el último lavado, y para concluir se le agregó de nuevo 5 ml de HCDM para conservarlo.

### **Inmunofluorescencia**

El protocolo para la inmunofluorescencia fue proporcionado por la Facultad Ciencias Químicas de la UACH; sin embargo, la técnica se estandarizó haciéndole adecuaciones en las cantidades de medios y diluciones de anticuerpos, llegando a obtener el protocolo por medio del cual se logró la fluorescencia, que a continuación se describe. Al semen ya purificado y suspendido en HCDM se le realizó una vez más a cada una de las muestras de motilidad para asegurarnos que fluctuara entre los rangos establecidos anteriormente.

Se tomaron 5 µl de la muestra del semen y se colocaron en dos portaobjetos recubiertos con poly-L-lisina, un portaobjetos se consideró el control negativo al cual se le dio el mismo tratamiento que al primer portaobjetos excepto la colocación del primer anticuerpo. Los duplicados se fijaron en 4 % (w/v) de paraformaldehído y se incubaron 30 min in PBS al 1 % (w/v) BSA, al terminar se escurrieron las muestras.



Se preparó la dilución de bloqueo en un tubo graduado: (10 ml de PBS 1 % (w/v) agregándole 1 g de leche Svelty), se agitó hasta que la leche se incorporara bien al PBS, y se le agregaron 200  $\mu$ l a cada portaobjetos, se introdujeron a la incubadora por 20 min a 37 °C.

Se extrajeron las muestras de la incubadora y se lavaron 3 veces cada una con PBS 1 % (w/v), con ayuda de la pipeta. Se procedió a realizar la solución para disolver el anticuerpo primario: se agregaron 100 g de leche Svlety y 10 ml de PBS 1 % (w/v) en un tubo graduado y se mezclaron hasta incorporarse bien. Se tomaron 150  $\mu$ l de esta solución y se colocaron en un tubo ependorff junto con 1  $\mu$ l del anticuerpo primario (dilución 1:150) (anticuerpo primario Rabbit anti- $\mu$  (mu) opioid receptor polyclonal). Se le colocó a cada muestra 50  $\mu$ l asegurándose bien de que la gota cubriera bien los espermatozoides, se introdujeron las muestras por 1 h a la incubadora a 37 °C. Se retiraron las muestras de la incubadora y se lavaron 3 veces cada una con PBS 1 % (w/v).

Se realizó la preparación del anticuerpo secundario (goat anti-rabbit igg (h+l) fluorescein conjugated) (dilución 1:200), el cual se diluyó en la misma preparación del anticuerpo primario, en la cual se agregaron a un tubo ependorff 200  $\mu$ l de la solución y 1  $\mu$ l del anticuerpo secundario. Se agregaron 50  $\mu$ l a cada muestra y se incubaron por 45 min a 37 °C. Después las muestras se lavaron tres veces con PBS 1 % (w/v). Por último se le agregó a cada muestra 20  $\mu$ l de Vecta Shild, cubriendo bien los espermatozoides, se le colocó un cubre objetos y se selló por la orilla con barniz de unas. Al secarse el barniz se cubrieron con papel aluminio para trasladar las muestras al lugar en donde



se encontraba el microscopio confocal Nikon Eclipse TE 2000 invertido.

Esperando visualizar la presencia de la unión del receptor con el anticuerpo.

### **Variables a Evaluar**

Las variables analizadas fueron: porcentaje de motilidad (M), presencia de fluorescencia en el espermatozoide en cabeza (FC) y en cola (FCO), la cual se presentaría sí existe unión del receptor  $\mu$  con el anticuerpo y si existe diferencia entre calidades seminales principalmente por motilidad. Las variables como (V), (C) y (TT) solo se hicieron de rutina sin hacer comparaciones estadísticas.

### **Análisis Estadístico**

Para evaluar si existía asociación entre el nivel de motilidad de los seminales (alta y baja) y la posición del receptor de opioides  $\mu$  en los espermatozoides (cabeza y cola) se utilizó la prueba exacta de Fisher con el procedimiento FREQ de SAS (2001).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las mediciones realizadas tales como: tamaño testicular, concentración espermática en el eyaculado y volumen de los garañones Cuarto de Milla utilizados en el presente estudio se muestran en el Cuadro 1, tales valores fueron obtenidos con fines de rutina.

Los espermatozoides con alta motilidad presentaron una alta señal de fluorescencia en la cabeza con disminución en el acrosoma, en parte media y desapareció en la cola del espermatozoide (Figura 3). Los considerados de baja motilidad (< 50 %) presentaron inmunofluorescencia distribuida a través de toda la proteína del espermatozoide incluida la cola (Figura 4). Claramente se logró apreciar el color resplandeciente en la cola en los de baja motilidad. Estos resultados pueden relacionarse con lo que demostró Aguirregoitia (2008) en el caso de espermatozoides de humanos, encontrando que entre más presencia hubiera de receptores  $\mu$ , la motilidad se veía disminuida, y que para que la motilidad se mantuviera debe existir activado un número determinado de otro tipo de receptores de opioides llamados delta  $\Delta$ .

Otra característica importante en la motilidad del espermatozoide son las mitocondrias de donde proviene la energía necesaria (ATP), las cuales pueden verse afectadas según el daño oxidativo provocado durante el proceso del experimento, pero en este caso no se puede hacer una comparación debido a que los espermatozoides con alta motilidad y los de baja, fueron expuestos exactamente al mismo estrés oxidativo, tal como refrigeración y centrifugación. Respecto a este tipo de daño es importante mencionar los resultados presentados por Raut y Rao, (2007) que demuestra que la inducción de estrés





Cuadro1. Características seminales de garañones Cuarto de Milla con alta y baja motilidad

ID Animal	Edad (Años)	Tamaño		Motilidad (%)	Morfología (%) de células anormales (p) primarias y (s) secundarias	Concentración Espermas x 10 <sup>6</sup>
		Testicular (MM)	Volumen			
G1 <sup>a</sup>	6.0	102.5X62	70	80	p<10< y s<20	292 x 10 <sup>6</sup>
G2 <sup>a</sup>	5.6	97.7X59	56	75	P<10< y s<20	198 x10 <sup>6</sup>
G3 <sup>b</sup>	6.2	103X63	69	50	P<10< y s>20	179x10 <sup>6</sup>
G4 <sup>b</sup>	5.8	599.2X59	59	55	P<10< y s>20	165 x10 <sup>6</sup>

a G1 y G2 Garañones con alta motilidad (&lt;75 %)

b G3 y G4 Garañones con baja motilidad (&lt;55 %)

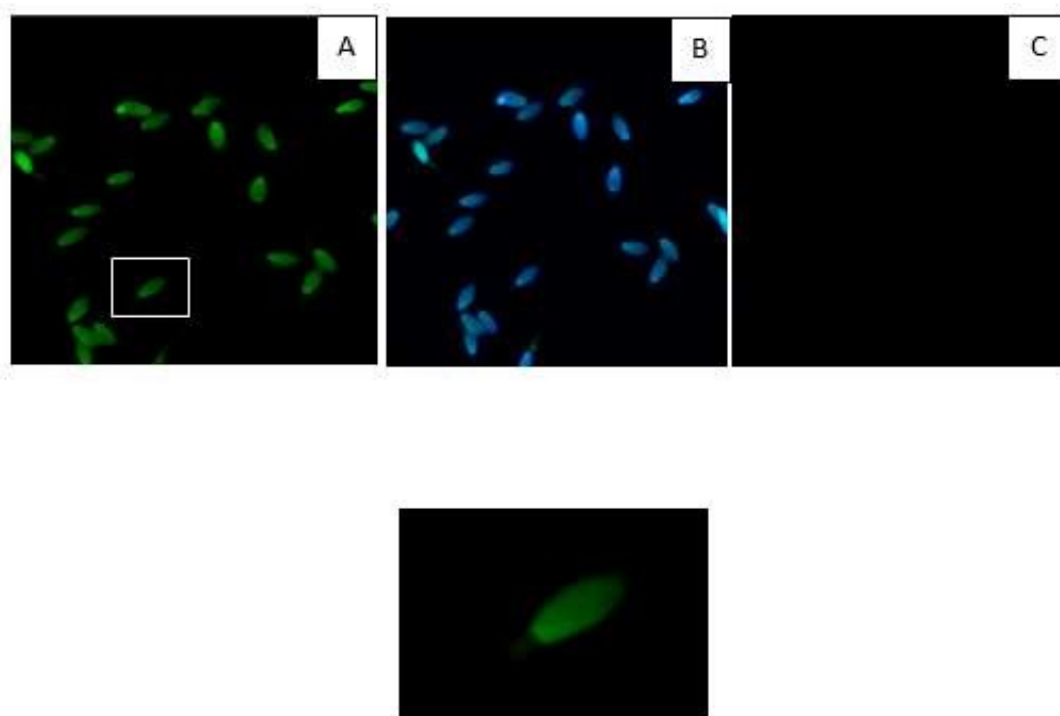


Figura 3. Espermatozoides del garañón 1 con 80 % de motilidad. Detección del receptor  $\mu$  en espermatozoides de alta motilidad por medio de inmunofluorescencia, con microscopio laser confocal. Figuras A, expresa presencia del receptor  $\mu$ . Figura B, muestra tinción con Hoechst y C control negativo. Barras de escala, 9.0 $\mu$ m.

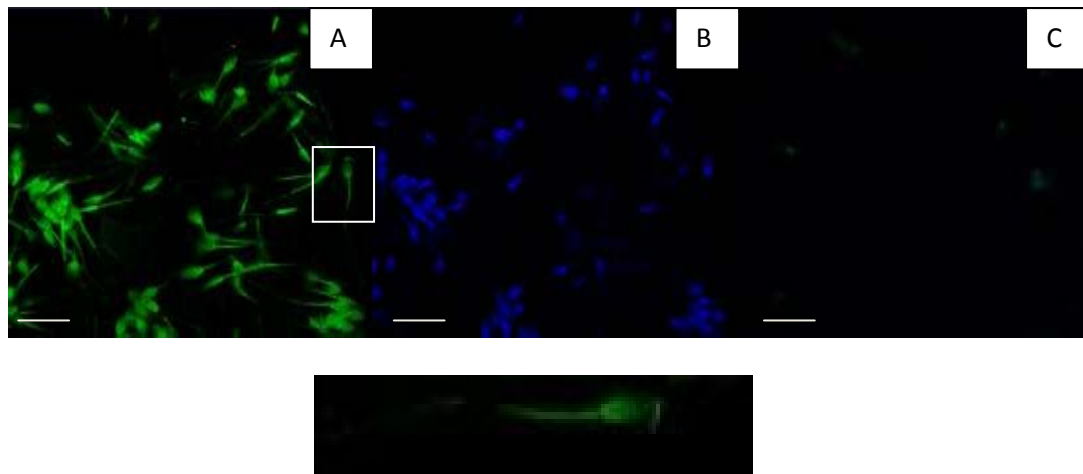


Figura 4. Espermatozoides del garañón 3 con 50% de motilidad. Detección del receptor  $\mu$  en espermatozoides de baja motilidad por medio de inmunofluorescencia, con microscopio laser confocal. Figura A, expresa presencia del receptor. Figura B, muestra tinción con Hoechst y C control negativo. Barras de escala, 9.0 $\mu$ m



oxidativo neuronal por medio de una toxina llamada 3 nitropropionic acid (3-NPA), disminuyó la cantidad de receptores MOR, mientras que los DOR y KOR mantuvieron sus niveles.



## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Existió asociación entre la motilidad de espermatozoides y la ubicación del receptor de opiodes  $\mu$  de modo que los espermatozoides con alta motilidad presentaron casi nula frecuencia de fluorescencia en cola.

El estudio de este tipo de proteínas, resultan ser de manera potencial un parteaguas para realizar investigaciones con la finalidad de encontrar nuevos marcadores que nos indiquen trastornos genéticos relacionados con infertilidad de garañones, los cuales por su desconocimiento están llevando a fomentar la persistencia de genes indeseados en las futuras generaciones equinas.



## LITERATURA CITADA

- Aguirregoitia, E. 2008. Los receptores de opioides y los receptores de cannabinoides se expresan en los espermatozoides humanos e influyen en su movilidad. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU. Universidad del País Vasco. Euskal Herriko Unibertsitate.
- Albrizio, M., A. C. Guaricci, F. Maritato, R. L. Sciorsi, G. Mari, G. Calamita, G. M. Lacandra, G. G. Aiudi, R. Minoia, M. E. Dell' Aquila y P. Minoia. 2005. Expression and subcellular localization of the  $\mu$ -opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *J. Reproduction*. 8:1470–1626.
- Álvarez, S. 2011. Perspectiva Estadística de Chihuahua. Características de estado de Chihuahua. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos> Consultado Nov. 20, 2011.
- Borg, K., B. Colenbrander, A. Fazeli, J. Parlevliet y L. Malmgren. 1997. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 48:531-536.
- Bustos, O. E. y D. L. Torres. 2012. Seasonal Reproduction in the Male. *Int. J. Morphol.* 30:1266-1279.
- Castañeda, O. M. y O. A. Ardilla. 2008. Farmacodinamia de opiáceos. Departamento de Anestesiología y Reanimación. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca Colombia.
- Cervantes, V. R. 1994. Efecto de la administración de naloxona sobre la secreción de hormona luteinizante en vacas lecheras en periodo posparto temprano. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Marin N.L. Mex.
- Córdova, I. A., G. Ruiz, C. A. Córdova, M. S. Córdova J, J. E. Guerra, B. E. Rodríguez y K. Arancibia. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Rev. Universidad Complutense de Ciencias Veterinarias*. Madrid España.
- Domínguez, A. E. 2010. Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo (*Cervus elaphus*). Tesis Doctoral. Universidad de Castilla la Mancha. Madrid España.
- Hernández, A. I., J. G. Cervantes, M. A. Ruiz, J. J. Ruiz y A. E. M. Cortés. 2006. Péptidos opioides endógenos (POE) su control sobre la reproducción. *Farmacología toxicología y terapéutica medico veterinaria*. Facultad de estudios superiores-Cuautitlán. México.



- MacKinnon, A. O., E. L. Squires, W. E. Vaala y D. D. Varner. 2011. Equine Reproduction. 2a ed. Wiley Blackwell Publishing. USA.
- Mesa, A. M. 2010. Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellin.
- Ortega, F. C., L. González, J. M. Morrell, C. Salazar, B. Macías, García, H. Rodríguez, J. A. Tapia y F. J. Peña. 2009. Lipid peroxidation assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. J. Reproduction. 138:55-63.
- Ortega, F. C. 2011. Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y daños apoptoticos. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura España.
- Raut, A. y V. Rao. 2007. Changes in opioid receptor proteins during mitochondrial impairment in differentiated SK-N-SH cells. J. Neuroscis. 18: 187–192.
- SAS. 2001. SAS/STAT® 6.03 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.
- Suarez, S. S. 1996. Hyperactivated motility in sperm, J. Androl. 17:331-335.
- Subiran, N., L. Casis y J. Irazusta. 2011. Regulation of male fertility by opioid system. J. Mol Med. 17: 846-853.