

# INFLUENCIA DE LA CAFEINA SOBRE LA MOTILIDAD, SUPERVIVENCIA Y ACROSOMIA ESPERMÁTICA DEL SEMEN DESCONGELADO DE MORUECO

Por J. C. Domínguez Fernández-Tejerina (1)

L. Anel Rodríguez (1)

J. C. Boixo Pérez-Holanda (1)

M. Abad Gavin (1)

## INTRODUCCION

Dentro del campo de la reproducción animal, uno de los mayores logros alcanzados en el presente siglo ha sido el rápido desarrollo de la Inseminación Artificial (IA), cuyo camino ha transcurrido por senderos realmente arduos, imprevisibles y a veces contradictorios, como señala BONADONNA<sup>4</sup>, representando una apertura verdaderamente sorprendente en términos biológicos, experimentales y aplicativos, y sobre todo, de profundo impacto en el proceso de mejora animal y, por tanto, de repercusión productiva y necesariamente económica.

No obstante, tal como destacó CORTEEL y PAQUIGNON<sup>5</sup>, en el último Congreso Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial de Illinois, el desarrollo de la IA en los óvidos se encuentra ralentizado en la actualidad, debido no solamente a las características peculiares de esta especie, tal como pudiera ser su especial constitución del aparato genital femenino, sino también, a los problemas surgidos en torno a la conservación «in vitro» del material seminal. Es evidente que en otras especies, como ha sido la bovina, la gran difusión e importancia de la IA como método reproductivo, están basadas en la posibilidad de conservación a largo plazo del material seminal mediante congelación.

La baja fertilidad que como regla general se obtiene con semen descongelado de morueco viene dando lugar, en los últimos tiempos, a numerosas especulaciones y teorías sobre las causas que determinan esta escasa fertilidad. Entre los factores admitidos por la mayoría de los autores hay que señalar la baja motilidad que a la descongelación presentan los espermatozoides de morueco, y si bien es cierto que motilidad no es sinónimo de fertilidad, aquélla es condición imprescindible para que exista ésta.

(1) Departamento de Cirugía y Reproducción

Con objeto de soslayar la disminución de la motilidad espermática que se aprecia tras la descongelación seminal de numerosas especies, y por ende la concomitante disminución de su capacidad fertilizante, se han realizado numerosas investigaciones, fruto de las cuales ha sido el empleo de los llamados «estimulantes espermáticos» entre los que cabe destacar la cafeína.

En 1971, GARBERS et al.<sup>8</sup>, incubando eyaculados de toro en presencia de cafeína (6 mM) consiguieron mantener la motilidad inicial durante 4 horas a 37°C, mientras que en las muestras control el 50 % de los espermatozoides que estaban inicialmente móviles perdían esta cualidad en el mismo período. Asimismo, constataron una inmediata estimulación de la motilidad espermática en aquellas muestras de baja motilidad inicial, no apreciable en aquellos eyaculados de motilidad inicial alta.

HAESUNGCHARERN et al.<sup>9</sup>, en 1973, investigando sobre semen humano también describen el efecto estimulante de la cafeína, al igual que de la teofilina y amionofilina. En esta misma línea se encuentran los resultados de SCHOENFELD et al.<sup>16, 17</sup>, quienes seleccionando muestras seminales humanas en dos grupos, dependiendo de si su motilidad inicial estaba comprendida entre 10–20 % o entre 30–40 %, y utilizando una dosis de cafeína 6 mM, observan cómo en ambos grupos se produce un aumento, estadísticamente significativo con respecto a los controles, tanto del porcentaje de motilidad como del grado de intensidad de la progresión lineal, así como de su longevidad.

Es interesante resaltar las esperanzas de BARKAY et al.<sup>2</sup>, tendentes a optimizar la recuperación del semen descongelado humano, especialmente en los casos de eyaculados con media o baja motilidad. Después de ensayar diversos niveles de dosificación de cafeína, añadida al semen antes de la congelación, llegan a comprobar que la dosis óptima es de 7,2 mM, toda vez que incrementa la motilidad seminal en un rango comprendido entre el 40–80 % con respecto a los controles, tras una congelación rápida en «pellets» y un período de almacenamiento de 30 días. A resultados semejantes llegan AITKEN et al.<sup>1</sup>, en 1983, sugiriendo el posible papel clínico de la cafeína en la terapia de ciertos problemas seminales y en la mejora de la metodología de la propia fertilización «in vitro», al comprobar un incremento de la penetrabilidad espermática en el moco cervical por unidad de tiempo y un significativo aumento de su capacidad fertilizante.

FRASER<sup>7</sup>, utilizando un sistema de fertilización «in vitro» en el ratón, para el cual los requerimientos temporales necesarios para la capacitación y fertilización han sido cuidadosamente estudiados, evidencia por parte de la cafeína un efecto de aceleración en la penetración de los espermatozoides en los óvulos, demostrado no solamente por el incremento de las tasas de penetración espermática «in vitro», sino también por la aceleración del subsiguiente desarrollo nuclear.

El efecto estimulante de la cafeína sobre la motilidad espermática, ampliamente estudiado en el hombre y bovinos, ha sido menos investigado en otras especies. Con respecto al semen de morueco son escasos los trabajos de investigación que han estudiado el efecto estimulante de la cafeína. DACHEUX y PAQUIGNON<sup>6</sup>, han comprobado que la cafeína es un estimulante del metabolismo y de la motilidad de los espermatozoides de morueco, siendo la respuesta entre la concentración cafeínica y el metabolismo oxidativo, dosis-dependiente, tanto en espermatozoides de morueco maduros (eyaculado), como en espermatozoides inmaduros (procedentes directamente del epidídimo). No obstante, la sensibilidad a la cafeína fue más baja para los espermatozoides procedentes de la cabeza del epidídimo que para los espermatozoides del eyaculado.

Dado que hasta el momento presente no ha sido estudiado el posible efecto estimulante de la cafeína en el semen descongelado de morueco, que consideramos interesante ante la posibilidad de poder recuperar la motilidad perdida por efecto de la congelación, hemos planteado el presente trabajo de investigación donde nos proponemos estudiar el efecto que la cafeína ejerce sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía espermática del semen descongelado de morueco, en un intento previo de comprobar las posibilidades que este inhibidor de la fosfodiesterasa pudiera tener en la optimización de los resultados de fertilidad, hasta el momento escasos, obtenidos con semen de morueco conservado mediante congelación.

## MATERIAL Y METODOS

En la realización del presente trabajo de investigación se ha utilizado semen procedente de 12 moruecos de raza Manchega, de edades comprendidas entre dos y cinco años, mantenidos en régimen de semiestabulación y sometidos a una frecuencia de recogidas de dos veces por semana, mediante vagina artificial, comprendiendo cada vez al menos dos saltos. Las recogidas seminales se efectuaron en la época comprendida entre Julio y Noviembre.

Los eyaculados que cumplían las características mínimas de calidad (volumen  $\geq 0,7$  ml, motilidad masal  $\geq +++$ , motilidad individual  $\geq 80$  %, concentración  $\geq 3 \times 10^6/\text{mm}^3$ , y formas anormales y acrosomas dañados  $\geq 25$  %) eran diluidos (1:3, 1:4) en un medio Tes-Tris-glucosa con un 6 % de yema de huevo y 3 % de glicerol. La tasa de dilución dependía de la concentración espermática inicial con objeto de vehicular en cada dosis, de 0,1 cc, un número de  $100 \times 10^6$  espermatozoides. Tras un periodo de 4-6 horas en vitrina termostática a 5°C el semen se congelaba sobre bloques de nieve carbónica en forma de pellets de 0,1 cc. A continuación, estos pellets eran introducidos en el seno de nitrógeno líquido donde eran almacenados por un periodo no inferior a 18 meses antes de su utilización en el presente trabajo.

La descongelación de los «pellets» se efectuaba sobre 1 cc de diluyente de descongelación (1:10), de composición idéntica al empleado en la congelación, el cual era previamente mantenido en baño maría a 40°C, obteniéndose un volumen final de 1,1 cc para cada dosis experimental. Antes de ser sometidas a las pruebas laboratoriales que se describen a continuación, las dosis seminales eran mantenidas en estufa durante 30 minutos a 37°C.

La cafeína, 1, 3, 7-trimethyl-2, 6-dioxipurina de fórmula química  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ , utilizada en el presente trabajo como reactivo puro fue suministrada por la casa Merck (2584 marca registrada).

### *Pruebas laboratoriales:*

Para cada uno de los moruecos y en todos y cada uno de los grupos experimentales se realizaron las siguientes pruebas laboratoriales:

Motilidad individual (M.i.): Se utiliza el método de gota plana (entre porta y cubre) y

observación al microscopio óptico, con platina calentable a 37°C. La lectura se efectúa a 400 aumentos y se expresa en porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles.

**Test de progresión vertical (TPV):** Depositada una muestra seminal de 0,3 cc en un tubo de ensayo de 5 ml de capacidad, se coloca un tubo capilar de vidrio neutro (75 mm x 1,1-1,2 mm) verticalmente y en contacto con la superficie seminal. El tubo capilar se rellena previamente con suero glucosado isosmótico taponando su extremo libre con masa plastificada. El conjunto se lleva a una estufa de temperatura constante (37°C) durante 30 minutos. Posteriormente, el capilar es observado al microscopio óptico (400x) con objeto de comprobar el punto más avanzado donde han llegado los espermatozoides, distancia que se mide con ayuda de la escala del carro de la platina. Esta distancia, expresada en milímetros/treinta minutos a 37°C representa la progresión vertical espermática.

**Índice de supervivencia:** Depositada una muestra de 0,5 de semen descongelado en un tubo de ensayo (7x0,5 cm) se coloca en una estufa a 37°C. Se realizan controles espermiocinéticos al comenzar la prueba y posteriormente cada 2 horas hasta M.i. cero. En la valoración del índice de supervivencia se calculan los siguientes parámetros:

**Valor T:** Tiempo transcurrido desde el comienzo de la prueba hasta la pérdida total del movimiento progresivo espermático.

**Valor S:** Media aritmética de la M.i. apreciada en cada una de las observaciones.

**Acrosomía:** Para el estudio de las alteraciones acrosómicas se utiliza una tinción selectiva (método de Giemsa) de acuerdo con la metodología de WATSON<sup>21</sup>. Una vez procesadas las muestras se leían al microscopio óptico, estudiándose detenidamente 100 espermatozoides, en campos escogidos al azar, y anotándose el porcentaje de espermatozoides que presentaban algún tipo de alteración en el acrosoma. Los controles acrosómicos fueron realizados concomitantemente con el índice de supervivencia, tomando las muestras cada 4 horas.

#### *Grupos experimentales:*

Para el estudio del efecto de la adición de cafeína sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía del semen descongelado de morueco, se estableció un grupo control y tres grupos experimentales de acuerdo con la dosis utilizada de cafeína, la cual era vehiculada en el diluyente de descongelación, de tal forma que la concentración final después de la redilución resultara de 2 mM para el grupo experimental I, 5 mM en el grupo II y 10 mM en el grupo III.

#### *Análisis estadístico:*

Con objeto de establecer si existen o no, diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos de los distintos grupos experimentales, con respecto a los controles y entre ellos mismos, se someten a un análisis estadístico no paramétrico de contraste de KRUSKAL-WALLIS (o H), en caso de que se rechazara la hipótesis nula y por lo tanto aceptar la alternativa de que las medias de tales poblaciones no son iguales, y con objeto de establecer claramente entre qué medias, tomadas dos a dos, existían diferencias significativas se efectuaba un contraste de WILCOXON o contraste U; todo ello siguiendo la metodología descrita por SACHS<sup>15</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En las condiciones descritas para el presente trabajo, se han obtenido los resultados cuyos valores medios, para cada grupo experimental, se recogen en el Cuadro n.º 1.

CUADRO N.º 1  
Resultados

	M.i. (%)	Valor T (h.)	Valor S (%)	Tpv (mm)	Acrosomía (%)
GRUPO CONTROL	35,8 ± 2,53	13,0 ± 1,03	14,8 ± 0,88	11,0 ± 0,59	48,8 ± 1,58
GRUPO I (2 mM)	46,2 ± 3,59 *	10,8 ± 0,87	17,4 ± 1,39	12,4 ± 0,81	51,4 ± 2,22
GRUPO II (5 mM)	34,1 ± 4,56	10,1 ± 0,87 *	13,2 ± 1,49	8,5 ± 0,40 *	63,8 ± 0,85 *
GRUPO III (10 mM)	27,5 ± 4,42 *	9,3 ± 0,67 *	13,4 ± 1,52	8,5 ± 0,57 *	68,8 ± 1,77 *

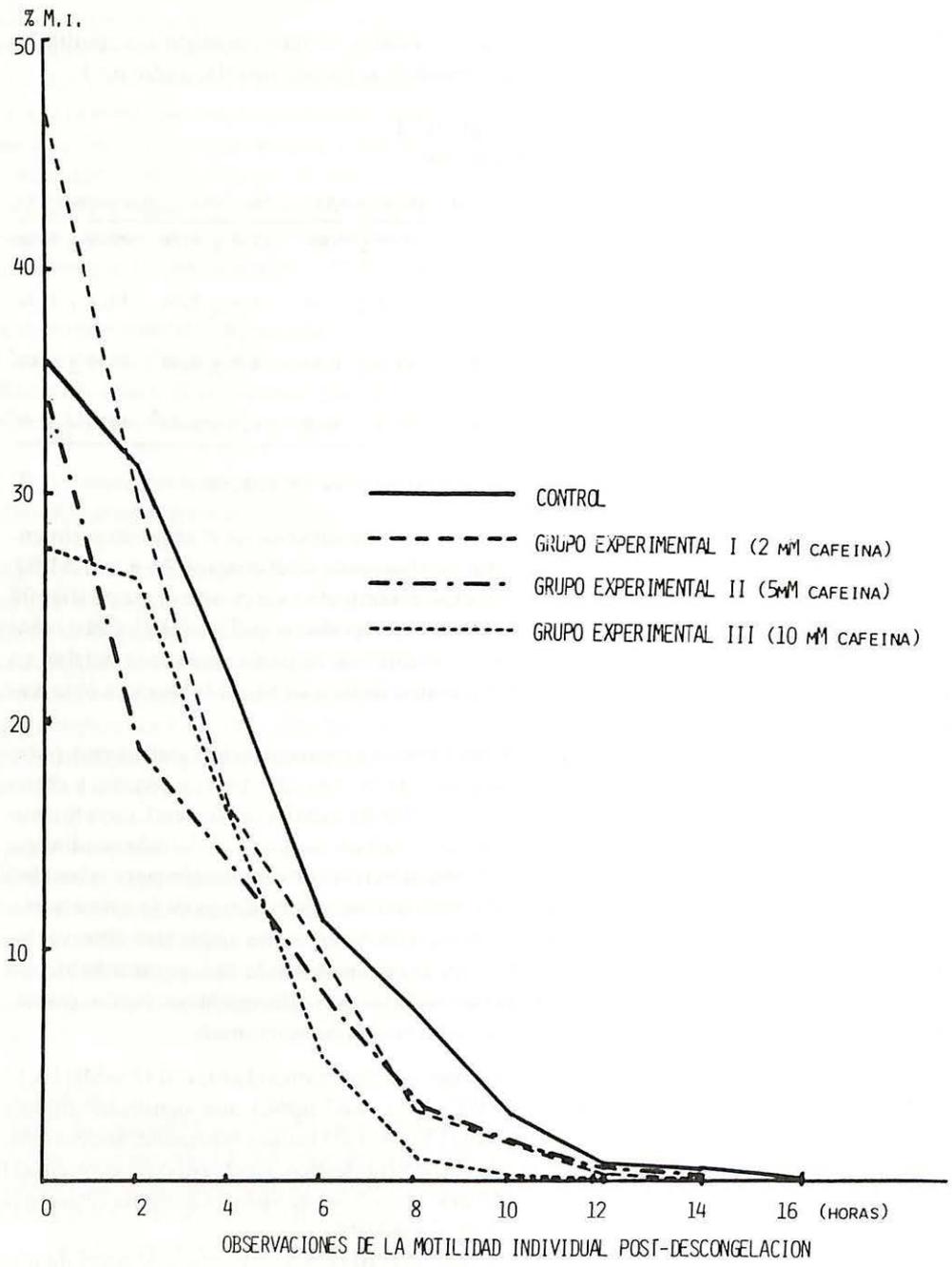
\* = Significativo con respecto al control ( $P < 0,01$ ).

La M.i en la primera observación es estadísticamente superior en el grupo experimental I (2 mM de cafeína) ( $46,25 \pm 3,59\%$ ), que la observada en el control ( $35,8 \pm 2,53\%$ ). De igual forma, la disminución que con respecto al control se aprecia en el grupo III (109 mM cafeína) ( $27,5 \pm 4,42\%$ ), es también altamente significativa ( $P < 0,01$ ). Cabe señalar que el incremento de la M.i. apreciado en el grupo I, es particularmente notable en aquellos moruecos que en el grupo control tenían más baja su M.i. a la primera observación.

El descenso de la M.i. a lo largo del tiempo tiene una representación gráfica muy parecida en todos los grupos experimentales a partir de la segunda observación, tal y como puede apreciarse en la gráfica n.º 1, llevando una forma cuasi-exponencial, cuya fórmula integral para todos los grupos experimentales, hallada según los mínimos cuadrados, responde a la ecuación  $y = 51,68 e^{-0,49t}$ , con un coeficiente de correlación para la bondad del ajuste de  $r = -0,74$ . Las diferencias estadísticamente significativas de la primera observación, ya comentadas anteriormente, no se constatan en las siguientes observaciones, lo que nos permite deducir que el efecto de la cafeína sobre la M.i. es inmediato y no perdurable a lo largo del tiempo, centrándose dicho efecto únicamente en las dos primeras horas de contacto de los espermatozoides con la cafeína adicionada.

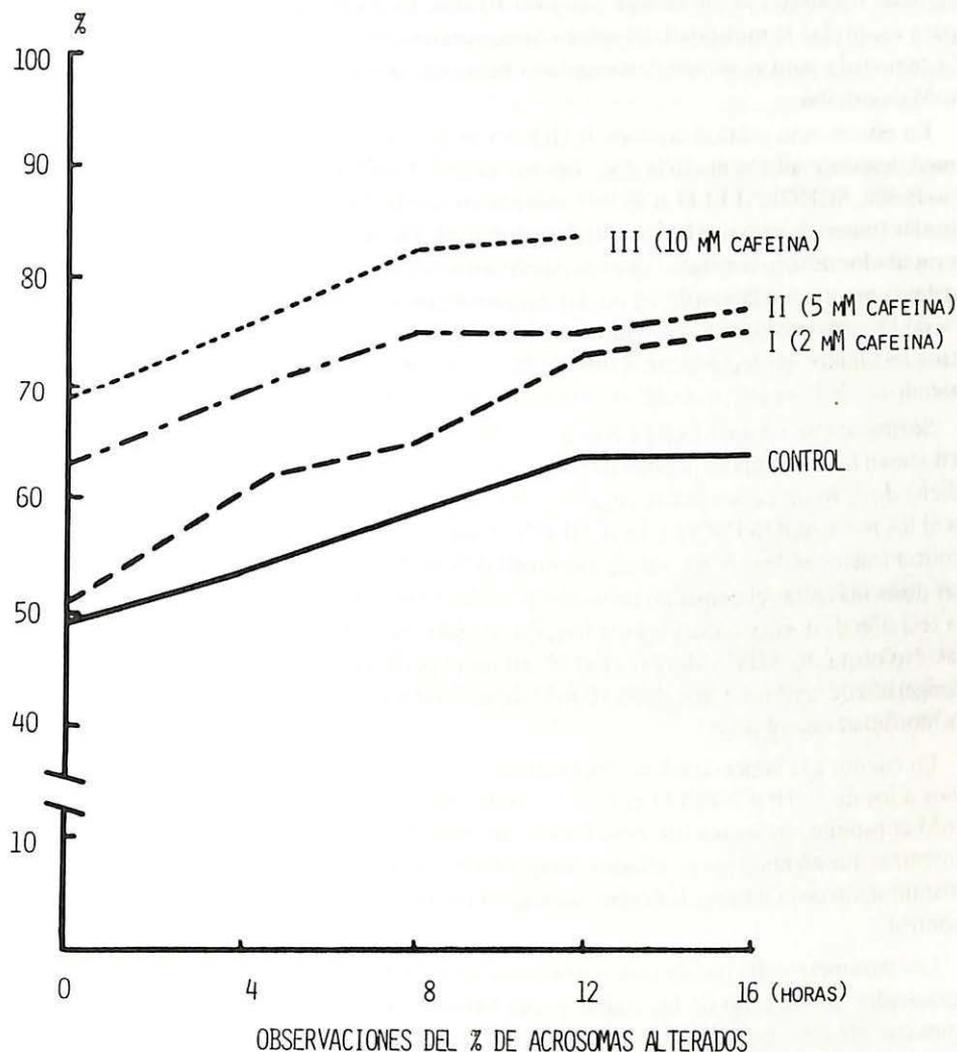
En cuanto al parámetro T del índice de supervivencia, tanto el grupo II (5 mM) ( $10,17 \pm 0,87$  horas), como el grupo III (10 mM) ( $9,33 \pm 0,67$  horas), son significativamente inferiores ( $P < 0,01$ ) con respecto al control ( $13,0 \pm 1,03$  horas), no encontrándose diferencias, estadísticamente significativas con respecto al testigo, en el grupo experimental I (2 mM) ( $10,83 \pm 0,87$ ). Con respecto al parámetro S no se aprecia ninguna diferencia significativa entre ninguno de los grupos experimentales.

Tanto en el grupo II ( $8,5 \pm 0,40$  mm), como en el III ( $8,5 \pm 0,57$  mm), se constata una disminución, estadísticamente muy significativa para el test de progresión vertical con respecto al control ( $11 \pm 0,59$  mm).



- FIGURA N° 1 -

El porcentaje de acrosomas alterados se incrementa, muy significativamente con respecto al control ( $48,8 \pm 1,58 \%$ ), en el grupo II (5 mM cafeína) ( $63,83 \pm 0,85$ ), y en el grupo experimental III (10 mM cafeína) ( $68,83 \pm 1,77 \%$ ), diferencias significativas que se mantienen a lo largo de todas las observaciones (Figura n.º 2). De igual forma, se constata una diferencia altamente significativa entre el grupo II y III.



- FIGURA N.º 2 -

Nuestros resultados sobre la estimulación de la motilidad espermática del semen descongelado de morueco mediante la adición de cafeína, están en la misma línea de los obtenidos por la mayoría de los autores que lo han estudiado en las especies humana y bovina.

Al igual que en el estudio llevado a cabo por AITKEN et al. <sup>1</sup>, en 1983, sobre semen

descongelado humano, la baja motilidad que se obtiene después de la descongelación del semen de morueco puede ser recuperada mediante la adición de cafeína. No obstante, a diferencia de estos autores que encuentran un efecto estimulante de la M.i. tanto a 2, 5 y 10 mM de cafeína, de nuestros resultados se deduce que solamente la dosis 2 mM es estimulante sobre este parámetro, no observándose efecto estimulante a 5 mM, y siendo de carácter negativo cuando se llega a la dosis 10 mM. Es decir, la dosis de cafeína requerida para estimular la motilidad del semen descongelado de morueco (2 mM), es menor que la requerida para el semen descongelado humano, que según AITKEN et al.<sup>1</sup>, sería 5 mM de cafeína.

En este mismo sentido también BARKAY et al.<sup>2</sup>, en 1977, concluyen que para el semen descongelado humano la dosis óptima es de 7,2 mM. Con respecto al semen humano fresco, SCHOENFELD et al.<sup>16,17</sup>, establecen que la dosis óptima de cafeína para estimular semen de carácter hipocinético es de 6 mM. De igual forma, GARBERS et al., en eyaculados de toro constatan que los espermatozoides en presencia de una dosis 6mM de cafeína mantenían la motilidad inicial durante 4 horas a 37°C, cuando en el control el 50 % de los espermatozoides móviles se volvían inmóviles en el mismo período. En nuestros resultados el efecto estimulante de la cafeína se centra en las dos primeras horas, siendo el efecto negativo cuando se sobrepasa la dosis de 2 mM de cafeína.

Sorprendentemente, MAKLER et al.<sup>11</sup>, obtienen estimulación espermática de la M.i., en semen fresco humano, a dosis tan altas como 10 mM, mientras que en nuestro trabajo dicha dosis resulta claramente negativa. Más acorde con nuestros resultados son los obtenidos por PAQUIGNON y DACHEUX<sup>13</sup>, en el cerdo, y en los que testadas diversas concentraciones de cafeína, variables entre 0,039 mM y 10 mM, encuentran que si bien a las dosis más altas el consumo de oxígeno aumenta tras una incubación de 180 minutos la relación de dosis y motilidad era inversa, siendo más alta a las dosificaciones más bajas. No obstante, MIYAMOTO et al.<sup>12</sup>, en un experimento realizado sobre semen descongelado de cerdo, y a una dosis 10 mM de cafeína no encuentra ningún incremento de la motilidad espermática.

En cuanto a la supervivencia espermática, nuestros resultados son totalmente contrarios a los de SCHOENFELD et al.<sup>16,17</sup>, toda vez que estos autores con una dosis de 6 mM constatan, en semen humano fresco, un incremento de la longevidad espermática, mientras que en nuestros resultados comprobamos que a dosis 5 mM y 10 mM existe una disminución de la longevidad espermática, estadísticamente significativa con respecto al control.

Los parámetros del test de progresión vertical y alteraciones acrosómicas, no han sido estudiados en ninguno de los trabajos que hemos revisado, no obstante hemos creído conveniente incorporarlos en nuestro estudio, especialmente en lo que hace referencia a la patología espermática, toda vez que como recientemente han puesto de manifiesto diversos autores, tales como WATSON et al.<sup>20</sup>, en 1972, SMORAG et al.<sup>18</sup>, en 1974 y TASSERON et al.<sup>19</sup>, en 1977, para el semen descongelado de morueco las características morfológicas del acrosoma constituyen un parámetro «in vitro» altamente correlacionado con la capacidad fecundante real del esperma. El hecho de que las dosis 5 mM y 10 mM de cafeína incrementen el porcentaje de acrosomas alterados del semen descongelado de morueco, aparte de disminuir la M.i. y el TPV, las hacen inviables para su posible utilización en la I.A. ovina. Solamente la dosis 2 mM parece la más aconsejable

para su inclusión en una investigación con objeto de optimizar los resultados de fertilidad del semen descongelado de morueco.

El mecanismo por el cual la cafeína estimula la motilidad espermática no es bien conocido todavía. Ya en 1971, GARBERS et al.<sup>8</sup>, demuestran que una dosis 2 mM de cafeína, aparte de estimular la motilidad de los espermatozoides bovinos, aumenta aproximadamente al doble el consumo de oxígeno de estos, variando este consumo según la propia composición del sustrato, siendo más favorecido en presencia de fructosa. HOMONAI et al.<sup>10</sup>, en 1976, comprobaron que la cafeína incrementa la utilización de la fructosa por parte de los espermatozoides humanos, conduciendo a un aumento de su motilidad.

Desde las experiencias de BEAVO et al.<sup>3</sup>, en 1971, es sabido que la cafeína, al igual que la teofilina y aminofilina son inhibidores de la fosfodiesterasa AMP cíclica, por lo que alguno de los procesos fisiológicos sobre los que interviene son mediatizados por su efecto acumulador de AMPc intracelular. No obstante, el mecanismo íntimo por el cual la elevación del AMPc intracelular induce a un incremento de la motilidad espermática no está todavía claramente demostrado. En opinión de PETERSON et al.<sup>14</sup>, el AMPc estaría relacionado con el control de flujos del ión calcio a través de la membrana plasmática del espermatozoide. Ciertamente, elevaciones de los niveles de calcio intracelular parecen tener un efecto de detrimento sobre la motilidad espermática, y el AMPc asociado a la bomba cálcica de la membrana plasmática parece ser críticamente importante en la regulación del contenido de este ión en la célula espermática. Dado el daño infligido sobre la membrana espermática durante la congelación, es posible que la baja motilidad observada después de la descongelación esté relacionada con la inhabilidad de dicha membrana espermática dañada para el control de los niveles de calcio en el interior del espermatozoide. Somos de la opinión de AITKEN et al.<sup>1</sup>, en que la cafeína puede compensar el daño espermático producido por la congelación y en definitiva la baja motilidad espermática que presenta a la descongelación, ejerciendo un efecto protector, precisamente, sobre la bomba de calcio de la membrana plasmática a través de la mediación del AMPc.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se hace una evaluación y estudio del efecto que ejerce la adición «in vitro» de cafeína a tres niveles de dosificación (2, 5 y 10 mM), sobre la motilidad espermática, supervivencia, test de progresión vertical y patología acrosómica del semen descongelado de morueco, llegando a la conclusión que el efecto de la cafeína sobre los parámetros estudiados es dosis dependiente, toda vez que a 2 mM se observa un efecto estimulante sobre el porcentaje de motilidad espermática, de carácter significativo con respecto al control, que no se aprecia a 5 mM y que se hace negativo a la máxima concentración (10 mM).

La dosis 5 y 10 mM de cafeína disminuyen la supervivencia espermática, sin afectar al parámetro S de dicho índice. Asimismo, el test de progresión vertical disminuye, estadís-

ticamente con respecto al control, a las mismas dosis. De igual forma, la adición de cafeína al semen descongelado de morueco, en dosis de 5 y 10 mM, incrementa el porcentaje de acrosomas anormales.

En conclusión, podemos afirmar que para el semen descongelado de morueco, la cafeína ejerce un efecto estimulante sobre la motilidad espermática a la concentración 2 mM, mientras que a dosis 5 mM y 10 mM el efecto es débilmente negativo y claramente negativo, respectivamente.

## EFFECT OF CAFFEINE ON MOTILITY, SUPERVIVANCE AND ACROSONY OF FROZEN-THAWED RAM SPERMATOZOA

### SUMMARY

In the present research project an evaluation and study is made of the effect which the addition «in vitro» of caffeine at three dosification levels (2, 5 and 10 mM), exercises on the spermatic motility of frozen-thawed ram semen, arriving at the conclusion that the effect of the caffeine on the parameters studied is dose-dependent, every time that at 2 mM a stimulating effect is observed on the percentage of spermatic motility, of a significant character in respect of the control, which is not appreciable at 5 mM and which becomes negative at the maximum concentration of 10 mM.

The doses of 5 and 10 mM of caffeine diminish the spermatic supervivence without affecting the parameter S of the stated rating. Likewise, the vertical progression test diminishes, statistically in respect of the control, at the same dose. In the same way, the addition of caffeine to the frozen-thawed ram spermatozoa in doses of 5 and 10 mM, increases the percentage of abnormal acrosomes.

In conclusion, we can affirm that for frozen-thawed ram spermatozoa, caffeine exercises a stimulant effect on the spermatid motility at a concentration of 2 mM, while at a dose of 5 mM and 10 mM the effect is faintly toxic and clearly toxic respectively.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) AITKEN, R. J.; BEST, F.; RICHARDSON, D. W.; SCHATS, R. and SIMM, G. (1983).— Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 67: 19-27.
- 2) BARKAY, J.; ZUCKERMAN, H.; SKLAN, D. and GORDON, S. (1977).— Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fert. and Steril.* 28(2): 175-177.

- 3) BEAVO, H. A.; ROGER, N. L.; GROFFORD, O. B.; BAIRD, C. F.; HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. and NEWMANN, E. V. (1971).— Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and on lipolysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 185:185-129.
- 4) BONADONNA, T. (1969).— La fecundación artificial en la mejora de la producción de las poblaciones animales. *1 Semana de Estudios sobre problemas de la producción animal en las áreas insulares*. Las Palmas de Gran Canaria, Diciembre, 7-13.
- 5) CORTEEL, J. M. and PAQUIGNON, M. (1984).— Preservation of the male gamete. 10th. Inter. Congr. on Anim. Reprod. and A.I., Illinois, Vol IV: 20-27.
- 6) DACHEUX, J. L. and PAQUIGNON, M. (1980).— Effects of caffeine on ram and boar spermatozoa: influence of their stage of maturation and the medium: initiation of progressive motility of testicular spermatozoa. In *Testicular development, structure and function* N. Y., USA, Raven Press.
- 7) FRASER, L. R. (1979).— Rate of fertilization in vitro and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse egg. *J. Reprod. Fert.*, 55: 153-160.
- 8) GARBERS, D. L.; FIRST, N. L.; SULLIVAN, J. J. and LARDY, H. A. (1971).— Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Bio. Reprod.* 5: 336-339.
- 9) HAESUNGCHARERN, A. and CHULAVATNATOL, M. (1973).— Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. *Fert. and Steril.*, 24(9): 662-665.
- 10) HOMONAI, Z. T.; PAZ, G.; SOFER, A. and KREICER, P. F. (1976).— Effect of caffeine on motility, velocity, oxygen consumption and glucolipids of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fert.* 21: 163-166.
- 11) MAKLER, A.; MAKLER, E.; ITZKOVITZ, J. and BRANCES, J. M. (1980).— Factors affecting sperm motility. 4. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein and other metabolically active compounds. *Fert. and Steril.*, 33: 624-630.
- 12) MIYAMOTO, H. and NISHIKAWA, Y. (1980).— Effect of caffeine on motility of boar spermatozoa. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 51(4): 272-278.
- 13) PAQUIGNON, M. and DACHEUX, J. L. (1977).— Stimulating and inhibiting effects of different concentrations of caffeine on the oxygen uptake of porcine ejaculated spermatozoa. *IRC'S Med. Sci., Library Compendium* 5(6): 285.
- 14) PETERSON, R. N.; SEYLER, D.; BUNDMAN, D. and FREUND, M. (1979).— The effect of theophylline and dibutyryl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 55: 385-390.
- 15) SACHS, L. (1978).— *Estadística Aplicada*. Ed. Labor, Barcelona.
- 16) SCHOENFELD, C.; AMELAR, R. D. and DUBIN, L. (1973).— Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. A preliminary report. *Fert. and Steril.*, 24: 772.
- 17) SCHOENFELD, C.; AMELAR, R. D. and DUBIN, L. (1975).— Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fert. and Steril.*, 26: 158.
- 18) SMORAG, Z. and KARETA, W. (1974).— Evaluation of the fertility of frozen ram semen based on the state of the acrosomes. *Medycyna Wet.*, 30(11): 689-691.
- 19) TASSERON, F.; AMIR, D. and SCHINDLER, H. (1977).— Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. *J. Reprod. Fert.*, 51: 461-462.
- 20) WATSON, P. F. and MARTIN, I. C. A. (1972).— A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28: 99-101.
- 21) WATSON, P. F. (1975).— Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97: 12-15.

ticamente con respecto al control, a las mismas dosis. De igual forma, la adición de cafeína al semen descongelado de morueco, en dosis de 5 y 10 mM, incrementa el porcentaje de acrosomas anormales.

En conclusión, podemos afirmar que para el semen descongelado de morueco, la cafeína ejerce un efecto estimulante sobre la motilidad espermática a la concentración 2 mM, mientras que a dosis 5 mM y 10 mM el efecto es débilmente negativo y claramente negativo, respectivamente.

## EFFECT OF CAFFEINE ON MOTILITY, SUPERVIVANCE AND ACROSOMY OF FROZEN-THAWED RAM SPERMATOZOA

### SUMMARY

In the present research project an evaluation and study is made of the effect which the addition «in vitro» of caffeine at three dosification levels (2, 5 and 10 mM), exercises on the spermatic motility of frozen-thawed ram semen, arriving at the conclusion that the effect of the caffeine on the parameters studied is dose-dependent, every time that at 2 mM a stimulating effect is observed on the percentage of spermatic motility, of a significant character in respect of the control, which is not appreciable at 5 mM and which becomes negative at the maximum concentration of 10 mM.

The doses of 5 and 10 mM of caffeine diminish the spermatic supervivence without affecting the parameter S of the stated rating. Likewise, the vertical progression test diminishes, statistically in respect of the control, at the same dose. In the same way, the addition of caffeine to the frozen-thawed ram spermatozoa in doses of 5 and 10 mM, increases the percentage of abnormal acrosomes.

In conclusion, we can affirm that for frozen-thawed ram spermatozoa, caffeine exercises a stimulant effect on the spermatid motility at a concentration of 2 mM, while at a dose of 5 mM and 10 mM the effect is faintly toxic and clearly toxic respectively.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) AITKEN, R. J.; BEST, F.; RICHARDSON, D. W.; SCHATZ, R. and SIMM, G. (1983).—Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 67: 19-27.
- 2) BARKAY, J.; ZUCKERMAN, H.; SKLAN, D. and GORDON, S. (1977).—Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fert. and Steril.* 28(2): 175-177.

- 3) BEAVO, H. A.; ROGER, N. L.; GROFFORD, O. B.; BAIRD, C. F.; HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. and NEWMANN, E. V. (1971) - Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and on lipolysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 185: 185-129.
- 4) BONADONNA, T. (1969) - La fecundación artificial en la mejora de la producción de las poblaciones animales. *I Semana de Estudios sobre problemas de la producción animal en las áreas insulares*. Las Palmas de Gran Canaria, Diciembre, 7-13.
- 5) CORTEEL, J. M. and PAQUIGNON, M. (1984) - Preservation of the male gamete. 10th. Inter. Congr. on Anim. Reprod. and A.I., Illinois, Vol. IV, 20-27.
- 6) DACHEUX, J. L. and PAQUIGNON, M. (1980) - Effects of caffeine on ram and boar spermatozoa: influence of their stage of maturation and the medium, initiation of progressive motility of testicular spermatozoa. In *Testicular development, structure and function* N. Y., U.S.A., Raven Press.
- 7) FRASER, L. R. (1979) - Rate of fertilization in vitro and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse egg. *J. Reprod. Fert.* 55: 153-160.
- 8) GARBERS, D. L.; FIRST, N. L.; SULLIVAN, J. J. and LARDY, H. A. (1971) - Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Bio. Reprod.* 5: 336-339.
- 9) HAESUNGCHARERN, A. and CHULAVATNATOL, M. (1973) - Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. *Fert. and Steril.* 24(9): 662-665.
- 10) HOMONAI, Z. T.; PAZ, G.; SOFER, A. and KREICER, P. F. (1976) - Effect of caffeine on motility, velocity, oxygen consumption and glucolipids of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fert.* 21: 163-166.
- 11) MAKLER, A.; MAKLER, E.; ITZKOVITZ, J. and BRANCES, J. M. (1980) - Factors affecting sperm motility. 4. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein and other metabolically active compounds. *Fert. and Steril.* 33: 624-630.
- 12) MIYAMOTO, H. and NISHIKAWA, Y. (1980) - Effect of caffeine on motility of boar spermatozoa. *Jap. J. Zootech. Sci.* 51(4): 272-278.
- 13) PAQUIGNON, M. and DACHEUX, J. L. (1977) - Stimulating and inhibiting effects of different concentrations of caffeine on the oxygen uptake of porcine ejaculated spermatozoa. *IRCS Med. Sci., Library Compendium* 5(6): 285.
- 14) PETERSON, R. N.; SEYLER, D.; BUNDMAN, D. and FREUND, M. (1979) - The effect of theophylline and dibutyryl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 55: 385-390.
- 15) SACHS, L. (1978) - *Estadística Aplicada*. Ed. Labor, Barcelona.
- 16) SCHOENFELD, C.; AMELAR, R. D. and DUBIN, L. (1973) - Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. A preliminary report. *Fert. and Steril.* 24: 772.
- 17) SCHOENFELD, C.; AMELAR, R. D. and DUBIN, L. (1975) - Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fert. and Steril.* 26: 158.
- 18) SMORAG, Z. and KARETA, W. (1974) - Evaluation of the fertility of frozen ram semen based on the state of the acrosomes. *Medycyna Wet.* 30(11): 689-691.
- 19) TASSERON, F.; AMIR, D. and SCHINDLER, H. (1977) - Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. *J. Reprod. Fert.* 51: 461-462.
- 20) WATSON, P. F. and MARTIN, I. C. A. (1972) - A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28: 99-101.
- 21) WATSON, P. F. (1975) - Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97: 12-15.