

DESCONDENSACION NUCLEAR DE LOS ESPERMATOZOIDES "IN VITRO": Un método para evaluar la capacidad fecundante del semen ovino

H. RODRIGUEZ
(D.V., M.Sc.)

Encargado del Depto. de Reproducción Animal, C.I. Vet. M.C. Rubino (M.A.P.), Casilla 6577, y Prof. Agdo. de Histología y Embriología, Facultad de Medicina (Montevideo Uruguay).

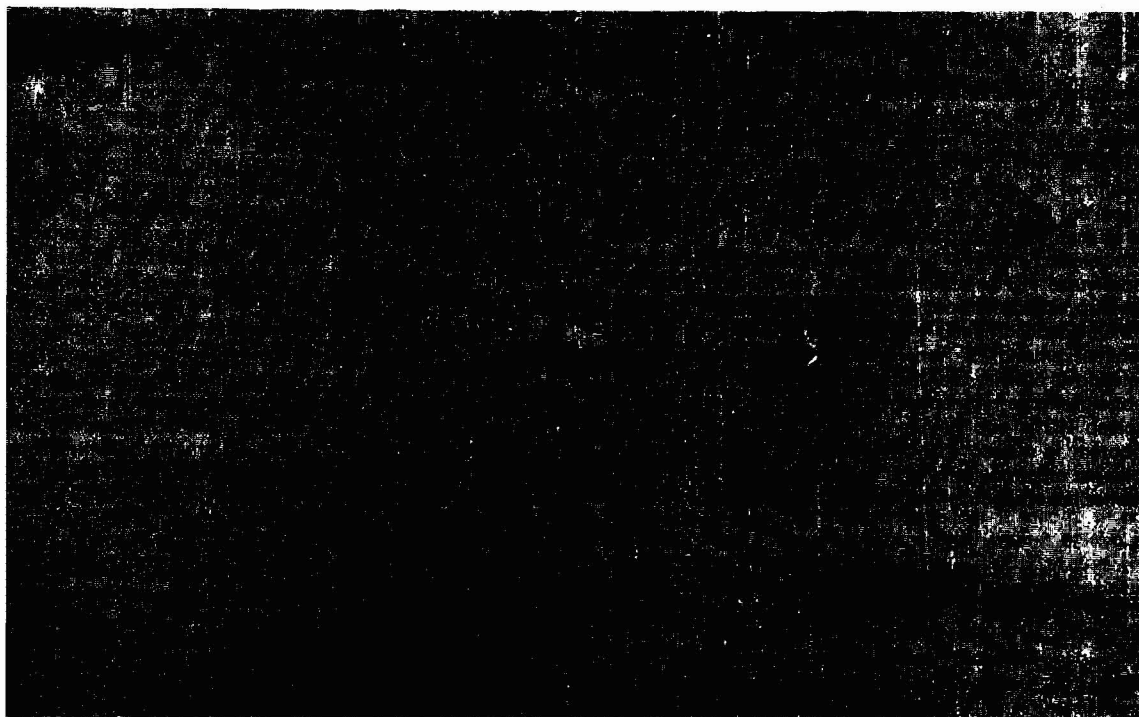
C. OHANIAN
(D.M.)

Profesor Director de Histología y Embriología, Facultad de Medicina (Montevideo, Uruguay)

A. CASTRILLEJO
(D.V.)

Ejercicio liberal (Paysandú 372, Paso de los Toros, Uruguay).

Investigación parcialmente financiada por el Proyecto N° 8/81 del Programa RLA 78/024 de PNUD/UNESCO.



INTRODUCCION

Los análisis de semen tratan de medir en última instancia la capacidad fecundante de los espermatozoides y para ello se basan en el estudio de un conjunto de parámetros considerados importantes para la fertilidad, correlacionando luego los valores hallados con la incidencia de gestación lograda por los individuos analizados. Se admite que un determinado parámetro del semen es tanto más importante cuanto más íntimamente se correlaciona la información aportada con los procesos de maduración de los espermatozoides en las vías seminales. Así, si bien es importante el número de espermatozoides presentes en el semen, más importantes aún son la morfología y la motilidad progresiva de los mismos.

Existen abundantes evidencias demostrando que a todo lo largo de las vías genitales masculinas, especialmente a nivel del epidídimo, los espermatozoides sufren cambios de estructura y composición química, los que se consideran indispensables para alcanzar una capacidad fecundante óptima (1). La adquisición de la fecundancia mediante estos cambios que genéricamente se denominan maduración espermática ha sido demostrada en diversas especies comparando entre sí los porcentajes de fecundación obtenidos por espermatozoides extraídos de distintas regiones de las vías seminales y del propio testículo (1).

Entre los cambios de composición química de los espermatozoides se ha señalado como importante la formación creciente de puentes disulfuro (SS) a medida

que avanzan en el epidídimo (2, 3). Estos puentes se producen a partir de los radicales cistina de las proteínas que durante la espermiogénesis han sustituido gradualmente a las histonas de tipo somático del núcleo espermático. Su formación en los estadios finales de la maduración espermática en el epidídimo conferiría la marcada estabilidad que caracteriza al núcleo y al flagelo de los espermatozoides maduros (2, 3, 4, 5).

Poco después de penetrar en el óvulo, el núcleo espermático sufre una descondensación progresiva y aumento de volumen para convertirse en el pronúcleo masculino. Modificaciones similares del núcleo espermático pueden obtenerse "in vitro" sometiendo los espermatozoides a la acción de tioles exógenos como el ditiotreitól (DTT), un agente que reduce específicamente los puentes SS. Bajo el efecto del DTT tiene lugar el hinchamiento de la cabeza espermática, que puede llegar a la desintegración total, y la lisis de la cola de los espermatozoides (2, 3, 4, 5, 6). Se supone que estos cambios son debidos a la reducción de los puentes SS estabilizadores y que la rapidez y el grado con el que tienen lugar son tanto mayores cuanto más inmaduros son los espermatozoides tratados. En cada sector del aparato genital masculino (testículo, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo) y en el eyaculado se puede determinar el porcentaje de los espermatozoides que sufren la descondensación nuclear (DN) y la lisis flagelar por acción del DTT. Este porcentaje será tanto mayor cuanto más inmaduros sean los espermatozoides y disminuirá cada vez más en los espermatozoides más maduros (6).

Se ha señalado una marcada variación en la resistencia de los espermatozoides normales del eyaculado de un mismo individuo y de los de distintos individuos frente a la acción descondensante del DTT (7). Esta variación debe indicar que la cantidad de puentes SS varía en los distintos espermatozoides y que en un porcentaje de ellos no resulta suficiente para conferirles resistencia al tratamiento con DTT. En condiciones constantes de tratamiento con DTT, todo aumento de este porcentaje indicaría un aumento del número de los espermatozoides provistos de cantidades insuficientes de puentes SS para soportar la acción del DTT y, por lo tanto, un aumento de los espermatozoides que, de acuerdo a este parámetro, pudieran considerarse menos maduros o inmaduros. Estos datos obtenidos en el semen pueden correlacionarse con la capacidad fecundante conocida de los individuos estudiados. En caso de hallarse una buena correlación entre la menor formación de puentes SS y la falta de fecundancia de los espermatozoides analizados puede sugerirse que aquéllos son importantes o indispensables para alcanzar una capacidad fecundante normal y que el método de determinación del porcentaje de los núcleos descondensados por el DTT constituye un medio sencillo de laboratorio para medir dicha capacidad.

Algunos autores han estudiado "in vitro" la tendencia de los espermatozoides humanos a sufrir la DN como consecuencia de la demembración de la cabeza espermática con un detergente aniónico, el dodecilsulfato de sodio (SDS) (9, 10, 11, 12, 13). Aparentemente, la DN podría ser la manifestación de una capacidad intrínseca de la cromatina nuclear para descondensarse. Ella se produce espontáneamente luego de la demembración en más de un 20% del total de espermatozoides cuando la muestra proviene de individuos con una reducción sensible de la tasa de zinc en el plasma seminal (10). La restauración de los niveles de Zn por adición de Zn exógeno o de plasma seminal normal previno la DN espontánea. La adición de quelantes del Zn a suspensiones de espermatozoides recién eyaculados incrementó drásticamente el número de espermatozoides descondensados; este efecto pudo ser prevenido mediante el tratamiento con soluciones conteniendo Zn (11, 12, 13). Se discute la posibilidad de que el Zn sea capaz de unirse reversiblemente a los tioles exógenos o endógenos que rompen los puentes SS estabilizadores, protegiéndolos de la destrucción oxidativa y, de hecho, preservando la

capacidad fecundante potencial, haciendo que la DN tenga lugar en el momento apropiado cuando se realiza la transferencia del genoma masculino.

En el presente trabajo se estudian las interacciones de los distintos segmentos de la vía seminal del carnero con el espermatozoide, tratando de cuantificarlas según el grado de DN. También se analiza la correlación entre el grado de resistencia a la DN (RDN) de los espermatozoides eyaculados y la capacidad fecundante de los carneros usados en este trabajo. En esencia, los autores intentan establecer un método cuantitativo "in vitro", que sea a la vez sencillo y sensible para medir en el laboratorio andrológico general el grado de madurez de una muestra de semen ovino. Un reporte preliminar de los resultados obtenidos fué previamente publicado (8). Se procura igualmente determinar el papel del plasma seminal y del zinc presente en el mismo como un agente inhibidor de la DN inducida "in vitro".

MATERIAL Y METODOS

(A) ANIMALES

En el período marzo-agosto de 1981 se obtuvieron mediante vagina artificial y electroeyaculación eyaculados completos repetidamente de 12 carneros de raza Corriedale, adultos (promedio 2 a 4 dientes), sanos, que participaron en programas rutinarios de inseminación artificial en el Uruguay sobre un promedio de 3,000 ovejas. Se obtuvieron, además, los porcentajes de no retorno (NRR = non return rate) en las distintas semanas de la inseminación realizada. La NRR fué utilizada como signo precoz de gestación.

Sobre un total de 6 carneros adultos (2-4 dientes) de raza Corriedale, sanos, mantenidos en régimen de pastoreo en el predio del Centro de Investigaciones Veterinarias Miguel C. Rubino (Pando) se obtuvieron eyaculados completos por vagina artificial y electroeyaculación, y muestras de testículo y epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) se obtuvieron inmediatamente después de la castración de los mismos.

(B) METODOLOGIA

Todos los eyaculados obtenidos fueron sometidos rutinariamente a examen inmediato (volumen, aspecto, color, motilidad de masa, densidad, motilidad individual y pH) y mediato en el laboratorio (concentración, anomalías morfológicas y presencia de células extrañas). Una vez extraídas las muestras para realizar el espermiograma, otras muestras fueron sometidas a distintos tratamientos de reducción de los puentes SS y de DN.

a) *Tratamiento I:* Método de Calvin y Bedford (1971), cuyo protocolo es el siguiente:

1. Mezclar una alícuota de 0.1 ml de semen en 0.4 ml de suero fisiológico. Centrifugar a 1,000-2,000 rpm durante 5-10 minutos (Microfuge 152, Beckman Lab., USA) hasta que el líquido sobrenadante quede totalmente límpido.

2. Resuspender el pellet formado en 0.1 ml de DTT 2.0 mM en borato de sodio 0.05 M, pH 9.0. Homogeneizar e incubar a la temperatura ambiente (16-20°C) durante un tiempo máximo de 45 minutos.

3. Agregar al tubo 0.1 ml de SDS al 1% en borato de sodio 0.05 M, pH 9.0, homogeneizar suavemente y dejar actuar no más de 2 minutos.

4. Fijar el material añadiendo 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5% en borato de sodio 0.05 M, pH 9.0.

5. Preparar frotis delgados y colorearlos con hematoxilina.

b) *Tratamiento II:* Sólo se omite el lavado con suero fisiológico (paso 1); el resto se realiza igual que en el Tratamiento I.

c) **Tratamiento III:** Se omite enteramente el paso 1 y se trata la muestra de semen directamente con DTT (paso 2 y siguientes).

d) **Tratamiento IV:** Se sustituye el suero fisiológico (paso 1) con una solución de EDTA 6 mM que se mezcla con el semen en volúmenes 1:1. Dejar actuar 30 minutos, centrifugar y obtener el pellet que se trata a continuación como en el Tratamiento I.

e) **Tratamiento V:** Luego del paso 1 del tratamiento I, el pellet de espermatozoides se resuspende en una solución acuosa de $ZnSO_4$ (2 mM) durante 30 minutos, centrifugar nuevamente y continuar como en el Tratamiento I.

Las muestras de testículo y de epidídimo fueron tratadas de una manera diferente teniendo en cuenta la distribución y la cantidad de los espermatozoides presentes. Trozos pequeños de testículo y de cabeza y cuerpo del epidídimo se trituraron en solución fisiológica y luego de algunos minutos se obtuvo con pipeta Pasteur una

suspensión de espermatozoides. La cola del epidídimo se seccionó y su contenido se dejó gotear en un tubo de centrifuga hasta obtener en todos los casos volúmenes de muestra de 0.1 ml. Todas las muestras de testículo y de epidídimo fueron sometidas al tratamiento I.

En todos los frotis coloreados se hicieron recuentos de un mínimo de 200 células por muestra, discriminando los recuentos según el siguiente criterio (figura 1): 0, núcleos no descondensados (estables); 1, núcleos parcialmente descondensados; 2, núcleos francamente descondensados; y 3, núcleos completamente descondensados.

(C) ANALISIS ESTADISTICO

Todos los resultados se expresaron en forma porcentual sobre los recuentos, como promedio \pm error estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante un student-t test. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.



Figura 1. Semen de ovino. Distintos grados de descondensación nuclear de los espermatozoides: 0, núcleos no descondensados; 1, núcleos parcialmente descondensados; 2, núcleos francamente descondensados; 3, núcleos

totalmente descondensados. Algunos núcleos no descondensados se han separado de sus colas. El material fué tratado según el método de Calvin y Bedford (1971) y los frotis teñidos con hematoxilina. X 450.

RESULTADOS

Los resultados están expresados en las Tablas 1 a 8.

(A) DESCONDENSACION NUCLEAR DEL SEMEN DE CARNERO "IN VITRO"

La tabla 1 muestra la correlación entre la RDN de los espermatozoides de carneros en período de actividad sexual y la NRR (como grupo de fertilidad) al primer celo postinseminación con el semen de los mismos animales. En la tabla se puede apreciar que cuando los porcentajes de RDN fueron altos (67.33%), la NRR fué también alta (61.84%). Cuando se comparan estos hallazgos con el semen de carneros que presentaban una NRR baja (36.90%), también se encontraron porcentajes de RDN bajos. Las diferencias entre ambos porcentajes fueron altamente significativas ($p < 0.001$).

Tabla 1. Correlación entre la RDN de los espermatozoides de carnero y la NRR (período de actividad reproductora)

RDN % ($p < 0.01$)	NRR % ($p < 0.001$)	
67.33 \pm 19.3	61.84 \pm 3.0	n:7
30.9 \pm 0.99	36.9 \pm 3.6	n:4

Cuando se analizó el semen de los carneros que componían los mismos grupos de fertilidad (alta y baja), pero en época de reposo sexual, se encontró una relación similar entre la RDN y las NRR de la inseminación pasada (Tabla 2). Sin embargo, se registró un aumento significativo ($p < 0.01$) en ambos porcentajes de RDN respecto al período de actividad sexual (Tabla 3).

Tabla 2. Correlación entre la RDN de los espermatozoides de carnero y la NRR (período de reposo sexual)

RDN ($p < 0.01$)	NRR $^{\circ}/o$
74.55 \pm 6.49	61.84 \pm 3.0
57.62 \pm 11.22	36.9 \pm 3.6

Tabla 3. Correlación entre la RDN en ambos períodos (actividad y reposo sexual)

	Fertilidad alta	Fertilidad baja
Período de actividad sexual	67.33 \pm 19.3	30.9 \pm 0.99
Período de reposo sexual	74.55 \pm 6.49 ($p < 0.05$)	57.62 \pm 11.22 ($p < 0.01$)

La tabla 4 muestra los porcentajes de DN del semen observados en los mismos períodos (actividad y reposo sexual), correlacionados con las tasas altas y bajas de fertilidad. Se puede observar que hubieron mayores porcentajes de DN (grados 1 a 3) siempre en las muestras con baja fertilidad y que el grado 3 se verificó especialmente en las mismas.

Tabla 4. DN por grados de hinchamiento y según NRR en ambos períodos de actividad y de reposo sexual (n:12)

NRR $^{\circ}/o$	Grados de descondensación			
	1	2	3	
61.84	1	3	3.16	Período de actividad sexual
36.90	27.5	38.8	51.8	
61.84	11.1	13.3	7.6	Período de reposo sexual
36.90	17.5	6.25	21.75	

(B) DESCONDENSACION NUCLEAR DURANTE LA MADURACION ESPERMATICA

El análisis del grado de RDN de los espermatozoides obtenidos del testículo y de distintos sectores del epidídimo mostró un incremento gradual desde el testículo a la cola del epidídimo: testículo, 30.7 \pm 8.8 $^{\circ}/o$; cabeza del epidídimo, 33.0 \pm 7.3 $^{\circ}/o$; cuerpo del epidídimo,

47.0 \pm 6.7 $^{\circ}/o$; cola del epidídimo, 52.0 \pm 8.1 $^{\circ}/o$; semen, 52.8 \pm 4.0 $^{\circ}/o$. Los valores en el semen fueron ligeramente mayores a los de la cola del epidídimo, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El hinchamiento fué mayor, inclusive en grado, en los espermatozoides testiculares, decreciendo a medida que nos aproximamos a la cola del epidídimo (Tabla 5). No hubieron diferencias en los grados de descondensación nuclear entre los espermatozoides del testículo y los de la cabeza del epidídimo, ni entre los de la cola del epidídimo y los del semen.

(C) PAPEL DEL PLASMA SEMINAL EN LA DESCONDENSACION NUCLEAR DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE CARNERO

La tabla 6 muestra los porcentajes promedios de espermatozoides estables (resistentes a la DN) en ambos períodos, de actividad y de reposo sexual, cuando el mismo semen se procesó conservando el plasma seminal o extrayéndolo parcial o totalmente (tratamientos II, III y I). Aparentemente, la descondensación fué menor cuando no se extrajo el plasma seminal (tratamiento III, $p < 0.001$). Los porcentajes fueron intermedios cuando el plasma seminal fué eliminado parcialmente (tratamiento II) y menores con el tratamiento ortodoxo (I) en el que el plasma seminal es exhaustivamente extraído, pero las diferencias entre estos dos grupos no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 5. Porcentajes promedio de DN según los grados de los espermatozoides de carnero obtenidos de testículo, epidídimo y semen.

	Grados de descondensación			Total
	1	2	3	
Testículo	23.4	18.4	25.2	67.0
Cabeza del epidídimo	35.0	10.25	22.2	67.45
Cuerpo del epidídimo	26.2	11.4	16.0	53.6
Cola del epidídimo	26.8	10.2	11.0	48.0
Semen	14.8	14.0	18.4	47.2

Tabla 6. Porcentajes promedios de espermatozoides estables según los distintos métodos de tratamiento usados (I, II y III) y en los períodos de actividad y de reposo sexual (n:12)

	Porcentajes de estabilidad		
	Tratamiento I	Tratamiento II	Tratamiento III
Grupo de alta fertilidad	78.56 \pm 4.7	79.93 \pm 5.5	88.72 \pm 4.4
Grupo de baja fertilidad	57.62 \pm 11.2	61.57 \pm 7.7	84.0 \pm 5.3

Las diferencias entre los grupos de alta y de baja fertilidad fueron significativas ($p < 0.001$ entre los dos grupos I y $p < 0.01$ entre los dos grupos II), excepto cuando no se extrajo el plasma seminal (grupos III, $p > 0.05$). Por consiguiente, parece importante destacar que la centrifugación del semen juega un papel trascendental en la faz metodológica y que el plasma seminal en alguna me-

didia interviene en contra de la DN post-tratamiento con tiales exógenos.

Para profundizar en esta área, se compararon los resultados obtenidos con el tratamiento ortodoxo (I) con los logrados luego de una breve exposición a EDTA (tratamiento IV). La tabla 7 muestra que no hubieron diferencias significativas en los porcentajes de espermato-

zoides estables post-tratamiento. Estos resultados permiten sugerir que la depleción de ciertos cationes presentes en el plasma seminal podría ser la responsable de la inhibición de la DN.

Tabla 7. Comparación de los porcentajes promedios de RDN entre grupos de tratamiento ortodoxo (I) con extracción del plasma seminal y grupos tratados con EDTA (IV), en dos lotes de animales seleccionados al azar.

	Tratamiento I	Tratamiento IV	
Lote A	81.16 ± 8.26	86.16 ± 7.8	p > 0.05
Lote B	83.5 ± 0.7	80.5 ± 13.5	p > 0.05

La comparación entre los porcentajes de espermatozoides estables de los grupos III (sin extracción del plasma seminal) y V (adición de ZnSO₄ a semen privado de plasma seminal) mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas para el grupo de animales testados (tabla 8). De hecho, los valores hallados son prácticamente idénticos, a la vez que constituyen los más altos porcentajes de RDN (100^o/o).

Estos datos parecen verificar una inhibición completa de la DN por parte del plasma seminal de carnero. Esta inhibición es imitada por el cation Zn presente en el plasma seminal, el cual parecería ser el responsable del efecto comprobado.

Tabla 8. Porcentajes de espermatozoides estables en muestras con plasma seminal (tratamiento III) y en muestras adicionadas de ZnSO₄ luego de extraído el plasma seminal (tratamiento V) (n:5)

	Tratamiento III	Tratamiento V
Lote A	99.8 ± 0.13	100 ± 0.0
Lote B	100 ± 0.0	100 ± 0.0

DISCUSION

Durante la espermiogénesis, el DNA es empaquetado por histonas espermáticas ricas en cisteína. En diversas especies de mamíferos, los grupos SH se unen formando puentes SS durante la maduración espermática en el epidídimo (1). Nuestros resultados confirman los de Beil y Graves (6) en el carnero respecto a que la maduración espermática detectada por la formación de puentes SS comienza en el testículo y continúa a todo lo largo del epidídimo. Los porcentajes de DN en condiciones controladas "in vitro" fueron decreciendo desde el testículo en sentido distal. El mayor grado de DN se verificó en los espermatozoides testiculares, debido aparentemente al contenido menor de puentes SS. A medida que los espermatozoides maduran a lo largo del epidídimo, la respuesta al tratamiento con DTT y SDS decreció en todos los casos. De todos los sectores estudiados, la cola del epidídimo y el semen mostraron los menores porcentajes de DN. En consecuencia, la maduración espermática, al menos cuando se basa en la prevalencia de puentes SS, es completa a nivel de la cola del epidídimo. Calvin y Bedford (1, 3, 4) han registrado resultados similares en las tendencias de maduración espermática.

Los porcentajes de DN se correlacionaron de manera clara y significativa con los de NRR tomados como signo precoz de gestación, y los porcentajes máximos y mínimos de RDN estuvieron de acuerdo con una fertilidad alta y baja predecibles. Así, cuanto más alto fué el porcentaje de estabilidad nuclear post-tratamiento con

DTT y SDS a tiempo fijo (60^o/o), tanto más alta fué la tasa de gestación (60^o/o), y lo inverso también ocurrió.

Aparentemente, la menor madurez espermática, revelada por una mayor DN, implica cambios imperceptibles en la estructura de la cromatina nuclear que podrían estar relacionados con una fertilidad disminuída (14). No parece, pues, demasiado aventurado adelantar que el presente método (tratamiento I u ortodoxo de Calvin y Bedford, 1971) permite predecir con adecuado margen de seguridad la capacidad fecundante de una muestra de semen ovino, aún en aquellos casos que, como los utilizados en el presente trabajo, no muestren alteraciones patológicas morfológicamente evidentes.

Un hecho notorio fué el aumento de la estabilidad de los núcleos espermáticos cuando el semen procedía de animales en reposo sexual y ello tanto en los grupos de fertilidad alta como en los de fertilidad baja. Estos hallazgos son semejantes a los de Bustos y Pérez Sampallo (15) en el caballo, Beil y Graves (6) en el toro, y Calvin y Bedford (3) en el conejo. Esto podría significar que algunos puentes SS no son reductibles en época de reposo sexual, habiendo un alto grado de empaquetamiento de las proteínas no histónicas asociadas al DNA, lo que también fué considerado como una hipermaduración espermática. Aparentemente es debido a la oxidación de tioles no ligados, resultando en la formación de una cantidad excesiva de puentes SS (15). Tal hipermaduración determinó una tasa menor de gestación cuando se inseminó este tipo de semen (15). Se supone que la capacidad fecundante del espermatozoide en época de reposo reproductor está disminuída, que su capacitación probablemente está dificultada y que en caso de llevar a la fecundación el producto no sea viable, como fuera confirmado en bovino y conejo (16, 17). El aumento de la interacción DNA proteínas en estos espermatozoides hipermaduros dificultaría su descondensación y subsiguientemente la transcripción normal del genoma, conduciendo así a la muerte embrionaria.

Hemos observado la mayor RDN en las muestras que no eran lavadas y centrifugadas para eliminar el plasma seminal. Esta modificación metodológica estuvo motivada, en principio, por la intención de adecuar la técnica a las condiciones de campo, eliminando el paso de la centrifugación. Lo significativo de los altos porcentajes de estabilidad nuclear fué atribuído ya inicialmente a un papel protector de algún factor presente en el plasma seminal, teniendo en cuenta que todos los animales examinados eran sanos en los parámetros estudiados (bajo porcentaje de anomalías, ausencia de células inflamatorias, etc.). Kvist y Eliasson (10) y Kvist (9) obtuvieron resultados similares en el semen humano y mostraron que el cation Zn aparecía como el responsable directo de la inhibición de la DN. Cuando el Zn no estaba presente en las concentraciones óptimas, la DN espontánea después de la desmembranización con SDS aumentaba significativamente respecto a las muestras de semen con valores normales de Zn en el plasma seminal. Nuestros hallazgos podrían indicar que el Zn es igualmente responsable en el carnero de la inhibición de la DN, incluso de la producida por los tioles exógenos (DTT) usados en combinación con el SDS. Este resultado no es sorprendente teniendo en cuenta que las tasas de Zn en el plasma seminal de ambas especies son comparables. Desde el punto de vista metodológico, la principal conclusión es que el lavado del semen es esencial, ya que la presencia del plasma seminal impide la acción de los tioles exógenos, sea físicamente, sea químicamente (Zn?). Desde un punto de vista teórico, es probable que la causa de la baja fertilidad de algunos reproductores esté vinculada a las afecciones de las glándulas anexas, como la próstata, haciendo insuficiente el aporte de iones Zn allí producidos para mantener la estabilidad de los espermatozoides eyaculados.

"IN VITRO" NUCLEAR SPERM DECONDENSATION: A METHOD TO EVALUATE THE FERTILIZING ABILITY OF RAM SEMEN.

SUMMARY

In vitro nuclear sperm decondensation induced by selective reduction and cleavage of the chromatin disulphide bonds (SS) formed during the epididymal transit is generally considered a measure of the sperm maturation degree. In the present work, the degree of sperm maturation, as determined by the *in vitro* induction of the nuclear decondensation with dithiothreitol (DTT) and sodium dodecylsulphate (SDS) under controlled conditions, was correlated with the fertilizing ability showed by the ram semen tested. Sperm was obtained from testes, epididymides and complete ejaculates from healthy rams used in routine AI programs, both during active and resting sexual periods. Samples were routinely processed according to Calvin and Bedford (1971) and technical modifications were applied to demonstrate the possible role of the seminal plasma and of some of its constituents (e.g., Zn) on the inhibition of the nuclear sperm decondensation. Our results showed a gradual sperm maturation throughout epididymal transit, when considered the prevalence of SS bonds present as determined by the increased resistance to the

nuclear decondensation between the testis and the epididymal tail sperm. There was a highly significant correlation between a high resistance to the nuclear decondensation (67^o/o) when considering semen of high average fertility (61.84^o/o of non return rate (NRR) at first service). The opposite also occurred in the low fertility group (36.9^o/o NRR) with a decondensation resistance of 30.9^o/o. When semen was processed out of the breeding season, the same correlation was seen, although the percentages of decondensation resistance were significantly higher. These gametes were considered overmature and probably with a lowered fertilizing ability. Seminal plasma appeared as inhibiting the nuclear decondensation of ram semen, probably being the ion Zn the main responsible. It is concluded that the method of Calvin and Bedford (1971) of induced *in vitro* nuclear decondensation by treatment with DTT and SDS under controlled conditions, constitutes a simple and reliable method to measure the fertilizing ability of ram semen.

Key words:

**SEMEN, SHEEP
SPERMATOZOA MATURATION
ARTIFICIAL INSEMINATION**

VETERINARIA 18 (82) 97 - 102, oct. - dic. 1982

REFERENCIAS

1. BEDFORD, J. M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In Hamilton, D. W. and Greep, R.O., ed. Handbook of physiology. Baltimore, Williams and Wilkins, 1975. v. 5, p. 303-317.
2. BEDFORD, J.M., CALVIN, H., COOPER, G.W.: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J. Repr. Fert. Suppl. 18, 199-213, 1973.
3. CALVIN, H., BEDFORD, J.M.: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Repr. Fert. Suppl. 13, 65-75, 1971.
4. BEDFORD, J.M., CALVIN, H.: Changes in SS cross linked structures of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observations in submammalian species. J. Exp. Zool. 187, 181-204, 1974.
5. BEDFORD, J.M., CALVIN, H.: The occurrence and possible functional significance of SS cross-links in sperm head with particular reference to eutherian mammals. J. Exp. Zool. 188, 137-156, 1974.
6. BEIL, R.E., GRAVES, C.N.: Nuclear decondensation of mammalian spermatozoa: changes during maturation and in vitro storage. J. Exp. Zool. 202, 235-240, 1977.
7. BEDFORD, J.M., BENT, M.J., CALVIN, H.: Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. J. Repr. Fert. 33, 19-29, 1973.
8. RODRIGUEZ, H., OHANIAN, C., BUSTOS-OBREGON, E.: In vitro induced chromatin decondensation: a method to predict the fertilizing ability of ram sperm. J. Cell Biol. 91, 182a (abstract), 1981.
9. KVIST, U.: Sperm nuclear chromatin decondensation ability. Acta Physiol. Scand. Suppl. 486, 1-24, 1980.
10. KVIST, U., ELIASSON, R.: Influence of seminal plasma on the chromatin stability of ejaculated human spermatozoa. Int. J. Androl. 3, 130-142, 1980.
11. KVIST, U.: Rapid post-ejaculatory inhibitory effect of seminal plasma on sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. Acta Physiol. Scand. 109, 69-72, 1980.
12. KVIST, U.: Reversible inhibition of nuclear chromatin decondensation ability of human spermatozoa induced by prostatic fluid. Acta Physiol. Scand. 109, 73-78, 1980.
13. KVIST, U.: Importance of spermatozoal Zn as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. Acta Physiol. Scand. 109, 79-84, 1980.
14. EVENSON, D.P., DARZINKIEWICZ, Z., MELAMED, M.R.: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Sci. 210, 1131-1133, 1980.
15. BUSTOS OBREGON, E., PEREZ SAMPALLO, J. A. Clitoquímica cuantitativa del núcleo de espermatozoide de potro. In Int. Congr. Anim. Reprod. AI, 9 th., Madrid, 1980. v. 3, p. 324.
16. SALISBURY, G.W., HART, R.G.: Gamete aging and its consequences. Biol. Reprod. Suppl. 2, 1-13, 1970.
17. MILLER, O.C., BLACKSHAW, A.N.: VI Int. Congr. Anim. Reprod. AI, Paris, Vol. II, 1275, 1968.

Recibido para publicarse el 12 de abril de 1982