

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Área Fisiología Veterinaria



**"ESTUDIO DE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO*
DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS Y
EYACULADOS EN LA ESPECIE PORCINA"**

MANUEL SANSEGUNDO GONZÁLEZ

MURCIA, 2008



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Facultad de Veterinaria

D^a. CARMEN MATÁS PARRA, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina”, realizada por D. MANUEL SANSEGUNDO GONZÁLEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de FISIOLÓGÍA, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de MAYO de 2008



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Facultad de Veterinaria

D. SALVADOR RUIZ LÓPEZ, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina”, realizada por D. MANUEL SANSEGUNDO GONZÁLEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de FISIOLÓGÍA, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de MAYO de 2008



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

D. FRANCISCO JAVIER SALAZAR APARICIO, Catedrático de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA y Director del Departamento de FISIOLÓGÍA, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina“, ha sido realizada por D. MANUEL SANSEGUNDO GONZÁLEZ, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. CARMEN MATÁS PARRA y D. SALVADOR RUIZ LÓPEZ, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 22 de MAYO de 2008

Prof. F. Javier Salazar Aparicio
Director del Departamento



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Dª. Mª Teresa Llinás Más, Secretaria del Departamento de FISIOLÓGÍA.

CERTIFICA:

Que en reunión del Consejo de Departamento de fecha 18 de Octubre de 2007 se aprobó el PROYECTO DE TESIS titulado "Estudio de la Capacitación Espermática In Vitro en Espermatozoides Epididimarios y Eyaculados en la Especie Porcina", presentado por D Manuel Sansegundo González con D.N.I. nº 23262540-H , alumno de este Departamento dentro del programa "Ciencias Biomédicas Experimentales" y avalado por los Directores:

Dª Carmen Matás Parra, Doctora por la Universidad de Murcia, con D.N.I. nº 77503596-J vinculada al Departamento de FISIOLÓGÍA de la Universidad de Murcia y D. Salvador Ruiz López, Doctor por la Universidad de Murcia, con D.N.I. nº 45271016-R vinculado al Departamento de FISIOLÓGÍA de la Universidad de Murcia

(Los directores de Tesis serán doctores con experiencia investigadora acreditada).

ÁREAS DE CONOCIMIENTO

4	1	0	0	5	0
---	---	---	---	---	---

Consignar el/los código/s de las áreas de conocimiento, según el catálogo elaborado por el Consejo de Universidades, en las que se sitúa el tema del proyecto de tesis.

CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO

2	4	0	1	1	3
---	---	---	---	---	---

Consignar los códigos de la/s materia/s, que abarca/n el tema del proyecto según la Nomenclatura Internacional para los Campos de la Ciencia y la Tecnología de la UNESCO.

2	4	0	7		
---	---	---	---	--	--

Y para que conste, firmo el presente certificado con el Vº Bº del Sr. Director del Departamento, en Murcia, a 19 de Octubre de 2007.

Mª Teresa Llinás Más

Fdo: Mª Teresa Llinás Más



Vº Bº

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE FISIOLÓGÍA

Francisco Javier Salazar

Fdo: Francisco Javier Salazar

A mis padres

A mi hermana
A mi sobrino Javier

La vida, en resumidas cuentas, se compone de una serie de etapas que se cierran y otras que se abren de una manera más o menos rápida. Ahora mismo se está cerrando mi etapa de becario predoctoral y se abre mi etapa de.....-la verdad es que no sé muy bien de que-, pero bueno supongo que será una buena etapa. Yo siempre diré que mis años de becario han sido sin duda los mejores por muchos motivos. Sin duda, el más importante de todos es el haber podido conocer a una serie de personas con las que he compartido infinidad de situaciones y emociones y que sé que echaré enormemente de menos. Ahora llega el momento de mostrarles mi más sincera gratitud por todo lo que me han aportado.

A todas las personas que se han colado en mi vida en cualquier momento; a las que sin querer herí y las que sé que sin querer me hirieron a mí también. Espero que a todas ellas les haya quedado algo mío, bueno o malo, pero en resumidas cuentas mío, ya que yo de todas ellas he aprendido mucho.

A mis directores de tesis y grandes amigos Carmen Matás Parra y Salvador Ruiz López que han sabido "tirar del carro" cuando ha hecho falta. Vosotros sabéis mejor que nadie que esta tesis es más vuestra que mía. Habéis sabido dirigir esta película de manera magistral y conseguir con ello que tenga el mejor de los finales. ¡De corazón, gracias!

Carmela, a ti que te puedo decir.....¡¡¡¡ahhhh sí!!!!....., pues simplemente que te quiero un montón. Has hecho posible que todo esto salga "pa' lante" y siempre ha habido en ti una frase de cariño y apoyo cuando ha hecho falta (¡¡¡ Vamos Sanse, que ya queda menos¡¡¡¡¡). Has confiado en mí sin objeción alguna y todos tus consejos han sido fundamentales. Gracias por haberme dado la posibilidad de conocer a una de las personas más auténticas y sinceras con la que jamás me haya encontrado nunca. No permitiré nunca que ningún hueso de ciruela se interponga entre nosotros (¡¡¡Ya sabes tú por qué, je je je je!!!!).

Salva, te conozco desde hace once o doce años y siempre has estado a mi lado. Me diste la oportunidad de entrar en el Departamento y confiaste en mí desde el principio para que esa beca fuera mía. Me has ayudado en todo lo que he necesitado y tu disponibilidad cada vez que he llamado a tu puerta ha sido máxima. Te doy las gracias por todo ello y por tu amistad sincera, que con el paso del tiempo me ha permitido descubrir la gran persona que eres.

A Pilar Coy y Joaquín Gadea. Gracias por toda la colaboración prestada, por todos estos años de amistad y por el trato que he recibido de vosotros. Sé que bastantes horas vuestras también van en este trabajo.

A Rakel Romar. Sabes que te quiero tela y no se me olvida que me debes una baño relajante con aguas termales, -¿vale?-.

A todos mis compañeros "milleuristas" del Departamento. A los antiguos (Fran, David, Luisito, Empar, Sebastián) y a los nuevos (Aitor, Karen, Loli, Irene...). Gracias a unos por todo lo vivido y a otros por todo lo que viviré seguro junto a ellos.

¡Ay Franito!. Sabes bien todo lo que hemos pasado durante nuestra etapa de becarios. Recuerdo aquellas interminables tardes en el citómetro del SACE en las que sacábamos tiempo para las "meriendas" de coca colas light y almendras rancias. Recuerdo también los viajes a Granada (algún día tendremos que contar cómo entramos a la Alhambra), a Zaragoza y a Ámsterdam (tenemos que aprender a liar) y todos los momentos vividos. Por todos estos recuerdos imborrables y por tu ayuda incuestionable en esta Tesis, te doy infinitamente las gracias. Eres un amigo para siempre.

Hola David!!!!. ¡Qué buen "zagalico" eres!. Siempre me acordaré de aquel viaje en coche a ninguna parte y escuchando a Fito durante 2 horas. Gracias a ti también por tu disponibilidad en todo momento y por tu sincera amistad. Solo pedirte un favor: pégale fuego al disfraz de pingüino del Carnaval de Águilas (todavía tengo pesadillas).

-¿Qué pasa Papi Chulo?-. También hay unas palabras para ti. Tú también has sido otro de mis grandes amigos en el Departamento y todo lo vivido durante estos años, también quedará en mí para siempre.

A mi "Emparica". Gracias por todo y sobre todo por tu sonrisa que tantos días nos ha alegrado a todos. (¿Nos vamos a París o a Parrish?, ¡Ja ja!).

A Juan Carlos Gardón. Gracias por tu amistad durante estos años, por tu ayuda con el CASA, por el mate y por hacernos disfrutar de la gastronomía de tu tierra.

A los dos Juanes (Juan Cartagena y Juan Yecla). -¡En el fondo todos tenemos que estar agradecidos a vosotros!-. Gracias por vuestro trabajo en el laboratorio y en la recogida de muestras del matadero y de la granja. Todo nuestro trabajo depende por suerte de vosotros.

A toda la gente de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (Ginés Salido, Rosado, Pedro, María, J, Alba, etc), pero muy especialmente a Antonio González. Gracias por tu ayuda en todo momento, pero sobre todo por hacerme sentir como un extremeño más y por saber que tengo un gran amigo en la tierra de los conquistadores.

A Noemí y Joaquín García de Fisiología de la Facultad de Medicina de Murcia. Gracias, por colaborar con nosotros en todo momento. Sin vuestra ayuda esto no sería hoy en día una realidad.

A Juan, Juanico y especialmente a Juani e Isa, gracias por todo lo que me habéis apoyado y querido y, aunque por los motivos que sean la vida haya separado nuestros caminos, siempre ocupareis un lugar privilegiado en mi corazón.

A mis padres Ginés y Tere, deciros que sois lo más importante de mi vida. No podré devolveros nunca todo lo que me habéis dado, vuestro cariño y comprensión, vuestro apoyo y tantas y tantas cosas.....etc. Estoy tremendamente orgulloso de vosotros y aunque no os lo diga con la frecuencia que debiera, os quiero.

A mi hermana Inma, gracias por quererme como lo haces. Has sido una compañera de juegos perfecta durante nuestra infancia y ahora con el paso de los años te has convertido en un pilar indispensable en mi vida.

A Javi, gracias por tu infinita bondad.

Al nuevo componente de la familia, mi sobrino Javier, que ha sabido cambiar radicalmente la vida de todos nosotros en apenas dos años.

A mis abuelos, especialmente a Domingo y Rosa (mis segundo padres). Gracias por ocuparos de mí en los primeros momentos y por regalarme momentos tan especiales que formarán parte de mi vida para siempre.

A Silvia. Gracias por cambiar tu vida radicalmente (yo sé que tengo mucho que ver en ello) y por demostrarme que 550 km no son nada cuando se quiere. Has mejorado mi vida en todos los aspectos.

A todos los componentes de mi grupo de música "Fuera de Lugar". Gracias por enseñarme a amar verdaderamente la música y hacerme sentir alguien importante encima de un escenario.

A mis perros Pancho y en especial a Roberto. Gracias por el cariño sincero que me dais y que solamente un perro sabe dar. En vosotros se cumple con creces eso que dice que "el perro es el mejor amigo del hombre".

A toda mi familia de "Aguiproan" (Asociación agulleña protectora de animales y plantas) a la cual pertenezco y de la que soy veterinario. A María Luisa, su presidenta por la incansable labor realizada diariamente en pro de la

defensa de los derechos de los animales y a Lucas su esposo, por animarla en su empeño. A los más de 200 perros y gatos abandonados que forman parte de la asociación, gracias por enseñarme cada día a amar con más fuerza mi trabajo y por demostrarme continuamente que la palabra animal es más humana que humano.

A todos los perros y gatos abandonados y maltratados por la salvaje crueldad del hombre. Espero que algún día esta sinrazón termine y que ocupéis en la sociedad el lugar que merecéis, por todo el cariño que sois capaces de aportar sin esperar nada a cambio.

**“Una de las glorias de la civilización,
sería el haber cambiado la suerte de los animales”**

Théophile Gautier
(1811-1872)

**ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES
DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL**

ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

1. **SANSEGUNDO M**, MATÁS C, ATUCHA NT, GONZÁLEZ A, RUIZ S. Cinética de la entrada de calcio en espermatozoides de verraco capacitados *in vitro*. *ITEA*. 26: 344-346. 2005.
2. **SANSEGUNDO M**, RUIZ S, GONZÁLEZ A, ATUCHA NT, MATÁS C. Calcium uptake as a response to three sperm treatments for capacitation. *VIIth International Conference on Pig Reproduction*. Rolduc (The Netherlands). 2005.
3. MATÁS C, **SANSEGUNDO M**, RUIZ S, GADEA J. The effect of different treatments of porcine ejaculated and epididymal spermatozoa on ROS generation. *Reprod Fertil Dev*. 18: 176. 2006.
4. **SANSEGUNDO M**, RUIZ S, GONZÁLEZ A, ATUCHA NT, MATÁS C. Intracellular calcium uptake as a response to different capacitation treatments in ejaculate and epididymal boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 18: 179. 2006.
5. MATÁS C, GARCÍA-VÁZQUEZ FA, **SANSEGUNDO M**, RUIZ S, GADEA J. Comparing changes in membrane lipid order in epididymal and ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 19: 278-279. 2007.
6. MATÁS C, GARCIA-VAZQUEZ FA, **SANSEGUNDO M**, GADEA J, COY P, ROMAR R, RUIZ S. Estudio de la capacitación espermática *in vitro* en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *ITEA*. 28: 30-32. 2007.

7. **SANSEGUNDO M**, GARDÓN JC, GARCÍA-VÁZQUEZ FA, GADEA J, MATÁS C. Changes in motion parameters measured by CASA when compare epididymal and ejaculated boar spermatozoa under three different treatments. *Reprod Fertil Dev.* **19: 280.** 2007.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 El espermatozoide. Generalidades	6
2.1.1 Espermatogénesis	
2.1.2 Composición de la membrana plasmática	
<u>2.1.2.1 Glicocálix</u>	
<u>2.1.2.2 Lípidos</u>	
<u>2.1.2.3 Proteínas</u>	
2.2 El epidídimo	16
2.2.1 Estructura	
2.2.2 Funciones	
<u>2.2.2.1 Protección</u>	
<u>2.2.2.2 Transporte</u>	
<u>2.2.2.3 Maduración</u>	
2.3 El plasma seminal	24
2.3.1 Componentes de la secreción de las glándulas sexuales accesorias	
2.3.2 Proteínas del plasma seminal	
2.4 La eyaculación	28
2.5 Concepto de capacitación espermática	29
2.5.1 Capacitación espermática <i>in vivo</i>	
2.5.2 Capacitación espermática <i>in vitro</i>	
2.6 Cambios en el espermatozoide durante la capacitación	32
2.6.1 Cambios a nivel de la membrana plasmática	
2.6.2 Fosforilación de la tirosina	
2.6.3 Cambios en la concentración iónica y potencial de membrana	
2.6.4 Incremento de los niveles de Ca ²⁺	

2.6.5 Cambios en el patrón de movimiento. La hiperactivación	
2.6.6 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	
2.7 Reacción acrosómica (RA)	47
2.8 Papel de los constituyentes de los medios de capacitación	49
2.8.1 Albúmina sérica bovina (BSA)	
2.8.2 HCO ₃ ⁻	
3.8.3 Ca ²⁺	
2.9 Sistemas de capacitación espermática <i>in vitro</i>	52
2.9.1 Lavado seminal con albúmina	
2.9.2 Métodos de migración	
2.9.2 Métodos de filtrado	
2.9.4 Centrifugación por gradientes	
2.10 Métodos de evaluación de la capacitación espermática	55
2.10.1 Análisis computerizado de la motilidad (CASA)	
2.10.2 Determinación de la concentración de Ca ²⁺ intracelular	
2.10.3 Evaluación de las modificaciones lipídicas a nivel de membrana	
2.10.4 Determinación de ROS	
2.10.5 Evaluación de la reacción acrosómica	
2.10.6 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1 Medios para la manipulación, lavado y cultivo de los gametos	64
3.1.1 Medio de dilución y de manipulación de los espermatozoides	
3.1.2 Medios de lavado y manipulación de los ovocitos	
<u>3.1.2.1 Transporte y lavado de ovarios</u>	
<u>3.1.2.2 Manipulación de ovocitos</u>	
3.1.3. Medios de maduración <i>in vitro</i> y de fecundación <i>in vitro</i>	

3.2 Obtención de los espermatozoides	68
3.2.1 Espermatozoides de epidídimo	
3.2.2 Espermatozoides eyaculados	
3.3 Recogida y transporte de ovarios	71
3.4 Obtención y selección de los ovocitos	71
3.5 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	73
3.6 Preparación de soluciones y reactivos	74
3.6.1 Preparación de soluciones de Percoll®	
3.6.2 Preparación de solución PBS-BSA	
3.6.3 Soluciones y reactivos para la medición de Ca ²⁺ intracelular	
3.6.4 Preparación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H ₂ DCFDA)	
3.6.5 Preparación de Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro1	
3.6.6 Preparación de ioduro de Propidio (IP) y de lectina PNA-FITC	
3.7 Procesado de los espermatozoides para inducir la capacitación	76
3.8 Análisis de la capacitación espermática	77
3.8.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)	
3.8.2 Determinación de la entrada de Ca ²⁺ al espermatozoide mediante espectrofluorimetría	
<u>3.8.2.1 Cuantificación de fluorescencia</u>	
<u>3.8.2.2 Transformación de fluorescencia en concentración de Ca²⁺ intracelular [(Ca²⁺)_i]</u>	
3.8.3 Evaluación, mediante citometría de flujo, de la producción de ROS, del desorden lipídico en membrana espermática y de la reacción acrosómica	
<u>3.8.3.1 Evaluación de la producción de ROS</u>	
<u>3.8.3.2 Evaluación del desorden lipídico en membrana espermática</u>	
<u>3.8.3.3 Evaluación de la reacción acrosómica</u>	

3.8.4 Estudio de la penetración <i>in vitro</i> de ovocitos madurados <i>in vitro</i>	
3.9 Diseño experimental	91
3.9.1 Experimento 1. Estudio de parámetros de movimiento en espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a tres tratamientos de capacitación.	
3.9.2 Experimento 2. Cinética de la entrada de Ca ²⁺ en espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a tres tratamientos de capacitación	
<u>3.9.2.1 Experimento 2.1. Estudio de la entrada de Ca²⁺ en espermatozoides eyaculados incubados en medio capacitante TALP</u>	
<u>3.9.2.2 Experimento 2.2. Determinación de la entrada de Ca²⁺ en espermatozoides epididimarios y eyaculados con tres tratamientos de capacitación</u>	
3.9.3 Experimentos 3, 4 y 5. Efecto de tres tratamientos de capacitación de espermatozoides epididimarios y eyaculados sobre la generación de ROS, modificaciones lipídicas de membrana espermática y proceso de reacción acrosómica	
3.9.4 Experimento 6. Determinación de la penetración espermática en ovocitos madurados <i>in vitro</i> utilizando espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a tres tratamientos de capacitación	
3.10 Análisis estadístico	93
4. RESULTADOS	94
4.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)	95
4.2 Determinación de la entrada de Ca²⁺ al espermatozoide mediante espectrofluorimetría	98
4.2.1 Cinética de la entrada de Ca ²⁺ en espermatozoides de verraco	
4.2.2 Cinética de la entrada de Ca ²⁺ en espermatozoides de verraco capacitados <i>in vitro</i> mediante tres sistemas de capacitación	
4.3 Determinación de ROS	101
4.4 Evaluación del desorden lipídico en membrana espermática	104
4.5 Evaluación de la reacción acrosómica	108

4.6 Estudio de la penetración <i>in vitro</i> de ovocitos madurados <i>in vitro</i>	110
5. DISCUSIÓN	113
5.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)	120
5.2 Determinación de la entrada de Ca ²⁺ al espermatozoide mediante espectrofluorimetría	124
5.3 Determinación de ROS	128
5.4 Evaluación del desorden lipídico en membrana espermática	130
5.5 Evaluación de la reacción acrosómica	132
5.6 Estudio de la penetración <i>in vitro</i> de ovocitos madurados <i>in vitro</i>	134
6. CONCLUSIONES	137
7. RESUMEN	140
8. SUMMARY	145
9. ABREVIATURAS	150
10. BIBLIOGRAFÍA	154

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción *in vitro* de embriones porcinos es una valiosa técnica para la investigación en campos tan diversos como la transgénesis, xenotransplantes, mejora genética, recuperación de razas en peligro de extinción, etc. Sin embargo, el porcentaje de embriones obtenido *in vitro* es muy bajo en relación a otras especies. Entre las causas del bajo rendimiento obtenido se han descrito problemas en la maduración ovocitaria, en la elevada polispermia durante la fecundación *in vitro* (FIV) o en inadecuados sistemas para el desarrollo embrionario (Coy y Romar, 2002). Actualmente, podemos concluir que las elevadas fecundaciones polispérmicas son el principal problema en la obtención de embriones *in vitro*.

En la especie porcina, las fecundaciones polispérmicas en FIV oscilan entre el 40 y el 60%, cuando el porcentaje de penetración es próximo al 100% de los ovocitos (Funahashi y Romar, 2004; Chen et al., 2006). Las causas de la polispermia no están claras (Barros y Yanagimachi, 1971; Hoodbhoy y Talbot, 1994; 2001; Sun et al., 2003, Talbot y Dandekar, 2003; Wang et al., 2003) pero indudablemente el gameto masculino es uno de los factores claves en este proceso.

Se ha intentado incrementar la monospermia disminuyendo el número de espermatozoides capacitados que se ponen en contacto con los ovocitos, modificando la composición y volumen de los medios de cocultivo, disminuyendo el tiempo de coincubación o utilizando espermatozoides de distinto origen (Coy y Romar, 2002).

Un etapa esencial en el procesado espermático para FIV es lograr la capacitación *in vitro* a la vez que se controla el momento en el que se produce la reacción acrosómica ya que solo espermatozoides capacitados pero no reaccionados serán capaces de fecundar al ovocito. El concepto de

capacitación fue mencionado por primera vez en la década de los 50 por *Austin y Chang*; estos autores, de manera independiente, observaron que los espermatozoides necesitaban experimentar una serie de cambios en el tracto genital femenino antes de adquirir la capacidad de penetrar al ovocito. Bajo esta premisa, fueron muchos los investigadores que trataron de imitar *in vitro* los eventos que ocurren *in vivo* en la especie porcina pero no fue hasta 1981 cuando *Pavlok* obtuvo la primera penetración *in vitro* de ovocitos en esta especie. El tratamiento que utilizó para capacitar los espermatozoides se basó en numerosos lavados por centrifugación y preincubación de los espermatozoides en un medio con alta concentración de Ca^{2+} y cultivo a 37°C . Posteriormente, *Cheng* (1985), modificando la técnica de *Pavlok*, consiguió el primer nacimiento de lechones porcinos mediante FIV. Más tarde, en 1989, *Mattioli et al.* obtuvieron lechones mediante FIV pero lavando los espermatozoides en un gradiente de Percoll® para inducir la capacitación.

La capacitación espermática se podría definir como la serie de acontecimientos que ocurren en el espermatozoide y que le confieren la capacidad de unirse a la zona pelúcida, experimentar la reacción acrosómica en respuesta a los agonistas naturales y expresar la hipermotilidad. Entre los cambios que experimenta el espermatozoide capacitado se encuentran modificaciones lipoproteicas que permiten la exteriorización de receptores, cambios en canales iónicos que intervienen en la activación de los mecanismos de transducción (flujo de Ca^{2+} , síntesis de AMPc, fosforilación de proteínas, etc.), así como la modificación del metabolismo energético.

Actualmente, los sistemas de capacitación *in vitro* son muy variados y con todos ellos los resultados de penetraciones en los ovocitos son exitosos. Entre estos sistemas se encuentran los lavados espermáticos en distintos gradientes para seleccionar los espermatozoides de mayor calidad, la centrifugación para eliminar los restos de plasma seminal, o simplemente la preincubación en el medio de FIV (*Matás et al., 2003*).

Otros estudios realizados para optimizar la FIV se han basado en el uso de espermatozoides de distinto origen (epididimarios y eyaculados) y bajo distintos sistemas de conservación (frescos, refrigerados y congelados) (*Rath y Niemann, 1997*). Hay autores que consideran que los espermatozoides de epidídimo son más fáciles de capacitar que los eyaculados puesto que no han estado en contacto con el plasma seminal y por ello no han estado expuestos a los factores decapacitantes de éste. Sin embargo, otros consideran que este hecho no es importante si, previo a la FIV, se elimina el plasma seminal (*Yanagimachi, 1994*).

A pesar de todos los avances y estudios realizados para mejorar el rendimiento de los sistemas de FIV, aún no se ha conseguido estandarizar el procedimiento por el que los resultados de FIV puedan ser repetitivos y homogéneos entre laboratorios o incluso dentro de un mismo laboratorio y sigue sin responderse la pregunta sobre qué tipo de espermatozoides es el más apropiado o qué sistema de capacitación se debería seguir.

Por todo lo anteriormente expuesto, el **objetivo general** de este trabajo ha sido describir los cambios que acontecen en el espermatozoide epididimario y eyaculado capacitado *in vitro* con tres tratamientos utilizados comúnmente en los laboratorios de FIV. Para ello, se han utilizado técnicas que nos permiten determinar las modificaciones que experimenta el espermatozoide durante la capacitación como son el incremento de la motilidad espermática mediante sistemas de análisis computerizado de imágenes, la entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide, la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), la evaluación del desorden lipídico a nivel de membrana, la determinación de la reacción acrosómica y finalmente la rapidez con la que los espermatozoides penetran a los ovocitos en un sistema de maduración y de fecundación *in vitro*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El espermatozoide. Generalidades

El espermatozoide maduro del cerdo tiene una longitud de 45 μm y está compuesto de tres partes principales: la cabeza, de forma oval, en la que se diferencian el acrosoma y el núcleo, la pieza de conexión o cuello y la cola o flagelo, dividida en 3 regiones: segmento intermedio o mitocondrial, pieza principal y pieza terminal (*Figura 2-1*).

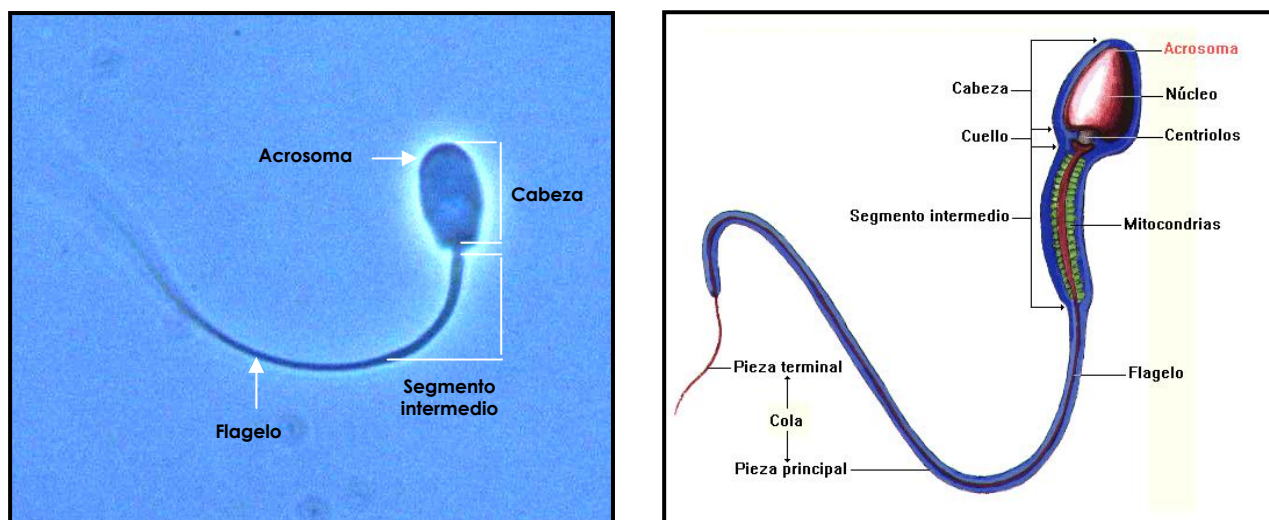


Figura 2-1. Estructura del espermatozoide porcino.

El núcleo del espermatozoide es menor que el núcleo del resto de las células somáticas del organismo, pero ocupa la práctica totalidad de la cabeza. También difiere del resto de las células del organismo tanto en cantidad de DNA como en la composición de las nucleoproteínas.

El acrosoma es una vesícula de gran tamaño que contiene enzimas, fundamentalmente hialuronidasa, y que se encuentra situada en la región apical de la cabeza espermática, bajo la membrana plasmática. Está formada por una membrana interna (membrana acrosomal interna), que recubre la membrana del núcleo y que solamente queda exteriorizada cuando tiene lugar la reacción acrosómica y por la membrana acrosomal

externa, recubierta por la membrana plasmática. Ambas membranas se fusionan durante la reacción acrosómica liberando el contenido acrosomal al exterior (Figura 2-2).

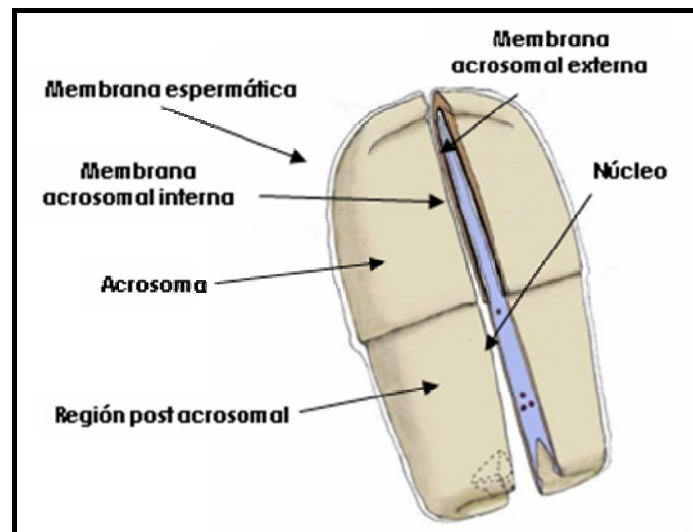


Figura 2-2. Representación de la estructura de la cabeza espermática.

2.1.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis se define como un proceso de diferenciación celular, altamente sincronizado, por el cual una espermatogonia se transforma de manera gradual, en una célula haploide extremadamente diferenciada denominada espermatozoide (Pinart et al., 2000) (Figura 2-3).

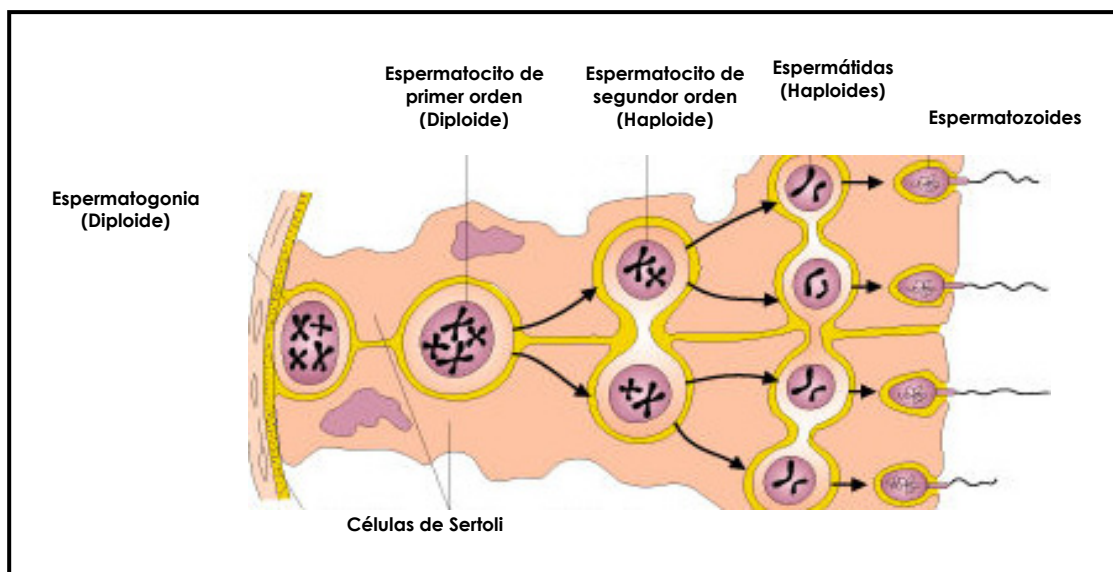


Figura 2-3. Representación esquemática de la espermatogénesis.

Este proceso de división meiótica está controlado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo-testículo y dura aproximadamente 30 días en la especie porcina. A partir de cada espermatogonia (célula germinal más prematura diploide) se producen cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de *Sertoli*. Estas células, tras experimentar la meiosis, se transforman en espermatidas, las cuáles van a inducir el proceso denominado espermiogénesis, que convierte las espermatidas en espermatozoides. La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración, sin que se produzca división celular alguna de las espermatidas a espermatozoides. Se reconocen cuatro fases características en esta transformación: la fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración. A lo largo de estas fases, se van a producir cambios morfofuncionales complejos en las espermatidas que llevarán a la formación de los espermatozoides. Entre estas transformaciones destacan el desarrollo del acrosoma y del flagelo, elongación del núcleo, condensación de la cromatina y reorganización del citoplasma y de los orgánulos celulares (*Pinart et al., 2001*).

En la **fase de Golgi**, las vesículas proacrosómicas de dicha organela se fusionan y se acercan al núcleo para convertirse en la vesícula acrosomal localizada en la parte apical del núcleo.

En la **fase de capuchón**, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (Fase G₀ del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina, distinto a otras células eucarióticas en las que la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina.

En la **fase acrosomal**, la espermátida gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal, se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva.

Finalmente, se produce la **fase de maduración**, donde se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma, y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal. En la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermatozoides son transportados de la *rete testis* a los conductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan.

2.1.2 Composición de la membrana plasmática

La membrana de la célula espermática, como la de cualquier otra célula eucariota, posee la estructura de mosaico fluido formada por una doble capa lipídica en la que se encuentran proteínas de superficie unidas a éstos por interacciones no covalentes y proteínas que se encuentran integradas dentro de la bicapa (*Figura 2-4*). La membrana celular es una estructura dinámica y fluida donde la mayoría de sus moléculas son capaces de moverse en el plano de la membrana.

No obstante, la membrana plasmática del espermatozoide va a diferir de la membrana plasmática de las células somáticas, tanto en su composición como en sus características biofísicas.

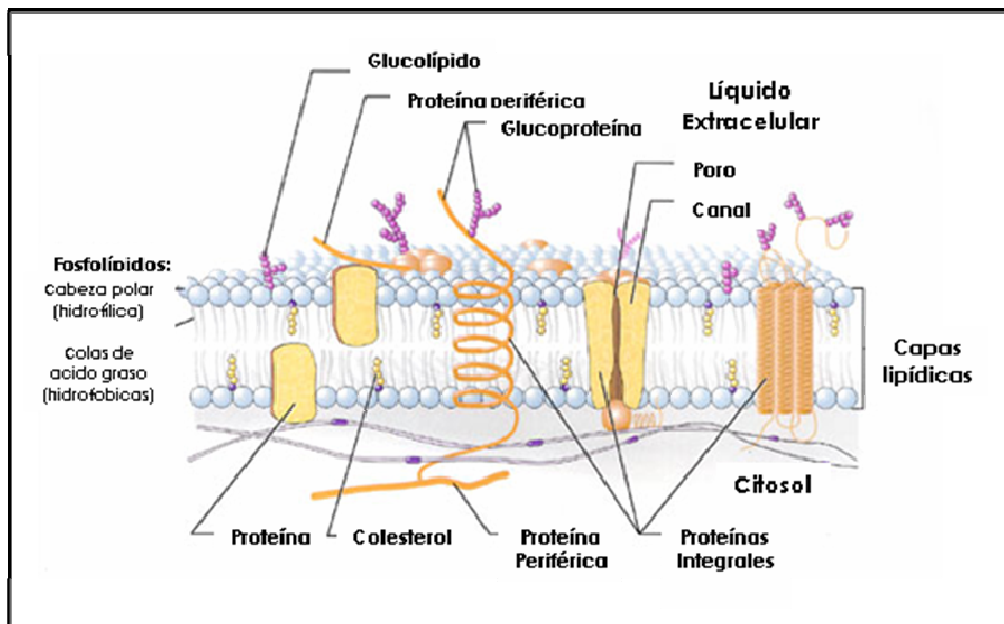


Figura 2-4. Modelo general de la estructura de la membrana plasmática.

Un hecho característico de la célula espermática es la subdivisión de su membrana plasmática en regiones, denominadas habitualmente como “dominios”, que difieren tanto en composición como en estructura, presentando cada dominio una función específica a lo largo de la vida celular. Así por ejemplo, estos dominios van a garantizar la rigidez de la membrana necesaria para evitar capacitaciones prematuras. Existen evidencias de que las mismas proteínas de la membrana contribuyen al empaquetamiento de los lípidos (Orgebin-Crist *et al.*, 1984), pero los dominios también pueden ser formados por los propios lípidos de la membrana jugando el colesterol un papel muy importante en este hecho. Pequeños cambios en la fluidez de la membrana por la pérdida o eliminación del colesterol, pueden forzar a la membrana a reorganizarse de manera tal que los dominios pueden alterarse (Schroeder *et al.*, 1991). La mayoría de los dominios de la superficie espermática se establecen durante la espermiogénesis y posteriormente muchos de ellos serán remodelados durante la maduración epididimaria.

2.1.2.1 Glicocálix

La superficie de los espermatozoides de mamífero se encuentra cubierta por una serie de moléculas ricas en carbohidratos denominada glicocálix. La mayoría de los residuos azucarados están unidos a proteínas las cuales están

integradas dentro de la membrana plasmática o asociadas libremente con ésta. La determinación de la composición del glicocálix se ha realizado utilizando lectinas específicas, las cuales se unen a diferentes tipos de cadenas laterales de los azúcares (Cummings, 1994). Se estima que hay cientos de glicoproteínas formando el glicocálix, algunas de las cuales son sintetizadas en el testículo. Otras, sin embargo, son producidas por el epitelio de los conductos eferentes, por el epidídimo y posiblemente otras por las glándulas accesorias asociándose al espermatozoide a través del tránsito de éste por los distintos conductos y su almacenamiento posterior. La presencia del glicocálix está relacionada con la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide.

A pesar de que su estructura molecular es bien conocida, su papel funcional todavía permanece oscuro. No obstante parece estar relacionado con la maduración espermática y la inmunoprotección en el tracto genital femenino así como con la unión espermatozoide zona pelúcida (ZP) y la fecundación (Schröter et al., 1999).

2.1.2.2 Lípidos

La composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide maduro de mamífero es marcadamente diferente a la de las células somáticas y, aunque existen diferencias considerables en la variedad de los lípidos de membrana entre los espermatozoides de las especies domésticas, en general la membrana plasmática contiene aproximadamente un 70% de fosfolípidos, un 25% de lípidos neutros y un 5% de glicolípidos (Gadella y Harrison, 2000).

2.1.2.2.1 Fosfolípidos

Los principales componentes fosfolipídicos de la membrana del espermatozoide son la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y la esfingomiélin (SM). La fosfatidilserina (PS), el fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico, el fosfatidilglicerol y los lisofosfolípidos se encuentran en

proporciones significativamente menores. Así, se ha observado en eyaculados de alta calidad que la PC está presente en mayor proporción y la SM en menor, disminuyendo y aumentando respectivamente, cuando la calidad del semen es menor (*De Alba et al., 1996*).

Durante muchos años se creyó que la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática de los espermatozoides se realizaba al azar. Sin embargo, posteriormente se descubrió que estos fosfolípidos estaban distribuidos de forma asimétrica, en donde la SM y la PC se presentaban esencialmente en la capa externa de la membrana y la PE y PS en la capa interna de la membrana plasmática del espermatozoide (*Müller et al., 1994; Nolan et al., 1995; Gadella et al., 1999*).

Aunque la mayoría de los trabajos sobre la asimetría de fosfolípidos han sido referidos a células somáticas, estudios recientes han mostrado que los fosfolípidos de membrana plasmática del espermatozoide muestran también esta misma característica, como en el caso de espermatozoides de carnero (*Müller et al., 1994*), toro (*Nolan et al., 1995*) y cerdo (*Gadella et al., 1999*).

Estudios posteriores han demostrado que esta distribución era mantenida por la actividad combinada de varias enzimas fosfolípidotransferasas (*Bevers et al., 1998*), entre las que se encuentran aminofosfolípidotransferasas (flipasas), que "mueven" PS y PE desde la capa externa a la interna, fosfolipasastransferasas no específicas (flopasas) que transfieren fosfolípidos desde la interna a la externa y enzimas transportadoras bidireccionales (escramblasas) que mueven todos los fosfolípidos en ambas direcciones a través de la bicapa lipídica.

2.1.2.2.2 Lípidos rafts

Durante mucho tiempo se postuló que los lípidos de la membrana plasmática sólo tenían una función pasiva, limitándose a la estructura de la misma. En los últimos años, un nuevo modelo de membrana sugiere la presencia de estructuras con funciones específicas, ricas en glicoesfingolípidos,

colesterol y proteínas. Estas moléculas se asocian en la membrana plasmática formando microdominios conocidos como lípidos *rafts*, insolubles en detergentes no iónicos y ricos en fosfolípidos saturados, colesterol, glicoesfingolípidos y esfingomielina (Brown y London, 2000; Simons y Vaz, 2004). Parece ser que estos lípidos facilitan la activación de señales y regulan el movimiento en la membrana (Simons y Toomre, 2000). De esta forma, a través de estos microdominios anclados en la membrana se produce la transducción de señales hacia el interior de la célula promoviendo el incremento de segundos mensajeros y en consecuencia la activación y la respuesta celular (Alonso y Millán, 2001).

2.1.2.2.3 Lípidos neutros

La variación, en cuanto a la composición de los lípidos neutros en la membrana plasmática de los espermatozoides, puede ser encontrada entre especies, entre machos de la misma especie e incluso entre distintos eyaculados de un mismo macho. El mayor factor de variabilidad lo encontramos en el colesterol (C) de la membrana. Así por ejemplo, los valores de colesterol en los espermatozoides de la especie humana suponen un 40% del total de los lípidos de la membrana, mientras que en otras especies como la porcina, suponen aproximadamente el 24% (Cerolini et al., 2001).

El contenido en esteroides de las células espermáticas parece estar relacionado con la capacitación (De Lamirande et al., 1997). De hecho, se ha demostrado que el colesterol es eliminado de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de capacitación. *In vivo*, la eliminación del colesterol de las membranas, es debida a la presencia de diferentes moléculas que se encuentran en los fluidos biológicos y que van a actuar como aceptores de colesterol. Estas moléculas pueden ser de distinta naturaleza y entre ellas encontramos lipoproteínas, albúmina, lecitina, etc. La relación colesterol/fosfolípidos (C/PL) es de gran importancia para la estabilidad de la membrana espermática (Parks y Hammerstedt, 1985) y de hecho un aumento en la proporción de los fosfolípidos o una disminución de colesterol causan desestabilización de la membrana y aumentan su

permeabilidad (Yeagle *et al.*, 1985). El valor de C/PL es específico de la membrana plasmática de los espermatozoides de las diferentes especies. Así por ejemplo en espermatozoides de verraco, este valor es de 0.2 siendo considerablemente más bajo que el de otras especies incluso antes de que tenga lugar el proceso de capacitación (Parks y Lynch, 1992). En otras especies como por ejemplo en la especie bovina o en la especie humana, estos valores son de 0.4 y 0.99 respectivamente (Parks *et al.*, 1987; Darin-Bennett y White, 1977).

Junto al colesterol, tenemos otra serie de esteroides que también forman parte de la membrana tales como el desmoterol, el colesterol sulfato y el colesteril éster.

2.1.2.3 Proteínas

A pesar de que la estructura básica de las membranas biológicas viene determinada por la bicapa lipídica, la mayoría de las funciones específicas son llevadas a cabo por las proteínas.

La superficie en mosaico que presenta el espermatozoide es reflejo de la distribución más o menos localizada de las diferentes proteínas. Así por ejemplo, las proteínas que forman los canales de Ca^{2+} se encuentran localizadas en determinadas regiones de la membrana plasmática regulando la concentración del Ca^{2+} intracelular requerido para varias funciones espermáticas. La proteína transmembrana *CatSper1* participa en la regulación de la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide y se encuentra localizada en la membrana del flagelo (Carlson *et al.*, 2003). La alteración del gen para *Catsper1* produce infertilidad en el macho debido a un fallo del espermatozoide para presentar la hipermotilidad (Carlson *et al.*, 2003). Otra proteína, la *CatSper2* también se localiza en la membrana plasmática del flagelo y la alteración del gen para *CatSper2* también produce alteración en la hipermotilidad (Quill *et al.*, 2003) Estos resultados sugieren que una interacción directa o indirecta entre estas dos proteínas se requiere para expresar la hipermotilidad (Figura 2-5).

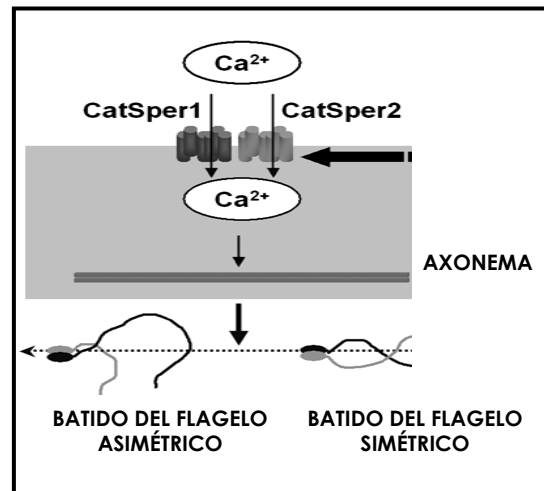


Figura 2-5. Modelo hipotético para el inicio de la hiperactivación de la motilidad en el espermatozoide, a través de la entrada de Ca^{2+} por la proteínas CatSper (Quill et al., 2003).

Otro grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo del Ca^{2+} dependientes de voltaje, se encuentran localizadas en la membrana de la pieza principal del flagelo ($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.3$), en el acrosoma ($\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v2.2$) y en la región postacrosomal ($\text{Ca}_v2.3$) de espermatozoides de ratón (Darszon et al., 2006). Una alteración del gen para $\text{Ca}_v2.3$, se traduce en un aumento de la velocidad rectilínea así como de los parámetros de linealidad (Sakata et al., 2002).

Otra proteína de la membrana plasmática es la PCMA4 (Ca^{2+} -ATPasa), pertenece a la familia de proteínas que eliminan Ca^{2+} del citosol a través de la membrana y se encuentra localizada sobre todo en la pieza principal. Si ocurre una alteración en el gen que codifica a esta proteína se produce un incremento de los niveles de Ca^{2+} en el espermatozoide e infertilidad masculina por deterioro en la motilidad espermática (Okunade et al., 2004).

2.1.2.3.1 Glicoproteínas

Las glicoproteínas van a desempeñar un papel importante en la funcionalidad espermática como transportadoras de iones y en la activación de receptores.

Al menos existen tres tipos de interacción entre las glicoproteínas con la membrana plasmática. Algunas de estas glicoproteínas son producidas en el testículo y han definido dominios transmembrana con la región glicosilada sobre la superficie celular externa. Éstas incluirían las típicas proteínas receptoras de hormonas. Aunque la mayoría de estas proteínas están desde el origen del espermatozoide, no se debería excluir que incluso esta clase de proteínas podrían ser transferidas al mismo tras el desarrollo testicular desde las células del tracto genital (*Aumuller et al., 1997*). Un segundo grupo de glicoproteínas puede ser producido después de la espermiogénesis incluso dentro del testículo (por ejemplo, por las células de *Sertoli* o por las células epiteliales de la *rete testis*) o bien durante la maduración en el epidídimo. Tales glicoproteínas podrían experimentar interacciones polares con residuos integrales de la membrana plasmática, en la forma interacción proteína-proteína o interacción proteína-azúcar. Algunas de estas interacciones podrían ser específicas y de alta afinidad, otras de baja afinidad, siendo posteriormente liberadas de la superficie espermática, por ejemplo, durante la capacitación. Las espermadhesinas también podrían ser incluídas en esta categoría (*Töpfer-Petersen, 1999*). Un tercer grupo parece experimentar una integración secundaria en la membrana plasmática. La mejor descripción de éstas son aquellas ancladas con una estructura de glicosilfosfatidilinositol (GPI) como son la CD52 y CD59 (*Schröter et al., 1999*).

2.2. El epidídimo

2.2.1 Estructura

El epidídimo es parte de la anatomía de todos los vertebrados en los cuales la reproducción implica la fecundación interna (*Jones, 1998*). Este órgano presenta una estructura tubular alargada, con múltiples flexiones, cuya función es recibir los espermatozoides producidos en el testículo, con el fin de almacenarlos y de permitir su maduración.

El epidídimo forma un conducto único pero extraordinariamente plegado, de tal manera que su enorme longitud (3-12 m dependiendo de la especie) ocupa muy poco espacio y conecta el testículo con las vías seminales inferiores. Así, el epidídimo es al principio vía de paso de los espermatozoides que salen del testículo y su parte final se convierte en la principal zona de almacenamiento y maduración de los espermatozoides.

Desde hace mucho tiempo se vienen conociendo las diferencias estructurales entre los epidídimos de las distintas especies (Hamilton, 1975), aunque generalmente se pueden distinguir tres áreas anatómicamente diferenciadas: una cabeza o *caput*, que recibe a los espermatozoides y fluidos de los vasos eferentes testiculares, un cuerpo (*corpus* o *istmo*), más estrecho y una cola (*cauda*), que se encarga de almacenar los espermatozoides hasta la eyaculación y donde éstos adquieren su capacidad fecundante (Yanagimachi, 1994; Figura 2-7). Los conductos eferentes, que conectan los túbulos testiculares con el epidídimo, participan en procesos de resorción y secreción de material al medio luminal. El segmento medio del epidídimo, representado en gran parte por la cabeza y la cola, interviene directamente en la maduración del espermatozoide. El segmento terminal, que comprende la cola más el túbulo deferente proximal, se encarga del almacenamiento de los espermatozoides (Figura 2-6).

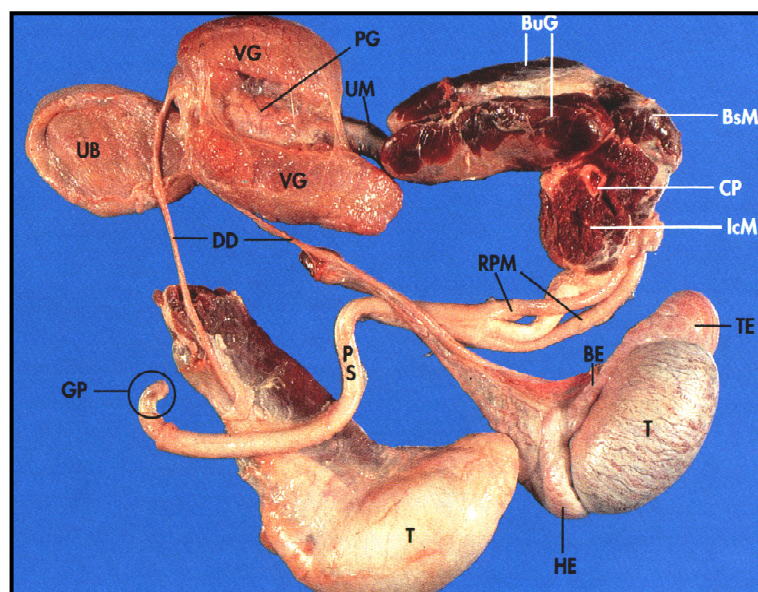


Figura 2-6. Aparato genital del cerdo. **T.** Testículo. **TE.** cabeza del epidídimo. **BE.** cuerpo. **TE.** cola del epidídimo. (Senger, 1999).

Todo el fluido que llega al epidídimo procedente de los testículos, sufre reabsorción en los conductos eferentes y en la parte inicial de la cabeza. Así se origina un aumento de la concentración espermática en la suspensión luminal. Las células epididimarias secretan compuestos específicos y enzimas hacia el fluido luminal que provocan modificaciones en la membrana plasmática, así como en sus funciones, haciendo que se conviertan en células móviles y fértiles.

2.2.2 Funciones

El epidídimo de los mamíferos en líneas generales cumple funciones de transporte, concentración, maduración y almacenamiento espermático, además de un papel protector, siendo lugar de síntesis y secreción de enzimas antioxidantes (*Tramer et al., 1998*). Entre estas funciones destacan las siguientes:

2.2.2.1 Protección

La presencia durante la maduración epididimaria de distintos antígenos que se van a ir añadiendo a la membrana de los espermatozoides, podría desencadenar una respuesta antigénica, ya que pueden no ser reconocidos como propios por el sistema inmunitario (*Pollanen et al., 1994*). Sin embargo, existen varios factores que van a impedir que los espermatozoides sean atacados por una respuesta inmune del propio organismo. Entre ellos, destaca por ejemplo la barrera hemato-epididimaria que va a proteger a los espermatozoides de una posible respuesta inmune por parte de macrófagos (*Turner, 1991; Yap et al., 1998*). También se han encontrado distintas moléculas como por ejemplo la lactoferrina, que es secretada por el epidídimo en la mayor parte de las especies estudiadas y a la que se han asignado propiedades anti-bacterianas, antimicóticas y antivíricas (*Fouchecourt et al., 2000; Dacheux et al., 2003*).

La concentración espermática durante el tránsito a través del epidídimo está próxima a 10^{10} células/ ml. Este hecho unido al aumento del metabolismo, al movimiento de los espermatozoides y a la elevada cantidad de ácidos

grasos poliinsaturados en la membrana espermática, va a propiciar la existencia de un ambiente oxidativo haciendo a los espermatozoides susceptibles de sufrir "estrés oxidativo" por parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en el fluido epididimario. Existen distintas sustancias antioxidantes sintetizadas por las células epiteliales del epidídimo, que van a proteger a los espermatozoides de los posibles daños provocados por el estrés oxidativo (Kirchhoff, 1999), entre las que destacan la glutatión-peroxidasa y la superóxido-dismutasa (Sanocka y Kurpisz, 2004).

2.2.2.2 Transporte

En la mayoría de las especies el tiempo medio de tránsito de los espermatozoides en el epidídimo varía de una a diez semanas, siendo variable entre especies y pudiéndose reducir entre 10 y el 20 % cuando la frecuencia de eyaculación de los animales aumenta (Garner y Hafez, 1989; Setchell, 1991). En el cerdo, el transporte de los espermatozoides por el epidídimo dura aproximadamente 10 días (3 días en atravesar la cabeza del epidídimo, 2 días en atravesar el cuerpo), pudiendo permanecer de 4 a 7 días almacenados en la cola del epidídimo antes de ser eyaculados (Geisert, 1999). El transporte es llevado a cabo mediante las contracciones peristálticas de la musculatura lisa (Amann, 1989; Cooper, 1998), que van a provocar la agitación del ambiente luminal favoreciendo la rápida absorción de distintos metabolitos por el epitelio epididimario (Robaire y Hermo, 1988). La velocidad de transporte de los espermatozoides varía en las diferentes porciones del epidídimo, debido a la mayor o menor viscosidad del fluido epididimario (Turner et al., 1990).

2.2.2.3 Maduración

Los espermatozoides procedentes de los testículos, aunque ya son células altamente especializadas, no son todavía capaces de fecundar y aún deben experimentar una serie de modificaciones que tendrán lugar durante su migración a través del epidídimo, de manera que éstos adquieren una motilidad progresiva así como la capacidad de interaccionar con el gameto femenino para poder fecundarlo (Yanagimachi, 1988). Durante este proceso,

el gameto masculino sufrirá modificaciones bioquímicas moduladas por la composición intraluminal del epidídimo. A este conjunto de modificaciones se le conoce con el nombre de maduración epididimaria (Figura 2-7).

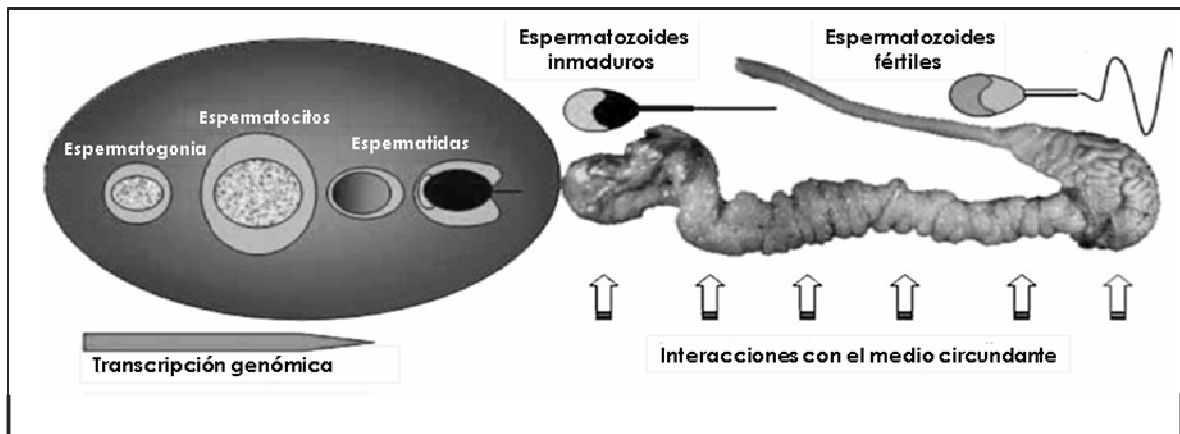


Figura 2-7. Representación esquemática del proceso de formación y maduración espermática en su paso por el testículo y epidídimo (Dacheux et al., 2005).

El proceso de maduración epididimaria va a implicar importantes cambios morfológicos y funcionales en el espermatozoide. En este sentido, cabe destacar que los cambios van a implicar la modificación de sus membranas celulares con remodelación bioquímica de las proteínas, glicoproteínas y lípidos de la membrana espermática (Jones, 1998), migración de la gota citoplasmática (Calvin y Bedford, 1971; Crabo y Hunter, 1975) y cambios en el patrón de movimiento (Briz et al., 1995).

Todos estos cambios producidos en el espermatozoide durante la maduración en el epidídimo se atribuyen a interacciones secuenciales de los mismos con las secreciones específicas del epitelio epididimario en las distintas regiones de este conducto (Cooper et al., 1990; Sun et al., 2000).

Las modificaciones más importantes que se producen en el espermatozoide como consecuencia de la maduración epididimaria son las siguientes:

2.2.2.3.1 Modificación de la membrana espermática

Durante la maduración epididimaria, los lípidos de la membrana del espermatozoide experimentan distintas alteraciones físico-químicas (Wolf *et al.*, 1988) y con ello se producen cambios en el patrón de distribución de las proteínas (Suzuki, 1990). Además, se altera la distribución de antígenos de la membrana acrosomal externa (Phillips *et al.*, 1991), lo que podría preparar al espermatozoide para la posterior fusión entre esta membrana y la membrana plasmática durante la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994). En el tránsito epididimario, los espermatozoides adquieren nuevas proteínas sintetizadas por las células epiteliales del epidídimo que van a ser insertadas en la membrana plasmática del espermatozoide en dominios específicos de la misma y se van a perder o se van a redistribuir proteínas testiculares presentes en la membrana del epidídimo (Blobel *et al.*, 1990; Gatti *et al.*, 1999). Es decir, estos cambios van a incluir la adición de nuevas proteínas sintetizadas por las células epiteliales del epidídimo y la pérdida, proteólisis o redistribución de proteínas testiculares presentes en la membrana espermática (Blobel *et al.*, 1990).

El epidídimo posee una elevada síntesis de colesterol que será transferido a la membrana plasmática del espermatozoide (Suzuki, 1990), por lo que se sugiere que esta molécula puede ser de importancia durante el proceso madurativo (Parks y Hammerstedt, 1985). Esta transferencia de colesterol hacia la membrana podría estar implicada en la estabilidad que necesita el espermatozoide durante su transporte a través del tracto genital femenino hasta alcanzar el ovocito (Yanagimachi, 1994). Asimismo y como consecuencia de todas las modificaciones de la membrana plasmática del espermatozoide, éstos adquieren la capacidad de unirse y reconocer al ovocito (Kumar *et al.*, 1991; Cooper, 1996).

2.2.2.3.2 Adquisición y desarrollo de la motilidad

Uno de los principales cambios que experimenta el espermatozoide es el desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo, ya que al abandonar el testículo los espermatozoides presentan una movilidad nula o muy débil,

debido, en parte, a una falta de maduración de su membrana plasmática (*Yanagimachi, 1994*).

Los espermatozoides van a experimentar importantes modificaciones bioquímicas y morfológicas durante su tránsito a través del conducto epididimario. Una de estas modificaciones es la variación de los parámetros de motilidad, lo que es de importancia en el proceso de maduración, dependiendo de un aporte constante de andrógenos (*Brooks, 1983*).

El hecho de que una vez que los espermatozoides abandonan el testículo presenten una motilidad muy baja es debido sobre todo, a una falta de maduración de su membrana plasmática (*Yanagimachi, 1994*). Los cambios en la composición intracelular del espermatozoide parecen ser directamente responsables del incremento de la motilidad, estando el epidídimo directamente implicado en promover estos cambios por medio del aporte o eliminación de distintas sustancias que actúan directamente sobre el flagelo (*Brokaw, 1987*).

En su origen, los espermatozoides son incapaces de moverse y por tanto en los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo, el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo y por las contracciones peristálticas de la musculatura lisa de estas estructuras junto con la presión hidrostática interna (*Jonson y Everitt, 1980; Chenoweth, 1997*).

La adquisición de la motilidad es uno de los cambios más importantes que se producen en la maduración espermática, lo que determina la obtención de espermatozoides con un patrón de motilidad lineal y progresivo (*Goyal y Williams, 1991; Yeung et al., 1993*). Esta capacidad de presentar una motilidad hiperactivada en las proximidades del ovocito debe desarrollarse durante el tránsito epididimal (*Overstreet, 1974*).

Se ha observado que los espermatozoides pasan de ser inmóviles a experimentar un movimiento circular no progresivo en las regiones más próximas del epidídimo, para transformarse en un movimiento lineal y

progresivo en regiones más distales del mismo (*Blandau y Rumery, 1964; Hinton et al., 1979*). El porcentaje máximo de espermatozoide mótiles se consigue en la cabeza del epidídimo en roedores (*Yeung et al., 1992*), y más distalmente en el verraco (*Chevrier y Dacheux, 1992*).

2.2.2.3.3 Migración de la gota citoplasmática

Una vez que los espermatozoides son separados de las células de *Sertoli*, presentan una cantidad de citoplasma residual de las espermátidas retenida por las células de *Sertoli* y otra porción que se queda unida al espermatozoide y forma la gota citoplasmática (*Chenoweth, 1997*).

La presencia de una elevada proporción de espermatozoides con gotas citoplasmáticas en el eyaculado se asocia comúnmente con alteraciones en la maduración epididimaria y con una capacidad fecundante baja (*Gómez et al., 1996; Keating et al., 1997*).

Gadella y Van Gestel (2004) establecieron que solamente aquellos espermatozoides que han concluido fisiológicamente la maduración en el epidídimo, son sensibles al efecto del HCO_3^- , mientras que aquellos espermatozoides no maduros que contienen gotas citoplasmáticas, no pueden responder a este desafío fisiológico.

Durante la maduración epididimaria la gota citoplasmática va a migrar desde la pieza de conexión al anillo de *Jensen (Bedford, 1975)* y concretamente en la especie porcina esta migración de la gota citoplasmática tiene lugar durante el tránsito por el cuerpo del epidídimo (*Harayama y Kato, 1992*) y va a ser liberada durante la eyaculación (*Kato et al., 1996*).

2.3. El plasma seminal

El plasma seminal se puede definir como el fluido en el cual se encuentran suspendidos los espermatozoides de las especies mamíferas. Es una mezcla compleja de secreciones procedentes de los testículos, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales).

El componente principal del plasma seminal es el agua en la que se encuentran abundantes concentraciones de distintos aminoácidos, ácidos grasos, iones inorgánicos, ácido cítrico, azúcares, sales orgánicas, prostaglandinas y proteínas que serán las que influirán definitivamente en la funcionalidad espermática y en la fertilidad (*Lavon y Bournsell, 1971*), así como distintas enzimas, hormonas y factores de crecimiento (*Shivaji et al., 1990*).

El plasma seminal contiene además factores que van a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide y ejercen efectos importantes sobre la fisiología reproductiva femenina (*Shivaji et al., 1990; Yanagimachi, 1994*), provocando por ejemplo, un incremento de las contracciones uterinas (*Jonson et al., 2000*).

Una de las funciones que tiene el plasma seminal es la de nutrir a los espermatozoides durante el recorrido por el tracto genital de la hembra mediante la presencia de azúcares altamente asimilables como la fructosa, que es el principal componente glucídico del plasma seminal en la especie porcina, aunque también encontramos otros azúcares como la glucosa y el sorbitol (*Setchell et al., 1994; Garner y Hafez, 1996*).

Sin embargo, limitar el papel del plasma seminal a un líquido meramente nutritivo y de transporte es algo simplista y también se le atribuyen funciones de protección, regulación de la motilidad y capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos (*Johnson et al., 2000*).

El plasma seminal va a contener tanto factores que van a prevenir reacciones acrosómicas espontáneas o prematuras (*factores decapacitantes*) como otros factores que van a propiciar la fertilización de los espermatozoides (Thérien *et al.*, 1995). Estudios recientes sugieren que la acción concertada de los factores seminales reguladores del plasma, modulan el estado de capacitación de los espermatozoides de las especies mamíferos. Los efectos biológicos de estos factores del plasma en la funcionalidad espermática, no están hoy en día del todo claros debido en parte a la alta variabilidad en la composición del plasma seminal entre especies, entre machos dentro de la misma especie y entre eyaculados de un mismo macho (Killian *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2000).

2.3.1. Componentes de la secreción de glándulas sexuales accesorias

El sistema reproductivo del verraco está formado por una serie de estructuras que incluyen los testículos y las glándulas sexuales accesorias (Flowers, 2004), éstas son responsables de aportar la mayoría del volumen del semen y se sitúan adyacentes a la uretra pélvica. Son tres: vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo-uretrales o de Cowper (Hafez, 1993).

Las vesículas seminales son las responsables de aportar la mayoría del volumen del semen. Además, secretan grandes cantidades de fructosa y de ácido cítrico así como inositol, ergotionina, varios aminoácidos y glicerilfosforilcolina. La mayoría de estos compuestos son utilizados como sustratos de energía por los espermatozoides del eyaculado (Garner y Hafez, 1993). La próstata produce secreciones alcalinas cuya función principal es la de neutralizar las secreciones vaginales ácidas (Setchell *et al.*, 1994). Por último las glándulas bulbo-uretrales secretan la fracción de gel o tapioca característica del eyaculado del verraco.

El contenido de estas glándulas es específico de cada especie y muy variable incluso entre individuos de la misma especie o entre eyaculados del mismo animal. Entre las causas más importantes de esta variación, aparecen diversos procesos patológicos, la estación del año, el estado fisiológico del

animal o las variaciones de temperatura (Pérez-Pé et al., 2001; Cardozo et al., 2006; Colenbrander y Kemp, 1990).

Entre los compuestos secretados encontramos distintos iones como por ejemplo, el Zn^{2+} que tiene propiedades antibacterianas (Strzezek et al., 1987) y que en el caso del plasma seminal de verraco alcanza concentraciones muy altas (0.3-0.7 nM) (Arver et al., 1980); y el Ca^{2+} , que participa en los procesos de capacitación espermática y reacción acrosómica (Visconti et al., 2002). También vamos a encontrar distintos sustratos energéticos para el metabolismo de la célula, como fructosa, inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico (Frei et al., 1990), aminoácidos (ácido glutámico, carnitina, taurina, hipotaurina) que servirán como fuente de energía y de protección contra sustancias oxígeno reactivas y distintas enzimas (proteasas, acrosina, nucleasas, fosfatasa ácida y alcalina y superóxido dismutasa) que intervendrán en la licuefacción seminal, penetración del ovocito por parte del espermatozoide, digestión de espermatozoides muertos y dañados, y protección contra sustancias oxígeno reactivas (Strzezek et al., 2002).

2.3.2 Proteínas del plasma seminal

De todas las sustancias presentes en el plasma seminal, son las proteínas secretadas en más de un 80% por las vesicales seminales (Lavon y Bournsell, 1971), las que contribuyen de forma más relevante a la regulación de la mayor parte de las funciones espermáticas. Las principales proteínas del plasma seminal en ungulados pertenecen a tres familias: proteínas que contienen el dominio fibronectina tipo II (Fn-II), la familia de las espermadhesinas y las proteínas ricas en cisteína (Töpfer-Petersen et al., 2005).

Las proteínas Fn-II han sido descritas en el plasma seminal de muchas especies domésticas, siendo más abundantes en el plasma seminal vacuno, donde comúnmente se las denomina BSP (Manjunath y Sairam, 1987). Además, han sido descritas en otras especies como en el cerdo (denominadas pB1) donde parecen ser un componente menor en el plasma seminal del verraco (Calvete et al., 1997).

Diversos estudios han demostrado que la interacción de las proteínas Fn-II con los espermatozoides es mediada por su afinidad con fosfolípidos específicos tales como la PC (Desnoyers y Manjunath, 1992). También tienen afinidad por lipoproteínas de alta densidad como HDL (Manjunath et al., 1988; 1989), glucosaminoglicanos tales como la heparina, heparán sulfato y el condroitín sulfato (Chandonnet et al., 1990, Therien et al., 2005) presentes en el oviducto de la hembra. La interacción de estas proteínas con la membrana plasmática del espermatozoide podría estimular la salida de fosfolípidos y de colesterol de la membrana, lo que parece ser un paso importante en el proceso de capacitación (Therien et al., 1998).

El segundo tipo de proteínas presentes en el plasma seminal del verraco, son las espermadhesinas. En el cerdo, representan cerca de 75% del contenido proteínico total del plasma seminal, y su concentración puede oscilar entre 0.6 a 7 mg/ml (Dostalova et al., 1994). Dentro de esta familia de proteínas, encontramos cinco miembros (AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I, y PSP-II). Distintos estudios han mostrado que varios miembros de la familia de las espermadhesinas presentan afinidad por glicoproteínas de la zona pelúcida, por fosfolípidos y por glicosaminoglicanos sulfatados (Töpfer-Petersen et al., 1998), sugiriendo que pueden estar implicados en diversos pasos del proceso de fecundación. Las espermadhesinas presentan la característica de unirse a la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide durante la eyaculación estabilizándola (Sanz et al., 1992; Töpfer-Petersen et al., 1998), pero cuando son expuestas a lipoproteínas de alta densidad y glicosaminoglicanos como la heparina inducen la capacitación (Therien et al., 1997; Manjunath y Therien, 2002). Una función similar se les ha otorgado a las proteínas BSP del plasma seminal bovino (Lusignan et al., 2006).

Dentro de las espermadhesinas, las AQN-1, AQN-3, y el AWN, también llamadas HBPs (*Heparin Binding Proteins*), son proteínas que presentan afinidad por la heparina y parece que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide en la vesícula acrosomal (Sanz et al., 1993; Dostalova et al., 1994). El otro grupo de espermadhesinas son las *Porcine Seminal Plasma Proteins* (PSPs: PSP-I y PSP-II), que son las proteínas principales del plasma

seminal del verraco, suponiendo más del 50% de las proteínas totales (Kwok *et al.*, 1993). Se encuentran en forma de heterodímero no presentando además esta afinidad por la heparina. Se ha evidenciado que el heterodímero PSP-I/PSP-II presenta un papel modulador exógeno de la función de los espermatozoides y de la actividad inmune uterina, contribuyendo a que los espermatozoides mantengan una alta viabilidad, motilidad y actividad mitocondrial (Centurión *et al.*, 2003).

Por último, tenemos a las proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP) que se expresan predominantemente en el tracto reproductivo masculino y están implicadas en la espermiogénesis, en la maduración posttesticular de los espermatozoides, en la capacitación, en la fusión espermatozoide-ovocito y posiblemente también en la penetración de la ZP (Udby *et al.*, 2005).

2.4. La eyaculación

Durante la eyaculación los espermatozoides, junto con el plasma seminal, pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan en el tracto genital femenino. La eyaculación es el reflejo de expulsión de los espermatozoides y el plasma seminal fuera del tracto reproductivo. El reflejo eyaculatorio es el resultado de la estimulación sensorial especialmente en el glándula, lo que causa contracciones musculares coordinadas.

En el cerdo las primeras eyaculaciones aparecen entre los 5-6 meses de edad coincidiendo con el inicio de la pubertad. De los 8 a los 12 meses de edad los machos se consideran postpuberales y a partir de esta edad se consideran ya completamente maduros (Martín, 1982).

El volumen del eyaculado en el cerdo es considerablemente mayor si se lo compara con el de otras especies domésticas y en el podemos diferenciar claramente tres fases o fracciones resultantes de las secreciones de las distintas glándulas sexuales accesorias, así como de la actividad testicular y epididimaria (Garner y Hafez, 1996):

◆ 1. Fracción preespermática: formada por las secreciones procedentes de la próstata, las vesículas seminales y de las glándulas bulbouretrales o de Cowper. Es de aspecto transparente y está constituida por plasma seminal libre o pobre en espermatozoides.

◆ 2. Fracción espermática: presenta una concentración elevada de espermatozoides procedentes de la actividad de los testículos (de 0.5×10^9 a 1×10^9 espz/ml) y de secreciones de la próstata y de las vesículas seminales y es de color blanquecino y aspecto lechoso.

◆ 3. Fracción postespermática: constituida por las secreciones de la próstata y de las glándulas de Cowper. También es de color blanquecino pero casi transparente y cuenta con pocos espermatozoides ($< 10^6$ espz/ml) pero abundantes corpúsculos gelatinosos denominados comúnmente como "tapioca" procedentes de las glándulas de Cowper, que van a formar un tapón para sellar el cérvix de la hembra, evitando en la monta natural el reflujo del eyaculado del verraco (200-300 ml, aproximadamente; Geisert, 1999).

Las glándulas accesorias producen la mayor parte del volumen del eyaculado. La proporción aproximada en que intervienen las glándulas sexuales accesorias en la formación del eyaculado del verraco son: testículos y epidídimo aportan un 2%, glándulas de Cowper entre 10-25%, vesículas seminales entre 15-20% y la próstata entre 55-70% (Flowers, 1998).

2.5 Concepto de capacitación espermática

Los espermatozoides madurados en el epidídimo y recién eyaculados no son capaces de fecundar. La capacidad fecundante la adquieren después de permanecer durante algún tiempo en el tracto genital femenino y experimentar una serie de cambios que afectan a la composición y estructura de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988). Este proceso descubierto inicialmente por Austin y Chang en 1951 por separado, se conoce tradicionalmente con el nombre de "capacitación espermática".

La capacitación espermática la podemos definir como un proceso de "prefertilización" necesario e indispensable para que los espermatozoides sean capaces de fecundar al ovocito. En la actualidad se sabe que la capacitación es un proceso de desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide con eliminación o alteración de sustancias adsorbidas en la misma, lo que va a ocasionar un incremento en el influjo de Ca^{2+} al interior del espermatozoide (Yanagimachi, 1988). Además, va a posibilitar a la célula para que pueda expresar un movimiento especial denominado "hiperactivación" (Yanagimachi, 1970) y que permite a los espermatozoides desplazarse en el fluido viscoso del oviducto. La capacitación también va a preparar al espermatozoide para experimentar la reacción acrosómica y penetrar a través de la ZP del ovocito.

2.5.1 Capacitación espermática *in vivo*

La capacitación se va a realizar secuencialmente en la población espermática (Dobrinski *et al.*, 1997) y el momento de inicio de la misma así como el tiempo requerido para completarla, va a depender del lugar de deposición del semen en el momento de la cubrición. Así por ejemplo en la especie porcina, donde la deposición del semen es uterina, la capacitación y almacenamiento espermático se producen en el istmo oviductal (Dobrinski *et al.*, 1997) y los espermatozoides van a necesitar 5 a 6 h en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978). En especies de deposición vaginal (ovino, caprino, etc.), la capacitación comienza durante el contacto de los espermatozoides con el moco cervical (Hunter *et al.*, 1982).

Dentro del tracto femenino, el oviducto va a constituir una pieza clave en todo este proceso, pues el epitelio del mismo así como sus secreciones, van a influir de manera determinante sobre los cambios que experimentarán los espermatozoides para convertirlos en células capacitadas (Hunter, 1988). En la porción ístmica del oviducto, los espermatozoides van a quedar retenidos en un reservorio espermático donde se completará el período de capacitación.

En el cerdo, unos pocos miles de espermatozoides alcanzan la región ístmica, y sólo un pequeño número llega al lugar de fecundación (Hunter, 1991), minimizando de este modo la posibilidad de fecundaciones polispermicas y asegurando un número óptimo de espermatozoides en el lugar y momento de la unión al ovocito.

2.5.2 Capacitación espermática *in vitro*

Los mecanismos que intervienen en el proceso de capacitación no son hoy en día del todo conocidos, en particular en el cerdo, ya que la mayor parte de los estudios se han realizado en otros mamíferos.

Aunque se han propuesto varias hipótesis en relación a los eventos implicados en la capacitación, los mecanismos moleculares incluidos en la misma son a día de hoy aún desconocidos. Cambios asociados con este proceso incluyen, entre otros, un incremento en los patrones de motilidad espermática, disminución del nivel de colesterol de la membrana plasmática, incrementos del pH, de los niveles de Ca^{2+} intracelular y activación de segundos mensajeros (De Lamirande et al., 1997; Purohit et al., 1999; Darszon et al., 2001). El cambio más significativo del espermatozoide tras la capacitación es la capacidad para experimentar la "reacción acrosómica" (RA).

La capacitación confiere al espermatozoide la habilidad para conseguir la hiperactivación, para interactuar con la zona pelúcida del ovocito, experimentar la reacción acrosómica e iniciar la fusión con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994).

La capacitación normalmente ocurre en el tracto genital femenino. Sin embargo, solamente ha podido ser descubierta *in vitro* y de hecho la mayor parte de la información recabada acerca de la misma ha sido mediante estudios en el laboratorio. La capacitación por lo tanto, puede ser reproducida *in vitro* en numerosas especies por la incubación de espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo o bien de espermatozoides eyaculados,

bajo una serie de condiciones en medios de cultivo definidos que van a mimetizar la composición electrolítica del fluido oviductal (FO).

Así tenemos que el empleo de medios químicamente definidos que contienen concentraciones apropiadas de electrolitos, sustratos energéticos y albúmina sérica como aceptor del colesterol de la membrana, van a servir como herramienta sumamente importante en todos los estudios de capacitación espermática. Aunque existen entre ellos muy pocas variaciones en cuanto al tipo y concentración de sus constituyentes, la mayor parte de los mismos van a presentar en su composición HCO_3^- , Ca^{2+} y albúmina sérica.

2.6 Cambios en el espermatozoide durante la capacitación

2.6.1 Cambios a nivel de la membrana plasmática

Los cambios en la distribución y la composición de los lípidos y de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides son una característica importante de la capacitación. Estos cambios conducen a un aumento en la fluidez de la membrana (*Yanagimachi, 1994*). Entre estos cambios está la eliminación del colesterol que conlleva a una disminución del *ratio* C/PL en la membrana plasmática del espermatozoide (*Davis et al., 1979*).

El colesterol de la membrana espermática está implicado en la regulación de la fluidez y de la permeabilidad de ésta (*Yeagle, 1991*), formando parte importante en la composición final de la misma. Se ha propuesto una eliminación gradual del colesterol por medio de la albúmina, la cual va a constituir un elemento de gran importancia en todos los medios de capacitación *in vitro* (*Davis et al., 1980, Langlais y Roberts 1985, Suzuki y Yanagimachi 1987, Cross 1998*). La eliminación del colesterol va a influir en los cambios de la fluidez de la membrana (*Wolf et al., 1986*) y en la redistribución de las proteínas de membrana, observadas con lectinas (*Cross y Overstreet, 1987*) y anticuerpos (*Shalgi et al., 1990; Rochwerger, 1992*) y en el movimiento lateral de las proteínas de membrana (*Benoff et al., 1993*) que ocurren durante la capacitación. Todos estos procesos van a originar la aparición de unas

áreas muy inestables, altamente fusigénicas y permeables, que se han propuesto como zonas de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa para que tenga lugar la reacción acrosómica.

La concentración del colesterol en la membrana celular del espermatozoide varía bastante entre especies. Las *ratios* Colesterol/Fosfolípidos (C/PL) para fracciones de membrana celular aisladas son de aproximadamente 0.20 en espermatozoides de verraco (*Parks y Lynch, 1992*), 0.40 en bovino (*Parks et al., 1987*), 0.43 en ovino (*Parks y Hammerstedt, 1985*) y 0.83 en humano (*Mack et al., 1986*). En otro tipo de células como por ejemplo los hematíes, la *ratio* C/PL es de 0.9.

En el modelo de *Davis et al. (1979)*, el *ratio* C/PL de la membrana celular del espermatozoide va a determinar el estado de capacitación. Un espermatozoide recién eyaculado tiene una alta proporción C/PL; y durante el proceso de capacitación este colesterol es movido de la membrana del espermatozoide a aceptores de proteína solubles. La explicación para este proceso podría indicar que una proporción inferior de C/PL disminuye la viscosidad de la membrana, relajando el ensamblaje de los fosfolípidos.

Aunque hasta ahora la mayor parte de trabajo sobre la asimetría de los fosfolípidos ha sido limitado a células somáticas, investigaciones posteriores han mostrado que en la membrana plasmática de los espermatozoides, los fosfolípidos también muestran esta característica, como por ejemplo, en el carnero (*Mollet et al., 1994*), en el toro (*Nolan et al., 1995*) y en el cerdo, (*Gadella et al., 1999*). Además, distintos estudios han revelado que los niveles fisiológicos de HCO_3^- causan una variación en la asimetría. Estas alteraciones en la arquitectura de la membrana han sido analizadas mediante técnicas de tinción con M540 (*Harrison et al., 1996*).

La cantidad de fosfolípidos no parece cambiar mucho durante la capacitación (*Yanagimachi, 1994*). Sin embargo, en algunas especies como el hámster dorado, la capacitación está asociada con un aumento en la metilación de los fosfolípidos y un incremento en los niveles de PC y de

fosfatidiletanolamina (Llanos y Meizel, 1983). También en la especie porcina se ha evidenciado un aumento en los niveles del fosfatidilinositol y de la liso-PC durante la capacitación *in vivo* (Snider y Clegg, 1975).

El análisis de los movimientos de los fosfolípidos ha conducido a deducir que la causa de la alteración de la arquitectura de la membrana plasmática del espermatozoide inducida por el HCO_3^- , es debida a un aumento de la actividad de la escramblasa (Gadella *et al.*, 2000). Este proceso es reversible, al menos a corto plazo (Harrison *et al.*, 1996) y es mediado por la acción de la proteína quinasa A (PKA) (Gadella *et al.*, 2000) y parece ser que el *scrambling* en espermatozoides es controlado vía fosforilación/desfosforilación.

En otros tipos de células, los mecanismos de control de la asimetría de los fosfolípidos aún no han sido aclarados, aunque por ejemplo en glóbulos rojos se ha visto que mediante un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, se activa la escramblasa y se inhibe la acción de la flipasa (Bever *et al.*, 1998)

Aunque algunos autores no hayan excluido la participación del Ca^{2+} en el control de asimetría de los fosfolípidos, otros investigadores han observado que la acción inducida por el HCO_3^- ocurre en ausencia completa de Ca^{2+} extracelular (Harrison y Gadella, 2005).

2.6.2 Fosforilación de la tirosina

La fosforilación de proteínas es un evento de modificación post-translacional que va a actuar como mecanismo de regulación celular, controlando varios procesos tales como el crecimiento de la célula, control del ciclo celular, ensamblaje del citoesqueleto, etc. (Hunter, 2000; Pawson, 2004). De hecho, en células eucariotas, uno de los mecanismos más comunes en la actividad de regulación es la adición y/o eliminación de los grupos fosfato de serinas, treoninas o de residuos de tirosina de distintas proteínas. La adición o eliminación de grupos fosfato puede inducir modificaciones alostéricas dando por resultado cambios conformacionales en las proteínas que conducen a su activación o inactivación.

En espermatozoides maduros se van a producir fenómenos de fosforilación/desfosforilación de proteínas en la regulación de fenómenos importantes tales como la capacitación espermática, hipermotilidad y reacción acrosómica que van a ser indispensables para que el espermatozoide pueda alcanzar, penetrar y unirse con el ovocito (*Galantino-Homer et al., 1997*).

Leyton y Saling (1989) proporcionaron la primera evidencia de la presencia de fosforilación de tirosina en espermatozoides de especies mamíferas y concretamente en el ratón. Usando anticuerpos específicos antifosfotirosina, identificaron tres proteínas de 52, 75 y 95 kDa respectivamente en espermatozoides de ratón.

Posteriormente, varios estudios han correlacionado el grado de fosforilación de la tirosina con el estado de capacitación del espermatozoide. *Visconti et al. (1995a)* examinaron la correlación existente entre el estado de capacitación espermática y la fosforilación de la tirosina en espermatozoides de ratón. Observaron un incremento tiempo-dependiente en la fosforilación de la tirosina de varias proteínas específicas en rangos moleculares de 40-120 kDa, con el estado de capacitación de los espermatozoides. Estudios posteriores demostraron que la fosforilación de la tirosina, aumenta en espermatozoides durante la capacitación en varias especies como en el toro (*Galantino-Homer et al., 1997*), gato (*Pukazhenti et al., 1998*), hámster (*Visconti et al., 1999*), cerdo (*Tardif et al., 2001*), caballo (*Pommer et al., 2003*) etc. Todos estos estudios evidencian que la fosforilación de la tirosina es un evento importante en la modulación de los cambios bioquímicos asociados a la capacitación.

En espermatozoides de verraco, la capacitación induce la fosforilación de tirosina de proteínas de la membrana plasmática, lo cual se cree que inicia el proceso de unión a la zona pelúcida e induce la reacción acrosómica (*Flesch et al., 1999*). Se ha evidenciado que en la especie porcina, la capacitación induce la fosforilación de la tirosina de 6 proteínas de la

membrana plasmática espermática cuyo peso molecular oscila entre 27 y 55 kDa (Flesch *et al.*, 1999). En estudios posteriores, fueron aisladas dos proteínas de membrana plasmática de espermatozoides capacitados de cerdo (35 kD y 46 kD) que mostraron afinidad por la zona pelúcida (Flesch *et al.*, 2001).

La fosforilación de tirosina de proteínas en el flagelo del espermatozide, ha sido relacionada con la adquisición de la hipermotilidad espermática (Mahony, 1999; Nassar, 1999), necesaria para que los espermatozoides puedan penetrar el cúmulo y la ZP del ovocito.

El incremento en la fosforilación de la tirosina durante la capacitación parece ser que está regulado por el AMPc a través de PKA en los espermatozoides de varias especies, incluyendo al ratón (Visconti *et al.*, 1995b), toro (Galantino-Homer *et al.*, 1997), caballo (Pommer *et al.*, 2003), cerdo (Kalab *et al.*, 1998), hámster (Visconti *et al.*, 1999) y hombre (Leclerc *et al.*, 1996; Osheroff *et al.*, 1999).

2.6.3 Cambios en la concentración iónica y potencial de membrana

Los cambios en la concentración intracelular de iones han sido asociados con distintos aspectos de la funcionalidad espermática como en el caso de la capacitación (Zeng *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1998) y la reacción acrosómica de espermatozoides de múltiples especies (Arnoult *et al.*, 1996 y Darszon *et al.*, 1999).

Durante el tránsito a través de los tractos reproductores masculino y femenino respectivamente, los espermatozoides son sometidos a una serie de cambios en el medio extracelular, incluyendo variaciones en la concentración iónica y en la osmolaridad. Por ejemplo, en la porción caudal del epidídimo los espermatozoides son almacenados en un ambiente donde existen elevadas concentraciones de K^+ , bajas de Na^+ y muy disminuidas en HCO_3^- (Brooks, 1983). Esas concentraciones iónicas cambian radicalmente cuando los espermatozoides se unen al plasma seminal y posteriormente tras su llegada al oviducto, donde el K^+ disminuye significativamente, y el Na^+ y el HCO_3^-

aumentan sus niveles (Setchel et al., 1994). Estos cambios en el ambiente iónico y el flujo de los iones a través de la membrana espermática, son sumamente importantes en la maduración de los espermatozoides, en la capacitación y en el inicio de la interacción con el ovocito, sugiriendo una gama de papeles diferentes en la fisiología espermática (Shi y Roldán, 1995).

Tanto *in vitro* como *in vivo*, el potencial de membrana basal está determinado por la permeabilidad relativa de la membrana plasmática espermática a los iones que van a constituir el medio de capacitación. Bajo condiciones normales, los espermatozoides mantienen una concentración de iones en el interior de la célula marcadamente diferente de la existente en el medio extracelular y esas diferencias establecen el potencial de membrana en reposo. Así por ejemplo *in vivo*, los niveles de HCO_3^- dentro del ambiente del epidídimo presentan un valor de concentración de 3-4 mM (Rodríguez-Martínez et al., 1990; Asari et al., 1996) siendo superiores a 20 mM dentro del oviducto (Mastroianni y Komins, 1975; Maas et al., 1977; Rodríguez-Martínez et al., 2001; Tienthai et al., 2004).

La composición iónica de los medios de capacitación intenta mimetizar la existente en el fluido oviductal (Yanagimachi, 1994). Estos medios presentan elevadas concentraciones de Na^+ y Cl^- , pero bajas concentraciones de K^+ ; además también contienen Ca^{2+} y HCO_3^- . En contraste con el medio extracelular, dentro del espermatozoide esas concentraciones son distintas; así por ejemplo, tenemos que hay una baja concentración de Na^+ y una elevada de K^+ . El Ca^{2+} intracelular libre en espermatozoides no capacitados es aproximadamente de 0.1M o menos, pero durante el proceso de reacción acrosómica, esta concentración se incrementa hasta valores de aproximadamente 10M (Bailey y Storey, 1994).

2.6.4 Incremento de los niveles de Ca^{2+}

De todos los mecanismos de señalización intracelular la más caracterizada y mejor estudiada es la movilización de Ca^{2+} . Esta vía consiste en aumentos transitorios de la concentración de calcio citosólico $[[\text{Ca}^{2+}]_i]$

producidos por numerosos mensajeros intercelulares. A estos cambios los denominamos "señales de calcio". Este catión tiene la propiedad de ser empleado como regulador por numerosas proteínas celulares, por lo que la señal de Ca^{2+} participa en el control de múltiples funciones celulares desde la fertilización hasta los procesos de muerte celular y *rigor mortis*, desde la secreción o contracción hasta la diferenciación y replicación celular o el metabolismo.

Las señales de Ca^{2+} citosólico pueden controlar varios procesos fisiológicos tanto en células excitables como en no excitables. Estas señales se producen por la apertura de canales permeables al Ca^{2+} en la membrana plasmática y en la membrana de organelas intracelulares que contienen altas concentraciones de Ca^{2+} . Los canales permeables de Ca^{2+} pueden catalizar el flujo de millones de iones a través de la bicapa lipídica de la membrana espermática y además un pequeño número de estos canales pueden causar cambios significativos en células tales como los espermatozoides en cuestión de milisegundos.

El papel del ión Ca^{2+} en el inicio y/o regulación de la capacitación es ciertamente controvertido a día de hoy. En espermatozoides de ratón, hay evidencias de que el Ca^{2+} extracelular es requerido para la capacitación (*Dasgupta et al., 1993; Visconti et al., 1995a*). Incrementos en los niveles de la concentración intracelular de Ca^{2+} son descritos por algunos investigadores, mientras que otros por el contrario, indican lo contrario (*Yanagimachi, 1994*). Esta controversia podría estar originada por el hecho de que en la reacción acrosómica sí está demostrada la acción del Ca^{2+} en el espermatozoide y por la dificultad inherente a poder distinguir estos dos procesos (capacitación y reacción acrosómica).

La acción del Ca^{2+} sobre distintas enzimas efectoras involucradas en la señal de transducción espermática (adenilato ciclasa, fosfodiesterasas nucleótido cíclicas) sugieren que este catión va a jugar un papel importante en la capacitación (*Dragileva et al., 1999; Ho y Suarez, 2001*). En 1915, Loeb fue el primero en demostrar que se requiere Ca^{2+} del medio extracelular para la

fertilización en invertebrados. Una exigencia similar se ha encontrado para espermatozoides de ratón (*Iwamatsu y Chang, 1971*). Desde entonces, muchos autores han mostrado la importancia del Ca^{2+} en la funcionalidad espermática (*Handrow et al., 1989; DasGupta et al., 1993; Fraser et al., 1995*) y en la fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas (*Visconti et al., 1995a*).

Una de las consecuencias más importante de la salida de colesterol de las membranas, es una masiva entrada de Ca^{2+} extracelular que se considera requisito indispensable para que el proceso de reacción acrosómica tenga lugar (*Flesch y Gadella, 2000*). Esta entrada de Ca^{2+} puede ser consecuencia de los cambios que ocurren en la fluidez de la membrana, que la van a hacer más permeable al Ca^{2+} .

Esta modificación en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} durante la capacitación y el aumento en la concentración del mismo, ha sido demostrado en varias especies de mamíferos (*White y Aitken, 1989; Zhou et al., 1990; Coronel y Lardy, 1992*) incluyendo la especie humana (*DasGupta et al., 1993*). La presencia de Ca^{2+} extracelular es necesaria para que los espermatozoides se capaciten y adquieran la capacidad de experimentar la reacción acrosómica (*Flesch y Gadella, 2000*).

Uno de los mecanismos por los cuáles el Ca^{2+} está implicado en la función del espermatozoide, es mediante una relación directa con la regulación intracelular en los niveles de AMPc. Este nucleótido cíclico se ha demostrado que va a promover la capacitación y la reacción acrosómica (*Visconti et al., 1995b, Parrish, et al., 1994*), y los estudios en diversas especies demostraron que un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} induce un aumento en los niveles de AMPc en el espermatozoide (*Hyne y Garbers, 1979*). Este incremento del AMPc precede a la RA, lo que sugiere que este pueda estar involucrado en la ruta de señales que lleva a la exocitosis del contenido acrosomal. Se sabe que el AMPc está implicado en reacciones de fosforilación de proteínas espermáticas, que a su vez van a influir directamente en la funcionalidad espermática (*Bedford y Cross, 1999*).

Así tenemos, que en el caso del cerdo el aumento de Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide puede activar uno o más sistemas o vías enzimáticas. Por ejemplo, la adenilato ciclasa (AC) aumenta durante la capacitación (Stein y Fraser, 1984; Monks et al., 1986) en respuesta al Ca^{2+} (Hyne y Garbers, 1979; Garbers et al., 1982). Esta enzima va a catalizar la conversión de ATP a AMPc.

Al igual que Ca^{2+} , el HCO_3^- también va a activar la AC del espermatozoide porcino (Okamura et al., 1985; Garty y Salomon, 1987) fluidificando la membrana plasmática del mismo (Harrison, 1996) (Figura 2-7). Visconti y Kopf en 1998, sugirieron un efecto cooperativo del Ca^{2+} y del HCO_3^- en la modulación de la capacitación espermática, es decir, es necesaria la presencia de ambos para que tenga lugar un incremento de los niveles de AMPc y la posterior fosforilación de diversas proteínas (Figura 2-8).

Por lo tanto, en la especie porcina, tanto el Ca^{2+} como el HCO_3^- parece ser necesarios para la capacitación y sus papeles son sinérgicos según lo indicado por distintos autores que apuntan a que el HCO_3^- va a estimular la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides de cerdo (Harrison et al., 1993) y probablemente también para espermatozoides de ratón (Lee y Storey, 1986).

Se han referido evidencias del papel del Ca^{2+} en el desarrollo de la hipermotilidad del espermatozoide. Cuando los espermatozoides abandonan el epitelio de los túbulos seminíferos son aún inmóviles e incapaces de fertilizar al ovocito. La adquisición de la competencia para fertilizar, requiere una serie de procesos de maduración que incluyen la activación de la motilidad en el epidídimo y la capacitación en el tracto genital femenino. Este último fenómeno coincide con la hiperactivación de la motilidad y con la habilidad de experimentar la reacción acrosómica en respuesta a la ZP. Todos estos procesos necesitan Ca^{2+} extracelular (Visconti et al., 1995b). Aunque los mecanismos exactos que regulan la entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide no son conocidos completamente, está generalmente aceptado que el influjo de Ca^{2+} es una etapa crítica para todos estos eventos relacionados con la maduración (Visconti et al., 1999).

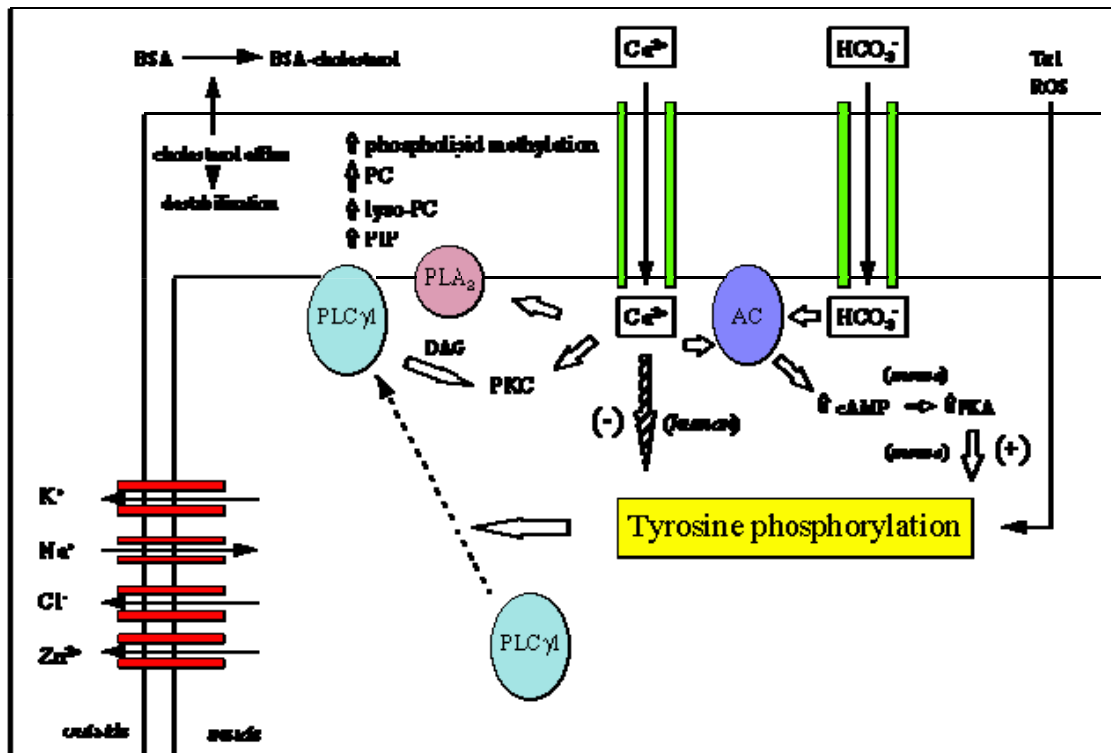


Figura 2-8. Representación esquemática de los acontecimientos que ocurren bajo condiciones que conducen a la capacitación in vitro (Baldi et al., 1996).

2.6.5 Cambios en los patrones de movimiento. La hiperactivación

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento empieza después de la eyaculación. Este proceso es conocido como "activación del espermatozoide". El movimiento del flagelo es característico y consiste en un batido simétrico de la cola que hace que el espermatozoide se desplace de forma progresiva. El semen pasa rápidamente a través del cuello y el útero de la hembra; a los 10 minutos de su deposición encontramos espermatozoides en la unión útero-tubárica. De aquí, los espermatozoides pasan al reservorio del oviducto (istmo) caracterizado por cilios luminales epiteliales y plegamientos o criptas de la mucosa oviductal (Figura 2-9).

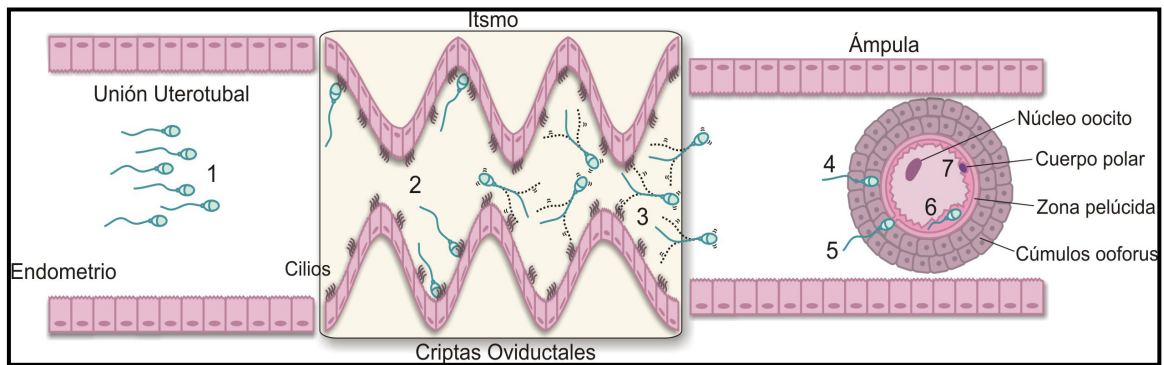


Figura 2-9. Secuencia de los procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra: 1. Activación. 2. Capacitación. 3. Hiperactivación. 4. Reconocimiento entre gametos. 5. Reacción acrosómica. 6. Adhesión y 7. Fusión (Olivera et al., 2006).

Los espermatozoides son retenidos en las criptas oviductales y allí pierden los factores decapacitantes que habían aportado las glándulas accesorias, experimentando la capacitación.

In vivo, los espermatozoides de verraco se acumulan en el istmo del oviducto uniéndose a la membrana del epitelio (Suarez, 2002; Thienthai et al., 2004). Después, estos espermatozoides pueden ser liberados de este lugar cuando son capacitados (Fazeli et al., 1999; Rodríguez-Martínez et al., 2001).

El proceso de capacitación espermática está asociado al desarrollo de un patrón de movimiento diferente conocido con el nombre de hiperactivación y que se observa en el momento cercano a la fecundación, descrito por primera vez por Yanagimachi (1969). Se considera que la hiperactivación es crítica para la fecundación (Stauss et al., 1995), porque permite al espermatozoide desprenderse de la pared del oviducto, nadar en el lumen del oviducto o penetrar las células del *cumulus oophorus* para alcanzar el ovocito. Además, se va a considerar como uno de los parámetros más importantes en la valoración de la capacidad fecundante de un eyaculado (Flowers, 1997).

Este movimiento aparece en diferentes condiciones físicas y varía según especies, pero básicamente consiste en un movimiento no lineal de la cabeza

espermática, con aumento de la amplitud de batido de la cola y movimientos asimétricos (Yanagimachi, 1994), así como una marcada trayectoria en giro y baja progresión del movimiento hacia delante (Figura 2-10).

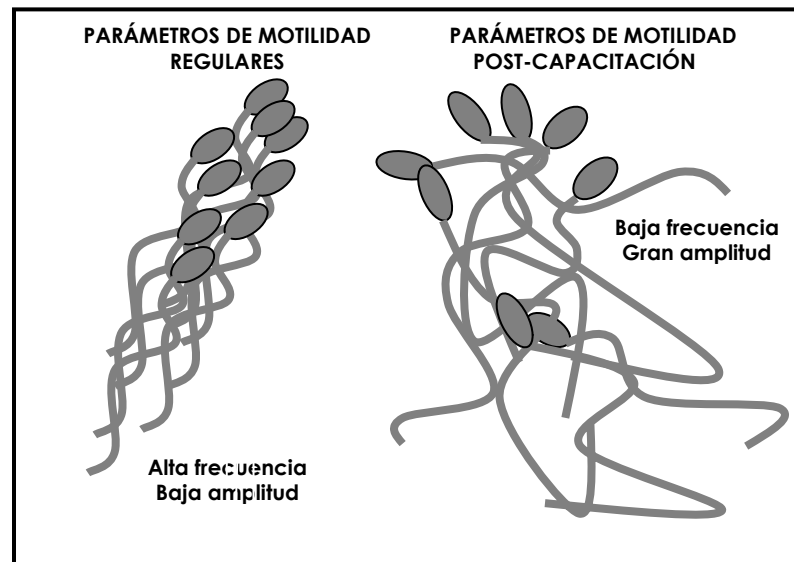


Figura 2-10. Representación esquemática del movimiento de los espermatozoides capacitados y no capacitados.

En general, la expresión de la motilidad parece depender del nivel de fosforilación de ciertas proteínas específicas, bajo la influencia positiva de proteín kinasas (sobre todo la PKA) y la influencia negativa de proteín fosfatasas (Lindemann y Kanous, 1989; Tash, 1989; Si y Okuno, 1999). La actividad de la PKA a su vez, está controlada por la modulación de las variaciones en la concentración intracelular del AMPc, regulado principalmente por cambios en la actividad AC.

Dentro del ambiente natural del espermatozoide, han sido identificados el HCO_3^- y el Ca^{2+} , como activadores directos de la actividad AC en el desarrollo de la motilidad, (Mortón et al., 1974; Okamura et al., 1985; Gross et al., 1987).

Además del Ca^{2+} y del HCO_3^- en la hiperactivación, el AMPc requerido parece estar modulado por sustancias ROS (Griveau y Le Lannou, 1997; Agarwal et al., 2004), entre las que se encuentran el superóxido (SO) y el óxido nítrico (NO). El SO se origina en el transporte de electrones en la mitocondria y

es transformado a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Este peróxido activa la AC de membrana, que actúa vía PKA, para que ésta fosforile diversas proteínas flagelares.

El HCO_3^- presente en el plasma seminal activa múltiples funciones espermáticas, alguna de las cuales son esenciales para el inicio de la motilidad. En este sentido cabe decir que la motilidad flagelar se estimula durante la eyaculación y se va a modular durante el tránsito por el aparato genital de la hembra (Davis y Siemers, 1995), provocando cambios importantes en los patrones de movimiento del espermatozoide.

La hiperactividad de los espermatozoides ha sido observada *in vitro* en varias especies de mamíferos, sobre todo si se induce la capacitación de los espermatozoides con Ca^{2+} y HCO_3^- (Yanagimachi, 1994).

La hiperactivación utiliza mecanismos moleculares para generar el movimiento del flagelo cuyo eje funcional es el axonema y cuya proteína motora principal es la *dineína* (proteína motora más importante de los microtúbulos).

Presumiblemente, el inicio de la hiperactivación se debe a una señal que se produce en el oviducto en un momento exacto, pero todavía no ha sido identificada. Sin embargo, se conoce que el resultado final de esta señal consiste en la interacción de iones Ca^{2+} (que incrementan su concentración en el citoplasma) con el axonema del flagelo, lo que provoca este tipo especial de movimiento (Cook *et al.*, 1994). Además varios estudios indican que la presencia de Ca^{2+} también presenta un papel regulador tanto en el inicio como en el mantenimiento de la hiperactivación de los espermatozoides (Yanagimachi, 1982; Suarez *et al.*, 1987).

Como comentábamos anteriormente, en el espermatozoide actúan las *CatSper1* que funcionan como canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y controlan la entrada de este ión a nivel del flagelo (Carlson *et al.*, 2003). Diversos estudios de inmunocitoquímica han revelado la expresión de *CatSper1*

específicamente en la membrana plasmática que rodea la pieza principal del flagelo y no en la pieza media ni en la cabeza espermática (Ren et al., 2001).

2.6.6 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La generación de ROS ha sido relacionada con los procesos de capacitación y reacción acrosómica, sin embargo los mecanismos que regulan estos procesos no están hoy en día del todo claros (Rivlin et al., 2004).

Las ROS (*reactive oxygen species*) son moléculas altamente reactivas que se producen normalmente en la célula aeróbica. Estas moléculas se caracterizan por tener un electrón desapareado y participan en reacciones de sustracción de hidrógeno, rotura de uniones y adición de radicales. Las ROS son capaces de oxidar lípidos de las membranas celulares, proteínas e hidratos de carbono, dañar ácidos nucleicos y despolimerizar al ácido hialurónico pudiendo llegar a producir la muerte celular (Fridovich, 1976).

Los espermatozoides son particularmente sensibles al daño oxidativo debido a su composición estructural, aunque se encuentran protegidos contra la acción tóxica del O₂, debido a la presencia de la enzima glutatión-peroxidasa o la superóxido-dismutasa (Sanocka y Kurpisz, 2004), que están presentes tanto en el plasma seminal como en el gameto masculino. Estas enzimas antioxidantes son las principales defensas que posee el espermatozoide contra el daño por ROS (Storey, 1997).

La alteración del delicado balance entre la producción de ROS y la acción antioxidante de los sistemas de defensa, compromete las funciones normales del espermatozoide. En la especie humana se ha estudiado en profundidad la relación existente entre la excesiva producción de ROS y/o la disminución de los sistemas antioxidantes y la infertilidad (De Lamirande et al., 1984). Las membranas del espermatozoide son muy susceptibles al ataque de ROS debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, produciendo lipoperoxidación de la membrana plasmática, alterando su funcionalidad y afectando finalmente la motilidad (Aitken, 1994). También se ha demostrado

que los ROS disminuyen la concentración de ATP del espermatozoide, lo que conduce a una reducción en la fosforilación de proteínas del axonema y la consecuente inmovilización del espermatozoide (De Lamirande et al., 1997b).

Los espermatozoides requieren ROS para lograr la madurez funcional. Bajos niveles de ROS son esenciales para que se consiga una fertilización normal, mediante la activación de la capacitación, de la hiperactivación, de la motilidad y de la reacción acrosómica (Griveau y Le Lannou, 1997; Agarwal et al., 2004). Durante la capacitación la concentración de Ca^{2+} intracelular, ROS y tirosín quinasa aumentan, lo que se traduce en un incremento de la cantidad de AMPc y a su vez, de la motilidad (Aitken et al., 1995; Visconti et al., 1995b) (Figura 2-11).

Se han publicado numerosos estudios en los que se demuestra el papel de los ROS como promotor de la capacitación en modelos humanos y animales (De Lamirande et al., 1997b). En la capacitación espermática se encuentran involucrados varios procesos bioquímicos entre los que se encuentran las reacciones *redox* que median en la fosforilación de la tirosina de las proteínas. Los ROS también ejercen su efecto sobre la interacción espermatozoide-ovocito, ya que bajos niveles de peroxidación lipídica provocan modificaciones de la membrana plasmática, facilitando la adhesión del espermatozoide al ovocito (Kodama et al., 1996). Sin embargo, los niveles fisiológicos de ROS en el semen, así como la duración de la exposición a los mismos para poder provocar una función espermática normal que permita la fertilización, no están determinados.

La reacción acrosomal también puede ser inducida por ROS; el O_2 y el H_2O_2 han sido detectados en estudios donde se indujo la reacción acrosomal con diferentes inductores (Aitken et al., 1995; Griveau et al., 1995). En el espermatozoide bovino, la reacción acrosomal puede ser inducida *in vitro*, por bajas concentraciones de H_2O_2 (25 mM), más aún, en esta especie, la célula espermática produce H_2O_2 en mayor cantidad que durante la capacitación (O'Flaherty et al., 1999; 2003).

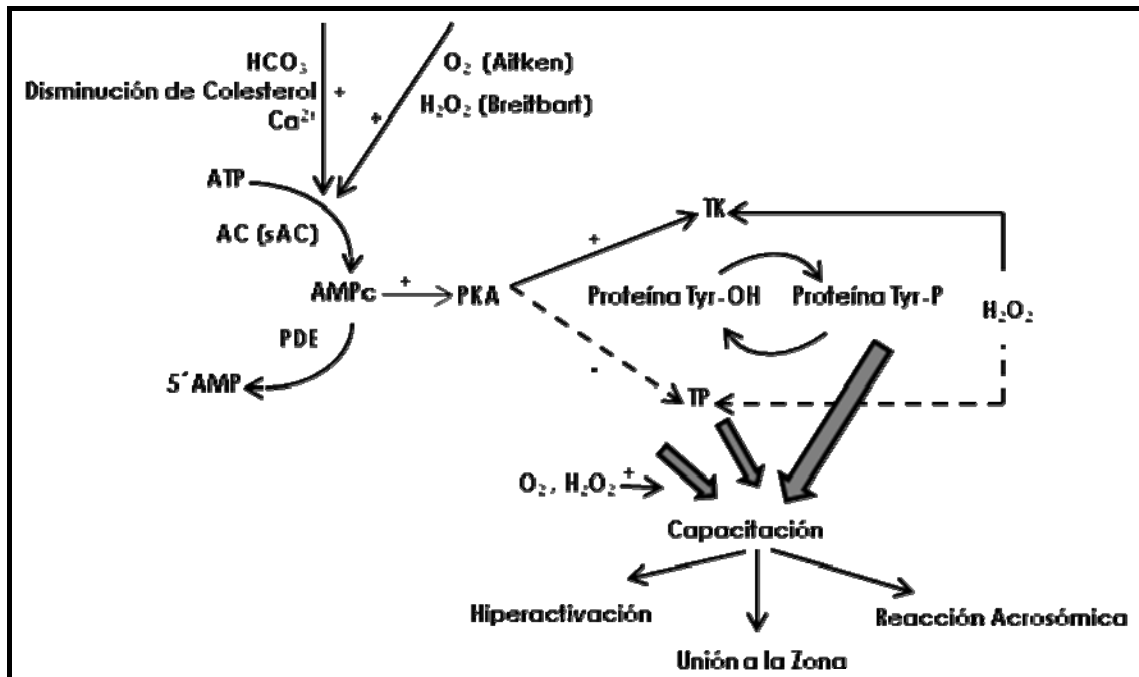


Figura 2-11. Mecanismo de acción del Ca^{2+} , del HCO_3^- y de ROS, en el desarrollo de la capacitación, RA e hiperactivación espermática (Forf, 2004).

2.7 Reacción acrosómica (RA)

La reacción acrosómica (RA) se ha definido como el proceso que experimentan los espermatozoides capacitados como consecuencia de la acción de determinados inductores adecuados. Este proceso fue observado por Austin y Bishop (1958) y consiste en el desarrollo de múltiples fenestraciones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide (Yanagimachi, 1994). Esta interacción conduce a la liberación del contenido enzimático del acrosoma y a la exposición de las enzimas para la penetración del ovocito (Osman et al., 1989) (Figura 2-12).

La RA se puede inducir *in vitro* en espermatozoides capacitados mediante la incubación con ZP solubilizadas, o mediante el empleo de ciertos ligandos tales como: progesterona, EGF, péptido natriurético atrial o ionóforo de Ca^{2+} (Breitbart et al., 1997). La cascada de eventos que acontecen, no es del todo conocida, pero es un hecho demostrado que se activan ciertas

quinasas de proteínas y aumenta la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) seguida por un aumento del pH intracelular (Florman *et al.*, 1998).

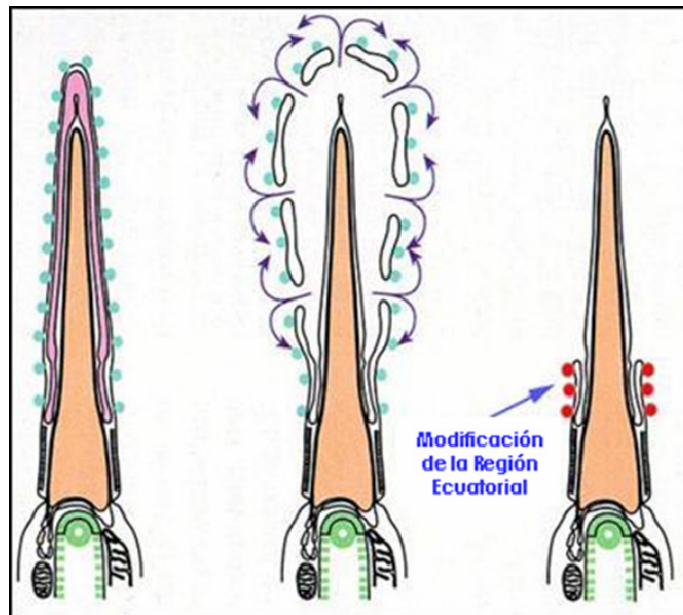


Figura 2-12. Cambios en la morfología de la cabeza del espermatozoide durante la RA: 1) Acrosoma intacto antes de la reacción. 2) Fusión de la membrana acrosomal externa provocando la liberación del contenido acrosomal. 3) Término de la RA y exposición de la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1981).

Al igual que sucede en otros eventos, para que la RA tenga lugar se necesita de la presencia de Ca^{2+} (Darszon *et al.*, 2001). La unión del espermatozoide capacitado a la ZP del ovocito activa determinados canales dependientes de Ca^{2+} (Arnoult *et al.*, 1999) provocando un aumento intracelular sostenido de este ión, que traerá consigo el desarrollo de la RA (O'Toole *et al.*, 2000). Hay que tener en cuenta, que en mamíferos, la concentración extracelular de Ca^{2+} (del orden de 1-10 mM) es bastante mayor que los niveles citoplasmáticos (entorno a 50-100 nM), por lo que la apertura de dichos canales permite la difusión de Ca^{2+} al interior celular (Burgoyne y Morgan, 1995). También se puede movilizar Ca^{2+} proveniente de los depósitos intracelulares del espermatozoide, como por ejemplo del retículo endoplasmático liso (Berridge, 1997), donde existen receptores que, tras la activación mediante IP3 (inositol 1,4,5 trifosfato), liberan este ión (Berridge, 1993) y propician la RA.

Hasta el inicio de la RA, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática son independientes mediante una estructura de filamentos de F-actina, que a modo de "andamiaje" mantiene separadas ambas membranas, evitando que se fusionen y se libere el contenido del acrosoma (*Breitbart et al., 2005*). La localización de la actina en la región acrosomal de espermatozoides de mamíferos, incluyendo el cerdo (*Camatini et al., 1986*), apoya su posible papel en la capacitación y en la RA.

Durante la RA es necesario que se produzca la despolimerización de la F-actina, por ser un requisito necesario para que la membrana acrosomal externa y la parte interna de la membrana plasmática puedan ponerse en íntimo contacto y fusionarse.

Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular (sobre 500 nM) que se producen como consecuencia de la inducción de la RA, según el modelo antes descrito, provocan la activación de proteínas que van a provocar la rotura de los filamentos de actina y el desmantelamiento de la estructura de sostén que mantenía separadas ambas membranas (*Breitbart et al., 2005*).

2.8 Papel de los constituyentes de los medios de capacitación

2.8.1 Albúmina sérica bovina (BSA)

La albúmina sérica bovina (BSA) se considera un componente esencial en los medios de capacitación *in vitro*. La función que se le atribuye es la de eliminar colesterol de la membrana plasmática. Aunque la BSA puede tener otras funciones durante la capacitación (*Espinosa et al., 2000*) su habilidad para facilitar la salida de colesterol, es necesaria para capacitar a los espermatozoides (*Visconti et al., 2002*). No obstante, también se ha sugerido que en la especie porcina los espermatozoides pueden ser capacitados en un medio carente de albúmina sérica pero en el que su composición presente HCO_3^- y Ca^{2+} (*Tardif et al., 2003*). La sustitución de la albúmina por lipoproteínas

de alta densidad (HDL) también conduce a la capacitación en espermatozoides de toro (*Therien et al., 1997*).

La salida de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide parece iniciar una vía de transducción en el proceso de capacitación (*Visconti y Kopf, 1998; Osheroff et al., 1999*). Además, la capacitación está asociada con niveles de colesterol reducido de la membrana y, por consiguiente, con un valor de *ratio* C/PL bajo (*Langlais y Roberts, 1985*) como comentábamos anteriormente.

2.8.2 HCO₃⁻

El HCO₃⁻ va actuar como una llave en la activación de los espermatozoides cuando éstos abandonan el epidídimo. *Hamner y Williams (1964)* demostraron que el HCO₃⁻ estimula la actividad respiratoria de los espermatozoides de conejo. Estudios posteriores sugirieron que el HCO₃⁻ va a regular distintas funciones espermáticas, mediante la acción directa sobre los niveles de producción de AMPc (*Harrison et al., 2000*).

El requerimiento del HCO₃⁻ en el proceso de capacitación está bien establecido (*Neill y Olds-Clarke., 1987*), pero el mecanismo exacto de cómo el HCO₃⁻ actúa en el proceso de capacitación, no está del todo claro. Sin embargo, el influjo del mismo puede estar asociado con un incremento en el pH intracelular observado durante la capacitación, con la regulación en los niveles de AMPc, con cambios reversibles en la arquitectura de la membrana plasmática y con la hiperpolarización de la misma.

Los rápidos efectos del HCO₃⁻ sobre el espermatozoide del cerdo, alteración de la arquitectura de la membrana plasmática (*Harrison et al., 1996*) e incremento en la motilidad progresiva (*Holt et al., 2002*) son mediados a través de la estimulación que provoca éste sobre la actividad de la AC. El resultado es un aumento en los niveles de AMPc en la célula espermática (*Harrison et al., 2000*) activándose tras ello la PKA dependiente de AMPc que va a fosforilar distintas proteínas, muchas de ellas aún desconocidas,

iniciándose así varias rutas de señales (Harrison, 2004). La adición de HCO_3^- en los medios de capacitación va a promover un incremento en la motilidad espermática, mediada por un incremento en los niveles de AMPc y en la fosforilación de la tirosina.

La respuesta al $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ es extremadamente rápida siendo los niveles de AMPc máximos a los 60 segundos (Harrison *et al.*, 2000) y el incremento en la fosforilación de proteínas dependiente de la PKA a los 90 segundos (Harrison, 2004). Estos niveles de AMPc disminuyen después de iniciarse el aumento y tras aproximadamente 7 minutos, vuelven a recuperarse aunque ya más lentamente. Una explicación a este "rebote" en los niveles de AMPc, podría ser el hecho de la existencia de un mecanismo de *feedback* mediante el cual, la PKA fosforila a fosfodiesterasas que disminuyen la actividad del AMPc (Mehats *et al.*, 2002).

Es interesante destacar que los niveles de HCO_3^- en el epidídimo son bajos en comparación con los del plasma seminal y en el oviducto (Brooks, 1984). Estos cambios en la concentración de HCO_3^- en los tractos reproductores masculino y femenino podrían jugar un papel importante en la supresión de la capacitación en el epidídimo y en la activación de este proceso *in vivo* en el tracto reproductor femenino.

2.8.3 Ca^{2+}

El Ca^{2+} ha sido siempre considerado como un elemento esencial en la funcionalidad espermática y la posibilidad de que pueda actuar de forma paralela con el HCO_3^- mediante la estimulación sobre la AC ha sido demostrada (Litvin *et al.*, 2003). Sin embargo, mientras que el papel del Ca^{2+} junto al HCO_3^- en la fosforilación de la tirosina ha sido comprobado en el ratón (Visconti *et al.*, 1995a), en el caso del cerdo, este papel no está del todo claro; en esta especie el HCO_3^- , en ausencia completa de Ca^{2+} , provoca cambios en la arquitectura de la membrana plasmática del espermatozoide (Harrison *et al.*, 1996), incrementa la motilidad (Holt y Harrison, 2002) y la fosforilación de la tirosina (Green y Watson, 2001).

2.9 Sistemas de capacitación espermática *in vitro*

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes tipos de técnicas de selección espermática, cuyo principal objetivo es eliminar el plasma seminal, restos de diluyentes utilizados para conservación espermática (incluidos crioprotectores) o simplemente para eliminar ciertas partículas contaminantes que puedan afectar al cultivo posterior y recuperar a los espermatozoides que ofrezcan una mejor calidad para la fecundación. Existen muchas técnicas utilizadas en las distintas especies, dentro de las cuales mencionaremos a las siguientes:

2.9.1 Lavado espermático con albúmina

El método de lavado espermático es el método más sencillo de preparación espermática y consiste básicamente en la eliminación del plasma seminal y restos de otras partículas que hubiesen podido contaminar el eyaculado mediante centrifugaciones de los espermatozoides previamente resuspendidos en un medio enriquecido con albúmina.

Como comentábamos anteriormente, durante la capacitación uno de los procesos bioquímicos que se produce es la desestabilización de la membrana plasmática, lo que provoca un aumento de la fluidez de la misma. El colesterol de la membrana de los espermatozoides es el responsable de la estabilidad de la misma. Mediante el empleo de medios de lavado enriquecidos con albúmina, conseguimos que ésta actúe como adsorbente de colesterol (Cross, 1998), favoreciendo su pérdida y la consiguiente capacitación espermática (De Lamirande et al., 1997).

2.9.2 Métodos de migración

Con estas técnicas se pretende limpiar el semen y recuperar secundariamente los espermatozoides con mayor movilidad para mejorar el éxito en la fecundación. Entre ellas destacan:

◆ *Swim-up*. En este método se lava el eyaculado una o dos veces y se decanta el sobrenadante. Posteriormente, se añade el medio de cultivo al *pellet* deslizándolo por la pared del tubo y se deja incubar durante aproximadamente 45 minutos a 37°C. Los espermatozoides capacitados "nadan" hacia arriba (*swim-up*) en el sobrenadante, que es la fracción que se recoge. La desventaja de este método es la baja recuperación espermática pero por otro lado permite la recolección de fracciones espermáticas con una motilidad progresiva alta.

La técnica de *swim-up* ha sido usada para separar espermatozoides móviles humanos, presentando dichos espermatozoides posteriormente mayor facilidad para penetrar óvulos de hámster libres de ZP (Cohen et al., 1981). Por el contrario, también se ha observado que los espermatozoides de verraco lavados a través de otros métodos (por ejemplo, mediante gradientes de Percoll®), penetran más a los ovocitos de hámster sin ZP que los preparados por dilución (Berger y Horton, 1988) o por *swim-up* (Berger y Parker, 1989).

◆ *Swim-down*. Este procedimiento es similar al *swim-up*, pero en este caso se coloca primero el medio de cultivo y después el semen, dejándolo resbalar por las paredes del tubo. De esta manera los espermatozoides van a nadar hacia la parte de abajo, que es donde se encuentra el medio de cultivo, descartándose el sobrenadante.

◆ *Self-Migration*. La separación de los espermatozoides se realiza por una migración espermática. Con esta técnica se puede recuperar un mayor número de espermatozoides móviles que con el método anterior, sin embargo, los resultados de fertilidad son menores.

◆ *Migración-sedimentación*. Consiste en un *swim-up* combinado con un proceso de sedimentación y se basa en la capacidad de los espermatozoides para desplazarse. En este caso no se utiliza la centrifugación y no se daña con ello a los espermatozoides. Los resultados con esta técnica son buenos, siempre cuando la muestra de semen sea normal.

2.9.3 Métodos de filtrado

Estas técnicas se basan en la capacidad que presenta un determinado material para captar los espermatozoides muertos o con defectos en la membrana a través de la filtración y solamente las células móviles son capaces de pasar a través de la fibra y no quedar atrapadas durante el proceso de filtración. Posteriormente, el filtrado se recoge, se centrifuga y el *pellet* obtenido se diluye en medio de cultivo para su posterior utilización. Entre estas técnicas destacan, en función de la naturaleza del material empleado para captar las células inmóviles, el filtrado en fibra de vidrio y la filtración en columnas *Sephadex*. Mediante estas técnicas de filtrado se ha podido descartar aquellos espermatozoides con alteraciones morfológicas y de motilidad, así como el grado de RA en diversas especies como en el cerdo (Fayemi et al., 1979; Ramio et al., 2006) o el toro (Anzar y Graham, 1996).

2.9.4 Centrifugación por gradientes de densidad

El Percoll® es una sustancia empleada para la separación mediante centrifugación de todo tipo de material biológico, virus, células y también espermatozoides. Consta de partículas de sílice coloidal cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), un material no tóxico e ideal para la separación de materiales biológicos. Esta técnica aprovecha la diferente densidad de los espermatozoides de modo que aquellos que presentan mejor motilidad y morfología y más densos, irán al fondo del tubo tras la centrifugación aislándose además de otros constituyentes, que se acumulan en el gradiente, en su densidad apropiada. Mediante esta técnica se favorece la purificación de la muestra espermática en cuanto a que es capaz de seleccionar espermatozoides móviles morfológicamente normales (Mattioli et al., 1988).

Este método permite separar espermatozoides por centrifugación a través de un gradiente y básicamente consiste en formar diferentes capas de densidad variable. Así tenemos, que se va a depositar en el fondo del tubo la capa de mayor densidad y sobre ella el resto de capas en densidad decreciente. La muestra a separar se coloca encima y cuando se realiza la

centrifugación, cada componente celular empieza a descender por el gradiente hasta que llega a un punto donde la densidad de la capa es igual a su densidad propia. La velocidad a la que sedimenta cada componente depende de su tamaño y de su forma. Aplicando una fuerza de centrifugación determinada, los espermatozoides móviles se disponen paralelamente a la pared del tubo y facilitan su desplazamiento. Con ello, obtenemos una fracción libre de células y rica en espermatozoides en el fondo del tubo de centrifugación.

A pesar de los distintos métodos de preparación espermática cada especie presenta unas condiciones especiales para que estas células se capaciten en situación extracorpórea. En el caso de espermatozoides de verraco se han descrito varios sistemas de capacitación *in vitro* en los cuales existen dos componentes comunes que son los lavados o la incubación de los espermatozoides durante un tiempo determinado antes de ser coincubados con los ovocitos (Martínez *et al.*, 1996).

2.10 Métodos de evaluación de la capacitación espermática

Anteriormente se han descrito algunas de las modificaciones que se producen en el espermatozoide durante la capacitación. Para poder evaluar este proceso, existen diferentes técnicas entre las que destacamos las siguientes:

2.10.1 Análisis computerizado de la motilidad (CASA)

El análisis computerizado de la motilidad (CASA) realiza mediciones rápidas y objetivas de los parámetros de motilidad individual. En teoría, el sistema CASA permite el estudio de las características del movimiento de las subpoblaciones espermáticas con un cierto grado de sofisticación. Dado que las trayectorias del movimiento individual de los espermatozoides vienen determinadas en función del flagelo, las características como la velocidad,

frecuencia de batida del flagelo y amplitud, deben reflejar fielmente el estado fisiológico de las células.

Como ya ha sido referido anteriormente, la hiperactividad espermática está caracterizada por movimientos del flagelo de manera vigorosa y no lineal causada por la amplitud de movimiento del flagelo (Yanagimachi, 1994) y ha sido propuesta como esencial para la fertilización en mamíferos. No obstante, es importante resaltar que el análisis de los espermatozoides hiperactivos del verraco es complicado porque los espermatozoides tienden a aglutinar cabeza con cabeza en los medios de capacitación que contienen Ca^{2+} (Harayama et al., 1998).

El CASA es una herramienta de gran valía para la determinación objetiva de los cambios en los patrones de motilidad durante el proceso de capacitación (Mortimer, 1997, 2000; Verstegen et al., 2002) pero hemos de tener presente que la evaluación cuantitativa del semen mediante CASA se basa en parámetros cinéticos de espermatozoides individuales que son reconstruidos a partir del movimiento de sus cabezas ya que, la instrumentación del CASA normalmente no permite el análisis directo del movimiento del flagelo que genera la hiperactividad espermática (Mortimer, 1997).

2.10.2 Determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular

La aparición de sondas fluorescentes sensibles a la concentración de Ca^{2+} y el hecho de que puedan introducirse en el interior celular sin necesidad de alterar la integridad de la membrana celular, ha facilitado enormemente los estudios de la regulación del Ca^{2+} por hormonas u otras sustancias.

Desde el punto de vista experimental, las sondas fluorescentes se pueden dividir en dos grupos principales: excitables a una longitud de onda (flu o indo) y las excitables a dos longitudes de onda (fura). Las sondas que pertenecen a este segundo grupo tienen la particularidad de que la forma unida al Ca^{2+} y la forma libre presentan un espectro de excitación distinto, de

forma que la intensidad de fluorescencia se puede medir a dos longitudes de onda diferentes, obteniéndose así una relación matemática o “*ratio*” entre ambas (también son conocidas con el nombre de “sondas ratiométricas”).

Los indicadores de Ca^{2+} fluorescentes como fura-2, indo-1 y fluo-3 son instrumentos sensibles y muy utilizados para la medición de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en células vivas (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

El indicador fluorescente fura-2 es uno de los más utilizados ya que es capaz de detectar concentraciones de Ca^{2+} muy pequeñas (μmol) y permite el uso del cociente entre la fluorescencia emitida con cada una de las dos longitudes de onda de excitación usadas (340 y 380 nm λ). Cuando el fura-2 se une al Ca^{2+} , la intensidad de fluorescencia emitida a 340 nm aumenta y la emitida a 380 nm disminuye. Sin embargo, el espectro de emisión apenas se modifica (la emisión máxima se mantiene en 510 nm tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+}). La relación entre el cambio en la intensidad de fluorescencia emitida en cada una de las longitudes de onda, define el *ratio* permitiendo que el fura-2 sea utilizado como indicador de doble excitación lo que permite eliminar posibles errores como “fotoblanqueo” de la sonda, distribución no homogénea del indicador en la célula, carga deficiente y otros posibles artefactos debidos a manipulaciones experimentales.

El fura-2, habitualmente se usa en forma acetoximetilester (fura-2AM), para conseguir así una entrada más eficaz a través de la membrana plasmática de las células a estudio. Una vez que el fura-2AM ha penetrado en la célula, las esterasas intracelulares van a deseterificar estas formas acetoximetilester dejando libres los grupos carboxilos que tienen carga negativa, provocando que la sonda se quede atrapada dentro de la célula. El fura 2-AM, presenta la característica de ser un éster con elevada hidrofobicidad y por lo tanto poco soluble en medios acuosos. Para aumentar esta solubilidad, se utiliza un surfactante no iónico llamado ácido plurónico, que actúa como una micela, rodeando al fura-2AM y facilitando así su entrada en la célula.

2.10.3 Evaluación de las modificaciones lipídicas a nivel de membrana

La Merocianina 540 (M540) es un colorante fluorescente hidrofóbico que tiñe las membranas de las células más intensamente si éstas tienen su componente lipídico con un alto desorden como es el caso de los espermatozoides capacitados. En este sentido, M540 ha sido utilizada para monitorizar las alteraciones en la arquitectura lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de verraco durante la capacitación (Harrison *et al.*, 1996). Además, se ha sugerido que M540 se une preferiblemente a dominios lipídicos de membrana libres de colesterol (Humphries y Lovejoi, 1984).

El HCO_3^- induce un rápido incremento en la fluorescencia con M540, provocando que el empaquetamiento lipídico de la membrana empiece a desorganizarse por este tratamiento. Este desorden causa una mayor fluidez en la membrana y permite que M540 se intercale dentro de los grupos hidrófobos de la membrana plasmática (Williamson *et al.*, 1983; Stillwell *et al.*, 1993). Además, se ha comprobado que los espermatozoides inmaduros (con gotas citoplasmáticas), no muestran respuesta a M540 tras la acción del HCO_3^- , lo que sugiere que este hecho es dependiente de la maduración completa en el epidídimo (Flesch *et al.*, 2001a).

En la especie porcina, al igual que ocurre en la especie equina y humana, la proporción de células que responde a M540 se encuentra correlacionada con la proporción de células que responde a la clortetraciclina, cambios que son característicos de la capacitación espermática (Rathi *et al.*, 2001; De Vries *et al.*, 2003).

Una de las principales ventajas de M540 es su idoneidad para ser monitorizada mediante citometría de flujo sin necesidad de fijar las células. Además, puede ser combinada con otras sondas que evalúen vitalidad como el Yo-Pro1, que permite la detección de la doble hélice de ADN. Esta sonda, no puede atravesar la membrana de las células vivas y por lo tanto es un

efectivo marcador de las muertas, siendo ideal para trabajar con microscopía de fluorescencia y con citometría de flujo.

La combinación de ambas sondas se ha mostrado como una herramienta muy útil para los estudios de vitalidad y evaluación de las modificaciones lipídicas en la membrana espermática porcina (*Harrison et al., 1996; Flesch et al., 1999; Gadella y Harrison, 2000; Flesch et al., 2001a*).

2.10.4 Determinación de ROS

Uno de los métodos más utilizados de medición de ROS es el ensayo de quimioluminiscencia, el cual usa sondas sensibles como luminol y lucigenina para la cuantificación de la actividad redox del espermatozoide (*Aitken et al., 2004*). No obstante, aunque la sensibilidad de estas pruebas es alta, la especificidad de las mismas es muy pobre (*Fridovich, 1997; 2003*) y existe la posibilidad de interferencias. La contaminación por leucocitos es la principal fuente de error. También el tiempo de análisis después de la colección (menos de 1 h) y la alta cantidad de espermatozoides ($>1 \times 10^6/\text{ml}$) requeridos son algunas de las desventajas de esta técnica.

Otro método de análisis para medir ROS intracelulares es la citometría de flujo, que tiene una ventaja sobre los métodos de la quimioluminiscencia para la medida del ROS porque las medidas intracelulares se pueden hacer exclusivamente en la porción viable de la población espermática (*Fridovich, 1997; 2003*). Se han empleado diferentes sondas como la 2,7-diacetato diclorofluoresceína o hidroetidina (*Marchetti et al., 2002*). Las células espermáticas son expuestas a las sondas que reaccionan con las sustancias ROS para emitir una fluorescencia verde. El ensayo es altamente sensible y requiere un número de células relativamente bajo, aunque resulta más caro y precisa de un sofisticado equipamiento.

2.10.5 Evaluación de la reacción acrosómica

Debido a que la capacitación espermática es sucedida por la RA, los estudios de RA pueden ser utilizados como técnicas de evaluación de la propia capacitación.

Las técnicas para evaluar el estado del acrosoma son muy extensas, pero posiblemente aquellas en las que utilizamos la citometría de flujo, nos permitan obtener una mayor efectividad y fiabilidad en los resultados ya que se analiza un elevado número de células en un corto periodo de tiempo.

El procedimiento habitual en este caso es utilizar lectinas asociadas a fluoresceínas, normalmente el isotiocianato de fluoresceína (FICT), como marcadores del acrosoma y de las modificaciones de la membrana plasmática de los espermatozoides (Cummins, 1995; Medeiros y Parrish, 1996). Las lectinas son moléculas, principalmente de origen vegetal, que presentan una gran afinidad específica por residuos glucídicos y permiten localizar cambios en la distribución de los azúcares sobre la membrana de los espermatozoides, utilizándose por lo tanto como marcadores específicos de glicoconjugados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal (Cross et al., 1986; Nolan et al., 1992; Way et al., 1995).

Existen gran número de lectinas disponibles, pero las más utilizadas son la lectina de la aglutinina del *Pisum Sativum* (PSA) y la aglutinina del *Arachis hypogaea* (PNA). La PSA permite reconocer terminales manosa, glucosa y glucosamina (Goldstein y Portez, 1986) de glucoconjugados localizados en la matriz acrosomal, por lo que asociada a una fluoresceína puede identificar espermatozoides con el acrosoma dañado o ausente (Nolan et al., 1992; Aitken y Brindle, 1993).

La PNA se une a residuos de β -galactosa de la membrana acrosomal externa y se ha probado tanto su viabilidad como el empleo de esta técnica para estudiar la RA en espermatozoides de verraco (Vázquez et al., 1993). La PNA va a detectar los primeros signos de la exocitosis acrosómica, tan pronto

como empieza a producirse la fusión entre los poros de la membrana plasmática y la membrana acrosomal (*Gadella y Harrison, 2000*).

El estudio del estado del acrosoma suele estar unido con el de la viabilidad espermática utilizando para ello una sonda con afinidad por el ADN como es el caso del yoduro de Propidio (IP), ésta es una tinción nuclear y se emplea como tinción espermática de contraste. En combinación permiten una evaluación rápida y simple de la presencia o ausencia del acrosoma.

El empleo de estas técnicas se ha validado para el estudio del estado del acrosoma en varias especies domésticas entre ellas, la especie porcina (*Vázquez et al., 1996*) y la especie equina (*Maxwell y Johnson et al., 1997*).

2.10.6 Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación *in vitro* (FIV) es una técnica que va a permitir el estudio de los procesos que conducen a la penetración del ovocito por un espermatozoide y a la formación de un cigoto viable. Este proceso se produce después de que los espermatozoides hayan sido capacitados correctamente, lo que les confiere la capacidad de interaccionar con la ZP, experimentar la RA y adherirse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

La FIV puede ser usada para la valoración de la capacidad fecundante de los espermatozoides y es una herramienta que permite la obtención de embriones a partir de gametos de alto valor genético (*Gadea et al., 1998*).

Son numerosos los sistemas de preparación espermática que inducen la capacitación (*Matás et al., 2003*) pero en todos ellos, el gameto masculino tiene que experimentar una sucesión de acontecimientos que le permitan finalmente interaccionar con el ovocito y fecundarlo. Es por esto, que posiblemente la herramienta más precisa para predecir la fertilidad sería aquella que pudiera determinar la capacidad de los espermatozoides para penetrar ovocitos en un sistema *in vitro* (*Bavister, 1990*).

En la especie porcina, uno de los problemas que se presentan a la hora de obtener embriones es el alto grado de ovocitos polispérmicos. A pesar de los numerosos estudios realizados con el fin de reducir la alta tasa de polispermia, la incidencia de penetración polispérmica en ovocitos porcinos fecundados *in vitro* continúa siendo extremadamente elevada comparada con otras especies (Niwa, 1993; Funahashi y Day, 1997; Prathers y Day, 1998; Day, 2000; Funahashi, 2003). Este es un grave problema cuando la finalidad es la obtención de embriones. Sin embargo, este hecho resulta ser una enorme ventaja para evaluar fertilidad (Gadea et al., 1998, Gadea y Matás, 2000) y del mismo modo, puede ser utilizada como herramienta para evaluar sistemas de capacitación (Matás et al., 2003).

Los sistemas de FIV han mejorando en los últimos años mediante el estudio de los factores que pueden influir en los resultados finales, como son: fracción del eyaculado (Xu et al., 1996), *ratio* espermatozoide/ovocito (Rath, 1992; Foxcroft et al., 1995; Xu et al., 1996; Gil et al., 2004), características del semen (Gadea y Matás, 2000), presencia de células del *cumulus* (Matás et al., 1996), tiempo de coincubación de los gametos (Coy et al., 1993; Martínez et al., 1996; Abeydeera y Day, 1997) o tamaño de los ovocitos (Matás et al., 1996).

En cualquier caso, la predicción de la capacidad fecundante de un eyaculado es una tarea compleja (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000), que hasta el momento no ha sido resuelta con satisfacción por los métodos de análisis clásicos. Pero ante esta situación se abre una nueva expectativa con el uso de los sistemas de FIV porcina que permitirán evaluar un gran número de fases del proceso de fecundación que no pueden ser determinados por el espermograma clásico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describirá la metodología seguida en el presente trabajo refiriendo simultáneamente el material utilizado. La mayoría de los reactivos utilizados en la realización de los experimentos fueron suministrados por *Sigma-Aldrich Química*. Para aquellas experiencias en los que se hubieran utilizado productos de otra casa comercial, ésta se especificará en el apartado correspondiente.

3.1. Medios para la manipulación, lavado y cultivo de los gametos

La preparación de todos los medios de cultivo empleados en esta Tesis Doctoral se realizó utilizando agua ultrapura (*Milli-Q, Millipore*), añadiendo todos los componentes y los suplementos específicos para cada caso particular. Tras la elaboración de los medios, se realizó la medición de osmolaridad y pH, y posteriormente se procedió a la esterilización mediante filtro de membrana con diámetro de poro de 0.22 μm , en cabina de flujo laminar. La conservación de los medios se realizó a 4°C en condiciones estériles y durante un tiempo máximo de 2 semanas. Transcurrido el cual, se desecharon aquellos medios que no habían sido utilizados.

3.1.1 Medio de dilución y de manipulación de los espermatozoides

◆ **Beltsville Thawing Solution (BTS).** El medio utilizado para la dilución y manipulación de los espermatozoides fue el denominado BTS cuya composición queda reflejada en la *tabla 3-1*:

Tabla 3-1. Diluyente BTS para espermatozoides de verraco
(Pursel y Johnson, 1975).

Componentes	Concentración (mM)
Glucosa	0.0002
Na ₂ -EDTA•2H ₂ O	3.36
NaHCO ₃	15
Citrato-Na ₃ •2H ₂ O	20
KCl	5

3.1.2 Medios de lavado y de manipulación de los ovocitos

3.1.2.1 Transporte y lavado de ovarios

Los medios utilizados para el transporte y lavado de los ovarios fueron:

- ◆ **Solución Salina (SS):** 0.9% p/v de NaCl con 100 mg/l kanamicina sulfato.
- ◆ **Solución de cetrimida** (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio: Cetab) al 0.04% (w/v).

Ambas soluciones fueron preparadas con agua purificada (Mili-RX) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso en el lavado y recogida de ovarios.

3.1.2.2 Manipulación de ovocitos

- ◆ **Tampón Fosfato Salino de Dulbecco (PBS) modificado**, suplementado con 1 mg/ml de alcohol de polivinilo (PVA) y 0.005 mg/l de rojo fenol, como indicador de pH. Este medio se conservó a 4°C hasta su utilización, momento en el cual fue atemperado a 37°C.

3.1.3 Medios de maduración *in vitro* y de fecundación *in vitro*

Los medios para la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (MIV) y de fecundación *in vitro* (FIV) se detallan a continuación:

◆ **Medio NCSU-37.** Se preparó una solución stock de NCSU-37 de acuerdo con lo descrito por *Peter y Wells (1993) (Tabla 3-2)* con agua ultrapura (*Milli-Q*). A continuación, se esterilizó por filtración haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana con diámetro de 0.22 μm y se conservó en condiciones estériles a 4°C un máximo de dos semanas.

Tabla 3-2. Composición del medio NCSU-37 stock
(*Peters y Wells, 1993*).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicilina G sódica	0.18
Sulfato estreptomina	39.00 UI/ml

Para la MIV, el medio NCSU-37 stock se suplementó con cisteína, β -mercaptoetanol, insulina, dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y HCG (Foligón®, Chorulón®; *Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda*) tal y como describen *Funahashi et al. (1997) (Tabla 3-3)*.

◆ **Medio TALP** (Rath et al., 1999). La solución stock de TALP (Tabla 3-4) fue elaborada en laboratorio con agua ultrapura. A continuación, se esterilizó mediante filtración y se conservó bajo condiciones estériles a 4°C un máximo de dos semanas.

Tabla 3-3. Suplementos del medio NCSU-37 para MIV de ovocitos porcinos (Funahashi et al., 1997).

Componente	Concentración
Cisteína	0.57 mM
β -mercaptoetanol	50.00 μ M
Insulina	5.00 mg/l
dbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

Tabla 3-4. Composición del medio TALP stock (Rath et al., 1999).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114.06
NaHCO ₃	25.07
KCl	3.20
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.35
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.50
Lactato Ca•5H ₂ O	8.00
Lactato sódico	10.00
Glucosa	5.00
Cafeína	2.00
Sulfato kanamicina	0.17
Rojo fenol	0.003
PVA	1 mg/ml

Para la realización de los experimentos, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen *Rath et al.* (1999). El pH se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO₂, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 3 h antes de su uso.

3.2 Obtención de los espermatozoides

3.2.2 Espermatozoides de epidídimo

Los espermatozoides procedían de cola de epidídimo de testículos de verracos sanos sacrificados en matadero. El transporte al laboratorio se realizó en un recipiente isoterma en un plazo máximo de 1 h desde el sacrificio de los animales. Una vez en el laboratorio, los testículos y los epidídimos fueron lavados con solución salina atemperada procediéndose tras ello a la disección de la cola del epidídimo. Posteriormente, se lavó el conducto epididimario con 2 ml de BTS utilizando una aguja de 21G acoplada a una jeringuilla de 5 ml (*Figura 3-1. A-B-C-D*). La calidad de los espermatozoides epididimarios se evaluó siguiendo el mismo protocolo que en el caso de los espermatozoides eyaculados y que será referido posteriormente.

3.2.1 Espermatozoides eyaculados

Los espermatozoides eyaculados se obtuvieron de verracos (Landrace x Pietrain) de fertilidad probada, pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja "Lo Navarro S.A." (Murcia, España).

La obtención del semen se realizó de forma rutinaria mediante el método manual (*Larsen, 1986*). La fracción rica fue recogida en un termo previamente atemperado e inmediatamente fue transportada al laboratorio. La fracción gel

fue retenida en una gasa colocada previamente en la abertura del termo. El semen fue posteriormente diluido 1:1 en BTS (*Figura 3-1. E*).

La calidad del semen fue evaluada inicialmente en la propia granja, valorando el volumen del eyaculado, la concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles y motilidad progresiva, y formas anormales.

La motilidad se evaluó mediante la observación en microscopio de campo claro con objetivo 10X, depositando 10 μ l de la muestra sobre un portaobjetos precalentado en una placa térmica atemperada a 38°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5. Para el estudio de la morfología, una vez en el laboratorio, se fijó una muestra de semen en solución salina formolada al 0.3%, y se valoró en un microscopio de contraste de fases (*Leica®* modelo DMR) con objetivo de inmersión (100X), clasificando los espermatozoides en: normales, colas en látigo, colas en ovillo, gotas citoplasmáticas proximales y distales, y otras formas anormales. Sólo se utilizaron aquellos eyaculados que superaban los parámetros de calidad que se indican en la *tabla 3-5*.

Tabla 3-5. Características seminales de los eyaculados de los verracos utilizados para las diferentes experiencias.

Parámetro	Valor
Volumen	≥ 75 ml
Número total de espermatozoides por eyaculado	2×10^{10}
Motilidad	≥ 70
Motilidad progresiva	≥ 3
Anormalidades morfológicas	$\leq 25\%$



A



B



C



D



E

Figura 3-1. **A.** Estado del epidídimo separado del testículo. **B.** Disección del epidídimo. **C.** Canulación del epidídimo para la extracción de los espermatozoides. **D.** Extracción. **E.** Recogida manual del semen eyaculado.

3.3 Recogida y transporte de ovarios

Los ovarios procedían de hembras prepúberes de 90-100 Kg de peso, sacrificadas 30 minutos antes en matadero “El Pozo” de la empresa *Fuertes S.A.* situado en Alhama de Murcia (Murcia, España). El transporte hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isoterma con solución salina a 38°C en un plazo máximo de 1 h desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, se retiraron los restos de oviducto y los ovarios se lavaron dos veces en Cetab y dos veces con solución salina. Se seleccionaron los ovarios con buen desarrollo folicular (*Figura 3-2. A*) y se desecharon aquellos que presentaban cuerpos lúteos, formaciones quísticas o una morfología anormal. Los ovarios seleccionados se mantuvieron dentro de un vaso de precipitado con solución salina en baño María a 38°C hasta el momento de su procesamiento.

3.4. Obtención y selección de los ovocitos

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) fueron recogidos mediante sección del ovario, con hoja de bisturí estéril, de folículos no atrésicos y con diámetro aproximado entre 3-6 mm (*Figura 3-2. A-B*). El contenido folicular fue recogido en placas de Petri de 35 mm Ø sobre placa calefactora, conteniendo medio PBS atemperado y suplementado con 1 mg de PVA. Mediante pipetas Pasteur estériles, todo el contenido formado por fluido folicular, complejos cúmulo-ovocito y PBS se llevó a tubos estériles de plástico de 10 ml, donde se dejaron sedimentar (sobre placa calefactora) durante aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante mediante decantación y el sedimento se vertió en placas de Petri con medio PBS fresco atemperado.

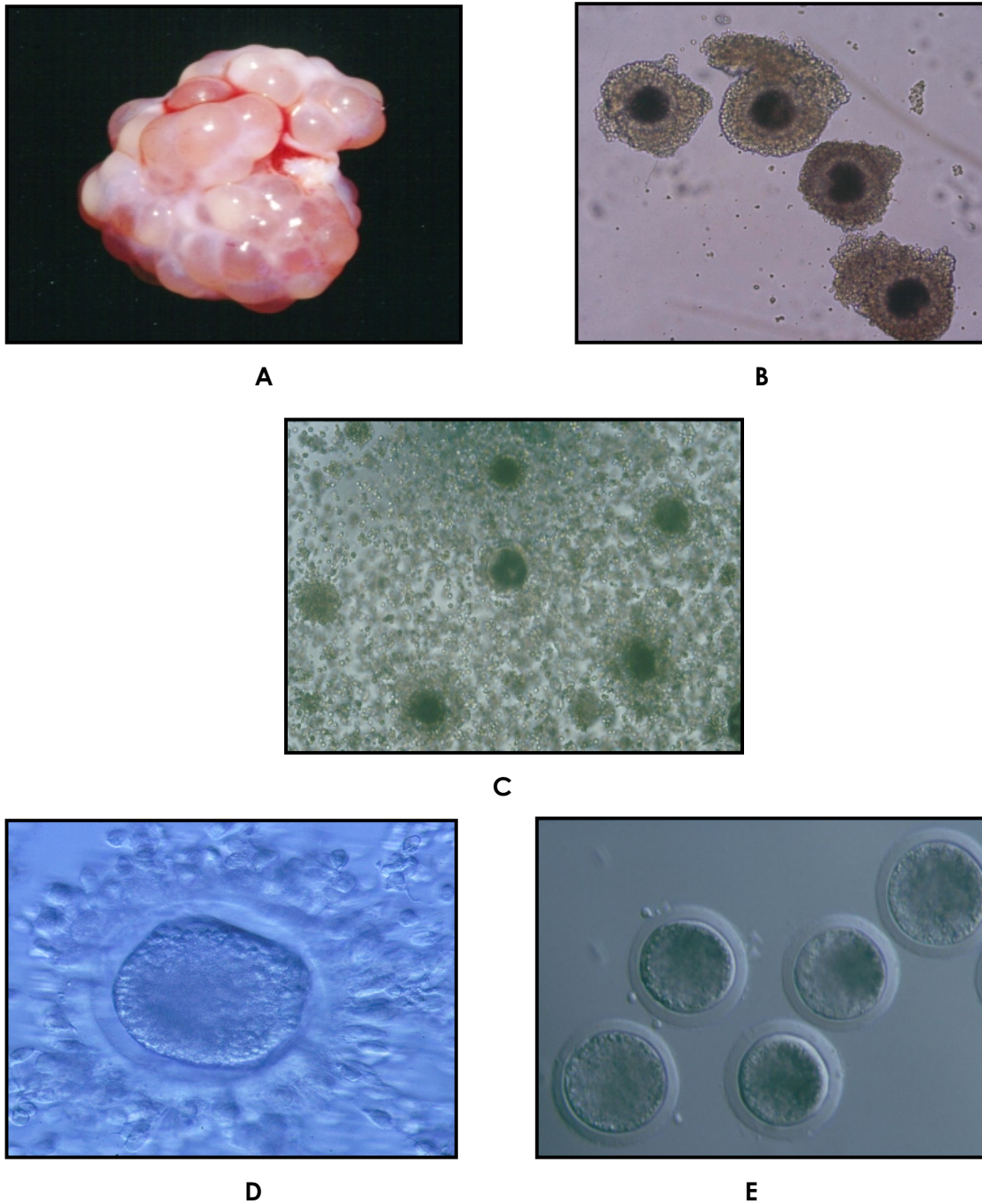


Figura 3-2. **A.** Ovario porcino empleado en la obtención de ovocitos para MIV. **B.** Complejos cúmulo-ovocito (COCs) seleccionados para MIV (estereomicroscopio, 20x). **C.** Expansión del cúmulo durante la MIV (estereomicroscopio, 20x). **D.** Detalle del proceso de expansión del cúmulo (microscopía contraste Hoffman, 40x). **E.** Ovocitos desnudados (microscopía contraste Hoffman, 40x).

Los COCs fueron seleccionados mediante estereomicroscopio (*Nikon*) a 20x y aspirados mediante pipetas Pasteur de vidrio estiradas por calor en mechero Bunsen para reducir su grosor y con el extremo romo. La pipeta se conectó a un tubo flexible de silicona, en el que se intercaló un filtro para impedir posibles contaminaciones. Solamente se seleccionaron para la posterior maduración, los COCs obtenidos antes de que transcurrieran 2 h desde el sacrificio de los animales (*Matás et al., 1996*), y con un citoplasma granulado y homogéneo, de aspecto compacto y rodeado de al menos 3 a 4 capas de células de *cumulus oophorus* (*Figura 3-2. B*).

3.5. Maduración *in vitro* (MIV)

El medio usado para la maduración de los ovocitos fue el *North Carolina State University 37* (NCSU-37) (*Petters and Wells, 1993*) (*Tabla 3-2*), suplementado con con cisteína, β -mercaptoetanol, insulina, dibutil AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y HCG (Foligón®, Chorulón®; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) tal y como describen *Funahashi et al. (1997)* y como se reflejó en la *tabla 3-3*.

El PFF se obtuvo por aspiración de folículos antrales (2-5 mm de \varnothing) de ovarios procedentes del sacrificio en matadero de hembras prepúberes; el contenido folicular aspirado se centrifugó a 1.500 g, 30 minutos y el sobrenadante se dispensó, previa filtración a través de una serie de filtros (*Millex, Millipore*) con un poro de membrana de 0.8, 0.45 y 0.22 μm , este último de baja adsorción proteica, en alícuotas de 1 ml, para proceder a su almacenamiento a -20°C hasta su utilización.

Los ovocitos seleccionados para MIV fueron lavados una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37, equilibrado previamente a 38.5°C en incubador con 5% de CO_2 y atmósfera saturada de humedad durante aproximadamente 3 h.

Grupos de 50 ovocitos fueron cultivados en 50 ml de medio de maduración NCSU-37 suplementado, durante un período de 20-22 h en incubador a 38.5°C en atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO₂. Pasadas 20-22 h de cultivo, los COCs fueron transferidos a NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante otras 20-22 h (Funahashi y Day, 1993).

3.6. Preparación de soluciones y reactivos

3.6.1 Preparación de soluciones de Percoll®

Se preparó una solución osmótica de Percoll® (Pharmacia) al 90% siguiendo el protocolo descrito por Parrish *et al.* (1995). A partir de esta solución, se prepararon las de Percoll® 70% y 45% mediante diluciones en BTS. El protocolo de preparación de la solución de Percoll® 90%, viene reflejado en la *tabla 3-6*.

Tabla 3-6. Solución de Percoll® 90% (Parrish *et al.*, 1995).

Componente	Concentración (M)
NaCl	0.79
HEPES	0.1
KCl	1
NaH ₂ PO ₄	0.1
NaHCO ₃	0.15
CaCl ₂	1
MgCl ₂	0.1
Lactato sódico	0.001
Percoll®	90%(v/v)

3.6.2 Preparación de solución PBS-BSA

La solución de PBS-BSA se utilizó para el lavado espermático y se preparó adicionando a una solución de PBS, 0.3% de BSA (fracción V, A-9647) en el momento de uso.

3.6.3 Soluciones y reactivos para la medición de Ca²⁺ intracelular

◆ **Indicador Fura-2AM** (1-[6-Amino-2-(5-carboxi-2-oxazolil)-5-benzofuraniloxi]-2-(2-amino-5-metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacético pentaacetoximetil éster). Se preparó en DMSO (2.5 μM), posteriormente se alicuotó en un volumen de 25 μl y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

◆ **Medio para carga con indicador Fura-2AM** (*Non capacitating medium, NCM*). Esta solución se elaboró cada vez que iba a ser utilizada (*Tabla 3-7*).

Tabla 3-7. Composición del medio NCM (Tardif et al., 2001).

Componentes	Concentración (mM)
KCl	2.7
KH ₂ PO ₄	1.5
Na ₂ HPO ₄	8.1
NaCl	137
Glucosa	5.55
Piruvato	2

◆ **Ácido Plurónico [20%p/v]**. Se disolvieron 100mg de ácido plurónico en 500 μl de DMSO. Se conservó a temperatura ambiente.

◆ **Tritón X-100**. Se preparó en agua purificada al 0.05% (v/v).

◆ **Solución EGTA-Trizma base**. Se elaboró en agua purificada con una concentración de 40 mM para el EGTA y de 180 mM para el trizma.

3.6.4 Preparación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA)

La solución stock de H₂DCFDA (*Invitrogen*) se preparó en DMSO (1 mM), posteriormente se procedió a su almacenamiento a -20°C en alícuotas de 25 μl hasta el momento de uso.

3.6.5 Preparación de Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro 1

La solución stock de M540 (*Invitrogen*) se preparó en DMSO (1 mM), mientras que la solución stock de Yo-Pro 1 fue de 25 μ M en este mismo diluyente. A continuación, se almacenaron a -20°C en alícuotas de 25 μ l hasta el momento de uso.

3.6.6 Preparación de ioduro de Propidio (IP) y de lectina PNA-FITC

Se elaboró una solución stock de ioduro de Propidio (IP) (*Invitrogen*) en PBS (500 μ g/ml). Alícuotas de 200 μ l de la solución stock se conservaron a -20°C hasta el momento de uso.

La lectina utilizada fue *Peanut Agglutinin* (PNA) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El contenido de FITC en la lectina fue de 6 mol/mol de PNA. Posteriormente, la lectina se diluyó en PBS hasta alcanzar una concentración de 200 μ g/ml, procediéndose a continuación a su almacenamiento a -20°C en alícuotas de 250 μ l hasta el momento de uso.

3.7. Procesado de los espermatozoides para inducir la capacitación

Las muestras espermáticas se procesaron según se describe a continuación:

◆ **Espermatozoides no tratados (NL).** Estas muestras no recibieron ningún lavado, únicamente se resuspendieron en medio TALP previo a la fecundación, ajustando la concentración espermática a 10^5 células ml^{-1} y en NCM a igual concentración para realizar la medición de Ca^{2+} intracelular.

◆ **Espermatozoides lavados en medio PBS suplementado con 0.3% de BSA** (fracción V, A-9647) **(PBS-BSA).** Las muestras seminales fueron sometidas a tres centrifugaciones de 900 g durante 10 minutos cada una en PBS suplementado

con 0.3% de BSA. En la tercera centrifugación, el sedimento o *pellet* resultante fue resuspendido a una concentración de 10^5 espermatozoides ml^{-1} en medio NCM y en medio TALP.

◆ **Espermatozoides lavados a través de gradiente de Percoll® (Percoll).** Las muestras espermáticas contenidas en un volumen de 0.5 ml fueron depositadas sobre una columna de Percoll® de doble banda, constituida por 2 ml de la solución osmótica de Percoll® 45%, que a su vez se depositaba sobre 2 ml de la solución de Percoll® 90% (para espermatozoides eyaculados) o sobre Percoll® 70 (para espermatozoides epididimarios). Seguidamente, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente (700 g, 30 min) y el *pellet* resultante, tras resuspensión en BTS, se centrifugó de nuevo a 100 g, 10 minutos. La concentración se ajustó de igual forma que en los casos anteriores.

La utilización del gradiente de Percoll® 45/70 para el procesamiento de los espermatozoides epididimarios está basada en los resultados previos de Suzuki y Nagai (2003). El ajuste en la densidad de la columna es debida a que este tipo de espermatozoides, posiblemente por el número de gotas citoplasmáticas que de forma natural presentan, son incapaces de atravesar la banda de Percoll® 90%.

3.8. Análisis de la capacitación espermática

La capacitación espermática se evaluó mediante los siguientes procedimientos metodológicos, que posteriormente serán analizados con detalle:

- ◆ Análisis computerizado de la motilidad espermática (CASA).
- ◆ Medición del contenido de Ca^{2+} intracelular.
- ◆ Medición de la generación de ROS.
- ◆ Evaluación de las modificaciones lipídicas de la membrana espermática.
- ◆ Estudio de la reacción acrosómica.
- ◆ Estudio de la penetración *in vitro* de ovocitos porcinos madurados *in vitro*.

3.8.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)

El desarrollo de los sistemas informáticos de digitalización de imágenes arroja una nueva perspectiva para estudiar detalladamente el cambio en el movimiento que experimentan los espermatozoides una vez que se han capacitado.

Los parámetros de motilidad se determinaron usando el programa de análisis de imagen *Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, Barcelona)* (Figura 3.3). Los parámetros estudiados fueron: porcentaje de motilidad, motilidad progresiva (Mot Prog), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH) y frecuencia de batida de cabeza (BCF). Las unidades de medición y la descripción de los parámetros se detallan en la *tabla 3-8*.

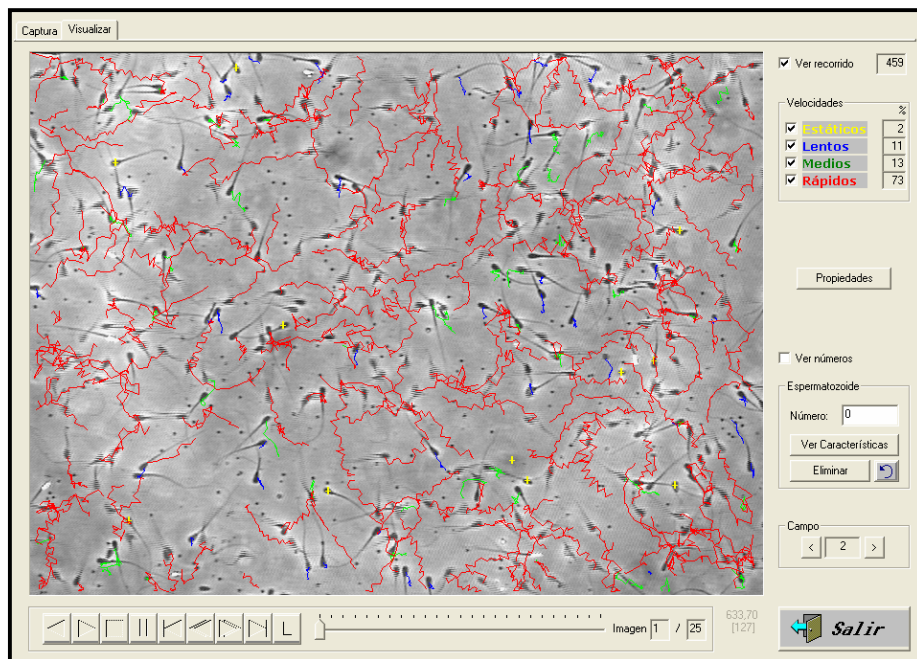


Figura 3-3. Software empleado en la medición de la motilidad de los espermatozoides mediante análisis de imagen (SCA).

Tabla 3-8. Parámetros de motilidad evaluados mediante análisis de imagen (SCA).

PARÁMETRO (unidad)	DEFINICIÓN
Motilidad Progresiva Mot Prog (%)	Porcentaje de espermatozoides motiles que presentan movimiento progresivo o lineal.
Motilidad Mot (%)	Porcentaje estimado de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento.
Velocidad curvilínea VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria en función del tiempo.
Velocidad Media VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.
Índice de linealidad LIN (%)	Relación porcentual entre VSL y VCL.
Índice de rectitud STR (%)	Relación porcentual entre VSL y VAP.
Índice de oscilación WOB (%)	Relación porcentual entre VAP y VCL.
Amplitud máxima desplazamiento lateral cabeza espermatozoide ALH (μm)	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Frecuencia de batido BCF (Hz)	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.

Después de los tratamientos de capacitación, los espermatozoides se resuspendieron en el medio TALP, de esta suspensión se tomó una microgota (7 μl) y se colocó en un portaobjetos situado sobre una placa térmica a 37°C con un cubreobjetos (24x24 mm). Se evaluaron al menos 4 campos por muestra contando como mínimo 200 espermatozoides por campo. Estas imágenes se obtuvieron con un microscopio de contraste de fases (Leica) 200x. Aquellos espermatozoides con una velocidad media (VAP) igual o inferior de 20 $\mu\text{m}/\text{s}$ se consideraron no mótiles.

Una vez realizada la captura de imágenes, la información obtenida se transfirió a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en transcriptores de motilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento y el desplazamiento de la cabeza espermática.

3.8.2 Determinación de la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide mediante espectrofluorimetría

Para medir el Ca^{2+} libre intracelular, los espermatozoides tratados con los tres sistemas de capacitación fueron incubados con $2.5 \mu\text{M}$ de Fura-2AM en NCM durante 45 min a 37°C . Pasado este tiempo el Fura-2AM extracelular que no había sido ingresado por la célula se eliminó mediante centrifugación (700 g, 5 min).

A continuación, el *pellet* se resuspendió en medio NCM ajustando la concentración a 3×10^8 células ml^{-1} , incubando durante 15 minutos a 37°C en ausencia de luz. Finalmente, los espermatozoides se centrifugaron de nuevo (700 g, 5 min) y se resuspendieron en medio TALP; seguidamente la muestra se depositó en el espectrofluorímetro durante 60 minutos de incubación para la cuantificación de la fluorescencia y la posterior determinación de la concentración de Ca^{2+} .

3.8.2.1 Cuantificación de fluorescencia

Para la cuantificación de la fluorescencia se introdujeron alícuotas de 2 ml de la suspensión espermática en la cubeta de un espectrofluorímetro (*Aminco-Bowman 2 Spectronic Unicam*) equipado con el programa *AB2 Luminiscence Spectrometer 5.31*. El sistema consta de un dispositivo de microagitación que permite mantener las células en suspensión y al mismo tiempo estar atemperadas a 37°C , mediante un sistema vehiculador de agua a temperatura constante. Inicialmente realizamos barridos de excitación (300-400 nm λ) y de emisión (450-550 nm λ), para encontrar las longitudes de onda con las que se obtenían la excitación máxima y el punto isobéptico de la molécula Fura-2AM, así como el

valor de máxima emisión. Como resultado encontramos que los picos de máxima y mínima fluorescencia se hallaban en valores en torno a 340 y 380 nm λ respectivamente, y la emisión máxima se registró a 505 nm λ . Por consiguiente, las suspensiones celulares fueron excitadas alternativamente a 340/380 nm λ y la fluorescencia emitida registrada a 505 nm λ .

3.8.2.2 Transformación de fluorescencia en concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Los valores de fluorescencia suministrados por el sistema de detección se sometieron a una transformación para la cuantificación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El primer paso fue la realización de una calibración de nuestro sistema empleando un *kit* de soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (*Invitrogen*). Mediante este procedimiento fuimos capaces de determinar la constante de disociación del indicador Fura-2AM para el ión Ca^{2+} en nuestras condiciones experimentales. La constante de disociación (K_d) de un indicador se define como el punto de saturación de su molécula al 50% y se expresa como una concentración (nM). Usando la fluorescencia emitida por el indicador en presencia de las diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ que presentan las soluciones de este *kit* se calculó el valor de esa constante. Así pues, alícuotas de 2 ml de cada una de las soluciones en presencia de 2.5 μM de sal de pentapotasio de Fura-2AM se introdujeron en la cubeta del espectrofluorímetro y se realizaron barridos de excitación entre 300 y 400 nm λ y la fluorescencia se midió a 505 nm λ .

Representando los cambios en la fluorescencia emitida por las muestras frente a la $[\text{Ca}^{2+}]$ obtuvimos una representación lineal en la que el valor que adquiere la variable X cuando Y es igual a 0 nos determina el logaritmo decimal de la K_d del Fura-2AM para Ca^{2+} . De esta manera obtuvimos un valor para la K_d de 224 nM, valor que fue empleado en la realización de los cálculos pertinentes.

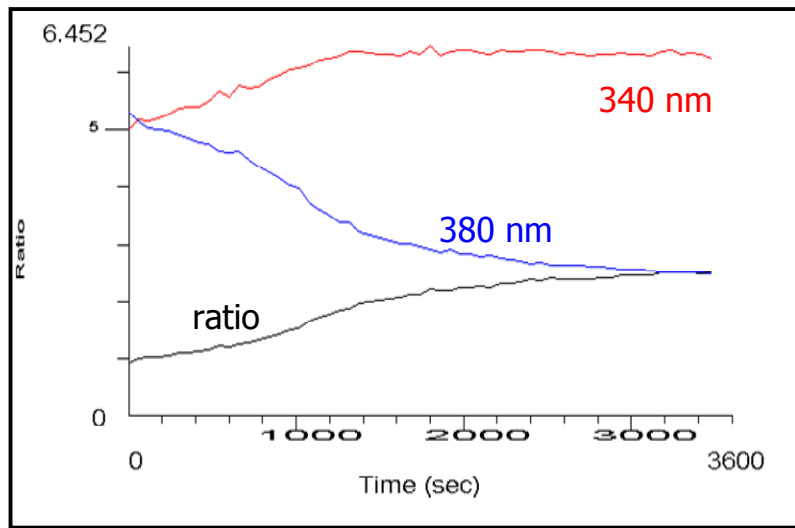
Para la monitorización de los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) las suspensiones espermáticas fueron excitadas

alternativamente a 340 y 380 nm λ registrando la fluorescencia emitida a 505 nm λ . Todos los agentes ensayados se añadieron directamente en la cubeta del espectrofluorímetro a la concentración deseada.

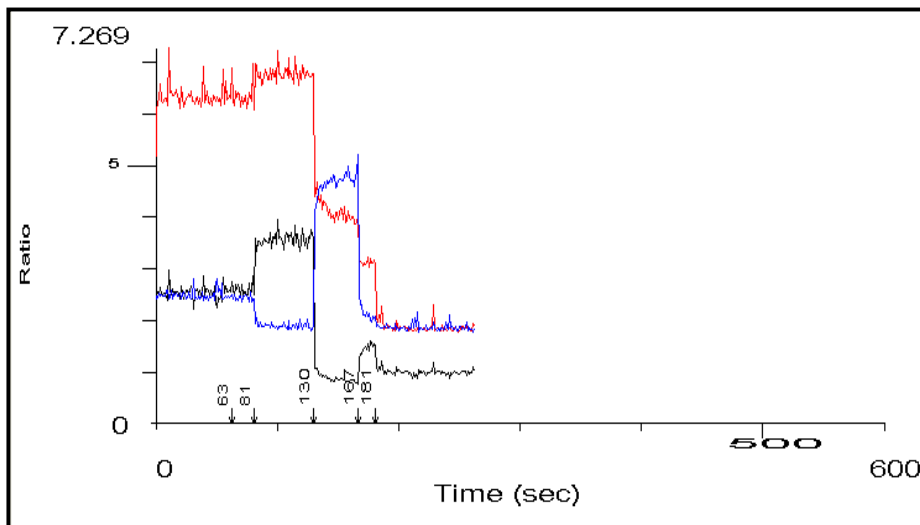
Para la determinación de los valores de autofluorescencia se tomaron 2 ml de una suspensión espermática que no había sido incubada con el indicador y, de igual forma que en un experimento normal, se excitaron alternativamente a 340 y 380 nm λ , registrando la emisión a 505 nm λ . Con ello se obtuvieron dos valores, uno para cada longitud de onda de excitación, que posteriormente fueron utilizados en los cálculos de la $[Ca^{2+}]_i$. En ningún caso los valores de autofluorescencia superaron el 10 % de la fluorescencia emitida cuando el Fura-2AM estuvo presente. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó a partir de la *ratio* (**R**) de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda de excitación (340/380 nm λ) (Figura 3-4. A), previa sustracción de los valores de autofluorescencia (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Al término de cada experimento, y cuando la señal emitida alcanzaba un valor estable, se procedió a la calibración (Figura 3-4. B), consistente en la adición de:

◆ **Tritón X-100.** Se trata de un detergente que va a disolver todas las membranas celulares de la muestra espermática, permitiendo que todo el Ca^{2+} disponible se una al Fura-2AM. El Tritón va a producir una medida máxima de fluorescencia al permitir que todo el Ca^{2+} existente en la muestra se pueda unir al indicador. En la gráfica correspondiente, este hecho queda reflejado en una subida brusca de la *ratio* produciendo un pico de fluorescencia máxima (Figura 3-4. B, "time 81 sec"). El volumen de Tritón X-100 empleado fue de 40 μ l.

◆ **EGTA.** Es un agente quelante que se va a unir a todo el Ca^{2+} de la muestra dejando libre la molécula de indicador, de manera que en la gráfica (Figura 3-4. B, "time 130 sec") aparece una disminución brusca en la *ratio* al haber sido el Ca^{2+} quelado y no estar ya unido al Fura-2AM. La dosis de EGTA empleada fue de 200 μ l.



A



B

Figura 3-4. Curvas obtenidas en los estudios de medición de $[Ca^{2+}]_i$ por espectrofluorimetría. **A.** Niveles de fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda de excitación (340/380 nm λ) y gráfica de la ratio durante los 3600 segundos de duración del ensayo. **B.** Curva de calibración, realizada al final de cada experimento una vez que la señal emitida alcanzaba un valor estable. Tiempo 81 seg: adición de Tritón X-100. Tiempo 130 seg: adición de EGTA.

Todos los experimentos fueron realizados dentro de las dos horas siguientes a la incubación de las células con el indicador. El cálculo de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizó mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times (R - R_{min} / R_{max} - R) \times Sf / Sb$$

Donde, **R**: ratio de la fluorescencia a 340/380 nm λ . **R_{min}**: ratio de fluorescencia en medio libre de Ca^{2+} . **R_{max}**: ratio de fluorescencia en condiciones de saturación. **Sf**: intensidad de fluorescencia sin Ca^{2+} (excitación 380 nm λ). **Sb**: intensidad de fluorescencia en condiciones de saturación de Ca^{2+} (excitación 380 nm λ) y **Kd**: constante de disociación de Fura-2AM para Ca^{2+} .

3.8.3 Evaluación, mediante citometría de flujo, de la producción de ROS, del desorden lipídico en membrana espermática y de la RA

El análisis fue realizado en el citómetro de flujo *Coulter Epics XL* (*Beckman Coulter*) con láser de argón (480 nm λ) a 15 mW refrigerado por aire. La intensidad de fluorescencia de los espermatozoides fue analizada después de una selección primaria basada en el tamaño y la complejidad celular para excluir partículas contaminantes, gotas citoplasmáticas libres, aglutinaciones y células somáticas. Los datos aportados por el citómetro fueron analizados usando el programa *Expo32ADC* (*Beckman Coulter*).

La principal ventaja que presentan los ensayos realizados mediante citometría de flujo, es que este sistema permite medir varios parámetros de miles de células individuales en pocos minutos, lo que conduce a la posibilidad de medir subpoblaciones cambiantes.

3.8.3.1 Evaluación de la producción de ROS

La evaluación de la producción de ROS se realizó mediante la incubación de los espermatozoides en presencia de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

(H₂DCFDA) (Gadea *et al.*, 2005). Para ello, a 1 ml de la muestra a analizar con una concentración espermática de 10x10⁶ células ml⁻¹ se le añadieron 5 µl de la solución stock del H₂DCFDA (concentración final 5 µM). Transcurridos 15 minutos se procedió a su medición en citómetro de flujo.

Se trata de una técnica fluorogénica comúnmente empleada para detectar la presencia y producción celular de ROS. El H₂DCFDA es un compuesto orgánico no fluorescente que en presencia de esterasas y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y mediante un proceso combinado de hidrólisis y oxidación se convierte en diclorofluoresceína (DCF), sustancia altamente fluorescente con espectros de absorción y emisión de 490 nm λ y 529 nm λ, respectivamente.

La fluorescencia verde fue recogida con el sensor FL1 usando un filtro de banda de 525 nm λ. Las medidas fueron expresadas como unidades de intensidad de fluorescencia verde, siendo usado como indicador de generación de ROS.

3.8.3.2 Evaluación del desorden lipídico en membrana espermática

Para detectar el incremento en el desorden lipídico las muestras espermáticas fueron teñidas con Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro 1 (Harrison *et al.*, 1996). Para cada ml de muestra espermática diluida en BTS (10 x 10⁶ células) se adicionaron 2.7 µl de la solución stock M540 y 1 µl de la solución stock de Yo-Pro 1. Transcurridos 10 minutos se procedió a la medición en citómetro de flujo.

La fluorescencia verde que emite el Yo-pro es detectada por el sensor FL1 con filtro de banda de 525 nm λ, mientras que la fluorescencia roja corresponde al colorante M540 es recogida en el detector FL3 (filtro 650 nm λ). Aún cuando las células son distribuidas en cuatro subpoblaciones (2x2), los espermatozoides se clasifican en tres categorías (Figura 3-5):

- ◆ **1.** Baja intensidad de fluorescencia roja (FL3) y verde (FL1), que corresponde con bajo nivel de desorden lipídico y células vivas. Se trata por tanto, de células viables no capacitadas.
- ◆ **2.** Alta intensidad de fluorescencia roja (FL3) y baja intensidad verde (FL1), que se corresponde con alto nivel de desorden lipídico y células vivas. Son células viables capacitadas.
- ◆ **3.** Alta intensidad de fluorescencia verde (FL1) que corresponde con células muertas.

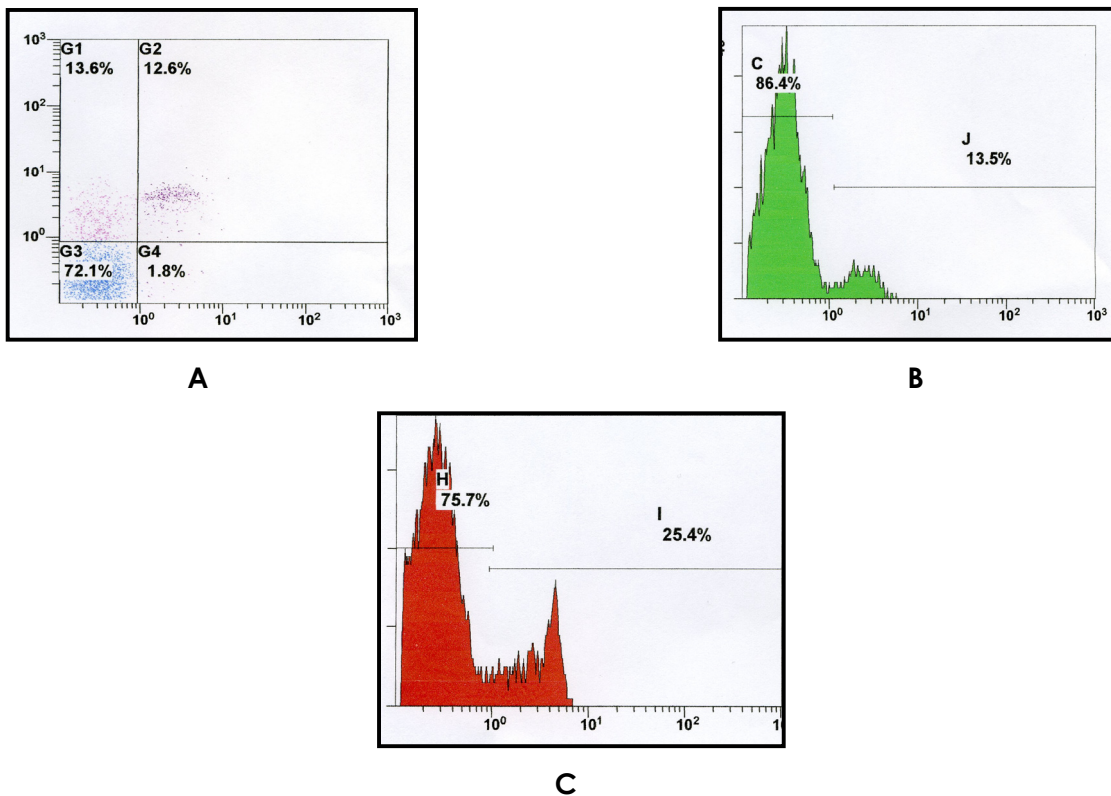


Figura 3-5. Imágenes obtenidas con citometría en el estudio del desorden lipídico. **A.** Distribución de las poblaciones espermáticas tras la tinción. **B.** Tinción verde en FL1 del Yo-Pro, en el que se aprecian la población de espermatozoides vivos (derecha) y muertos. **C.** Tinción roja en FL3 producida por M540, en la que se aprecia la población de espermatozoides con bajo (derecha) y alto desorden lipídico.

3.8.3.3 Evaluación de la reacción acrosómica

En nuestro experimento, elegimos la PNA-FITC debido a que en experiencias previas (Vázquez *et al.*, 1993) se había mostrado que es una lectina con alta afinidad al contenido del acrosoma. De este modo, la PNA detecta aquella población de espermatozoides que en el momento del análisis experimentan RA.

Las muestras espermáticas (10×10^6 células ml^{-1}) fueron incubadas con $2 \mu\text{l}$ de lectina PNA marcada con FITC (FITC-PNA, 100 mg/ml) y $5 \mu\text{l}$ de IP (500 mg/ml solución stock), a temperatura ambiente durante 10 minutos. La fluorescencia emitida fue medida usando el sensor FL-1 a 525 nm λ para la detección de FITC-PNA y el sensor FL-2 a 575 nm λ para la detección de IP. Se determinaron tres subpoblaciones espermáticas, a saber (Figuras 3-6 y 3-7. A-B):

- ◆ 1. Espermatozoides vivos con acrosoma intacto.
- ◆ 2. Espermatozoides vivos con acrosoma dañado.
- ◆ 3. Espermatozoides muertos con y sin acrosoma intacto.

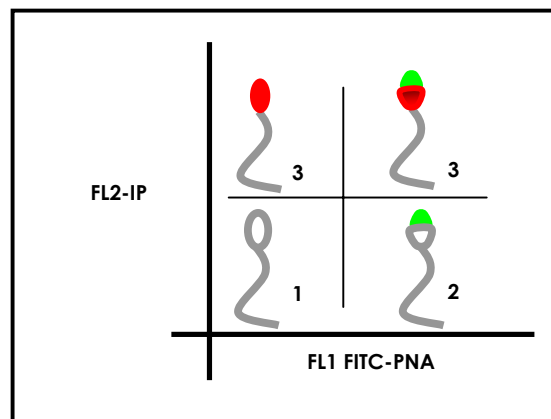


Figura 3-6 Esquema de las poblaciones espermáticas obtenidas con el uso de FITC-PNA e IP en la evaluación de la reacción acrosómica.

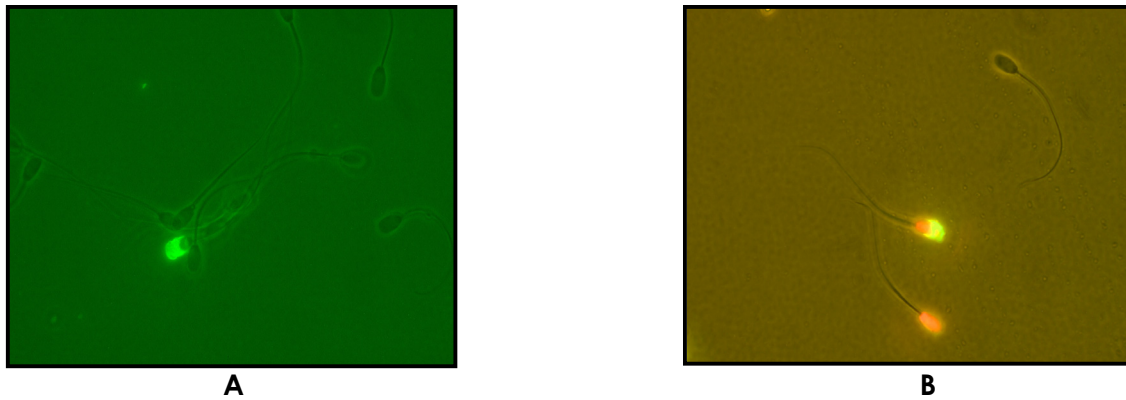


Figura 3-7. Imagen de microscopía de fluorescencia donde aparecen las poblaciones espermáticas obtenidas con la tinción FITC-PNA e IP. **A.** Poblaciones 1 y 2. **B.** Poblaciones 1 y 3.

3.8.4. Estudio de la penetración *in vitro* de ovocitos madurados *in vitro*

El medio TALP usado para los ensayos de FIV fue básicamente el mismo empleado por *Rath et al.* (1999) (Tabla 3-4). Para el cultivo posterior, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico. El pH se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO₂, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 3 h antes de su uso.

Los ovocitos, cultivados durante 40-42 h en el medio de maduración NCSU-37, fueron denudados de las células del cúmulo mecánicamente mediante ligeras aspiraciones con pipeta automática (*Figura 3-1. E*). Posteriormente, los ovocitos denudados fueron lavados 3 veces en medio TALP y grupos de 30-35 ovocitos fueron depositados en microgotas con 250 µl del medio de FIV, equilibrado previamente a 38.5°C y con 5% CO₂ en incubador, cubiertas con aceite mineral en placas Nunc de 4 pocillos. Las placas con los ovocitos fueron introducidas en el incubador a la espera de concluir el procesado de los espermatozoides. Las suspensiones espermáticas, procedentes de los distintos

tratamientos de capacitación, fueron adicionadas en su correspondiente pocillo con los ovocitos, ajustándose la concentración espermática a 5×10^4 células ml^{-1} .

Transcurridas 2 y 4 h de cocultivo, los ovocitos se lavaron en PBSm a 37°C , eliminándose mecánicamente el exceso de espermatozoides adheridos. Los ovocitos se montaron sobre portaobjetos y se fijaron, durante 24-48 h en una solución de ácido acético: etanol (1:3, v/v) a temperatura ambiente. Después de la fijación, los ovocitos se tiñeron con lacmoid al 1% (Chang, 1952).

La penetración espermática *in vitro* fue verificada en microscopía de contraste de fases (Leica) a 400x y 1000x. Los ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV), metafase I, anafase I o telofase I fueron considerados inmaduros y desechados del estudio. Los ovocitos no fecundados en metafase II fueron clasificados como no penetrados (Figura 3-8. A).

Se consideró que un ovocito maduro estaba penetrado cuando presentaba en su interior cabeza/s espermática/s (descondensadas o no) y/o pronúcleo/s masculino/s, con su correspondiente flagelo espermático y dos corpúsculos polares, además del pronúcleo femenino (Figura 3-8. B-C-D). Un ovocito se consideró degenerado cuando su citoplasma ofrecía un aspecto granuloso y no se visualizaba material cromosómico en su interior

Para los estudios de penetración *in vitro* con espermatozoides epididimarios y eyaculados se valoraron el porcentaje de ovocitos maduros penetrados, el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado y los porcentajes de activación ovocitaria (estadios de anafase II, telofase II y de pronúcleo femenino) y de activación espermática (cabezas espermáticas descondensadas y formación de pronúcleo masculino).

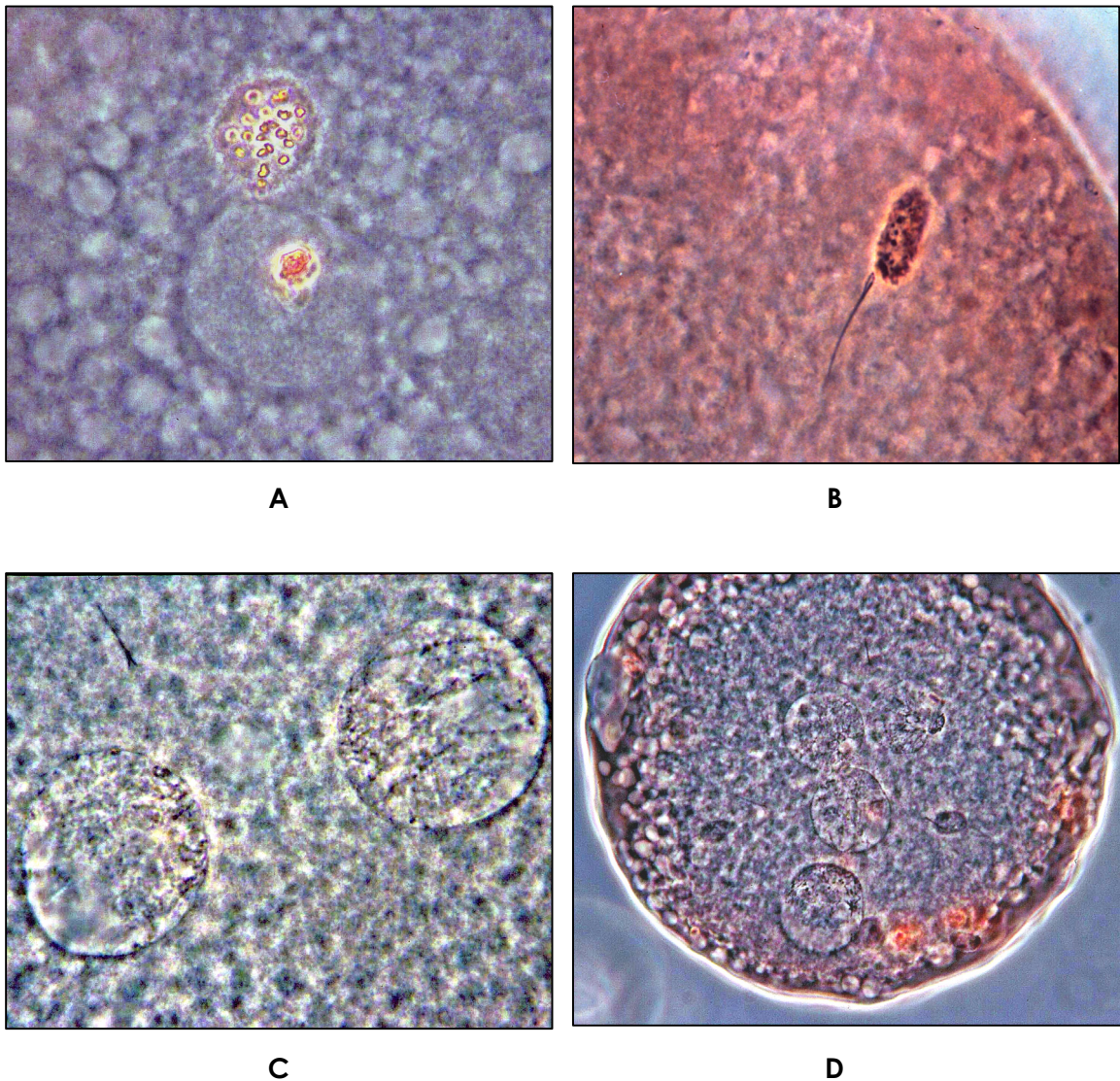


Figura 3-8. Valoración de la penetración *in vitro* de ovocitos porcinos mediante tinción con lacmoid al 1%. Visualización en microscopio de contraste de fases. **A.** Ovocito en Metafase II, con los cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático y primer corpúsculo polar (1000x). **B.** Espermatozoide con la cabeza descondensada (1000x). **C.** Ovocito porcino con dos pronúcleos y restos de flagelo espermático (1000x). **D.** Ovocito porcino polispérmico, se aprecian varios pronúcleos (4) y cabezas espermáticas descondensadas (400x).

3.9 Diseño experimental

Se han analizado tres tratamientos (NL, PBS-BSA y Percoll) utilizados comúnmente para la capacitación espermática sobre dos tipos de espermatozoides: epididimarios y eyaculados. El efecto del tratamiento sobre estos dos tipos de espermatozoides, fue evaluado mediante el análisis de seis parámetros espermáticos en diferentes experimentos:

3.9.1. Experimento 1. Estudio de parámetros de movimiento en espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a tres tratamientos de capacitación

En esta experiencia, después de realizar los tres métodos de capacitación, los espermatozoides fueron resuspendidos en medio TALP y tras 5 minutos de incubación a 37°C se procedió al análisis computerizado de la motilidad mediante sistema CASA. Se realizaron 5 replicados, estudiándose en un mismo replicado los espermatozoides epididimarios y los eyaculados.

3.9.2. Experimento 2. Cinética de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides epididimarios y eyaculados capacitados in vitro mediante tres tratamientos de capacitación

3.9.2.1. Experimento 2.1. Estudio de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides eyaculados incubados en medio capacitante TALP

Para determinar la cinética de la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides, las células fueron cargadas con el indicador Fura-2AM y seguidamente fueron resuspendidas en medio TALP y tras 5 minutos de incubación a temperatura de 37°C, se procedió a su lectura en espectrofluorímetro. Se tomaron mediciones cada segundo durante 60 minutos.

3.9.2.2. Experimento 2.2. Determinación de la entrada de Ca²⁺ en espermatozoides epididimarios y eyaculados con tres tratamientos de capacitación

Para determinar la cinética de la entrada de Ca²⁺ en los espermatozoides, después de realizar los tres métodos de capacitación, la carga con el indicador Fura-2AM y los tiempos de medición, fueron los mismos que los empleados en el experimento 2.1.

Para la cuantificación de la entrada de Ca²⁺ utilizamos siete epidídimos procedentes de animales sacrificados en matadero y siete eyaculados procedentes de cuatro verracos de fertilidad probada. Esta experiencia se llevó a cabo en 14 replicados (7 para epidídimo y 7 para eyaculado). El motivo de no trabajar en el mismo replicado con espermatozoides epididimarios y eyaculados se debió al tiempo necesario para la preparación y medición de las muestras en el espectrofluorímetro, siendo imposible su análisis conjunto.

3.9.3. Experimentos 3, 4 y 5. Efecto de tres tratamientos de capacitación de espermatozoides epididimarios y eyaculados sobre la generación de ROS, modificaciones lipídicas de membrana espermática y proceso de reacción acrosómica.

Los espermatozoides una vez capacitados por los tres métodos descritos previamente, se colocaron sobre placas de Petri de 2 mm Ø y se colocaron en incubador de CO₂ a 37°C. Cada 15 minutos se tomó una muestra resuspendida con el fluorocromo correspondiente y se realizó la lectura en el citómetro de flujo de cada muestra. El tiempo de lectura fue de 120 ó 135 minutos, para generación de ROS y estudio de modificaciones lipídicas de membrana. La reacción acrosómica fue evaluada a los 30 min de la incubación. En todos los casos se ensayaron 5 replicados, estudiándose en el mismo replicado, los espermatozoides epididimarios y eyaculados.

3.9.4 Experimento 6. Determinación de la penetración espermática en ovocitos madurados *in vitro* utilizando espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a tres tratamientos de capacitación

En este experimento se emplearon un total de 1282 ovocitos madurados *in vitro*. Cada día de ensayo se estudiaron dos tiempos de incubación (2 y 4 h) con espermatozoides epididimarios y eyaculados tratados con los tres métodos de capacitación. Se realizaron un total de 5 replicados.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el paquete informático *Systat 11®*, empleándose como hoja de cálculo el *software Microsoft Excel®*.

La información de cada variable analizada se expresó como media \pm error estándar de la media (EEM). En los casos en donde la información obtenida correspondía a porcentajes, éstos fueron transformados según el modelo binomial de parámetros.

En todos los análisis estadísticos se utilizó el modelo lineal general. Todas las experiencias fueron analizadas por ANOVA de una vía, excepto en aquellas en donde se evaluaron dos factores (tipo de tratamiento y tipo de espermatozoide), para lo cual se utilizó un ANOVA de dos vías. Cuando el ANOVA señaló efecto significativo, los valores fueron comparados por una prueba de comparación de medias de *Tukey*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)

El tratamiento de los espermatozoides y su incubación en medio TALP inducen un incremento significativo en todos los parámetros de motilidad estudiados comparados con el grupo control.

Cuando se evalúa el efecto de los diferentes tratamientos sobre las células epididimarias se observan valores significativamente mayores de WOB y menores de ALH en las muestras sometidas a un gradiente de Percoll® en comparación con los otros dos tratamientos espermáticos (*Tabla 4-1*). Al analizar el efecto del tratamiento espermático sobre los parámetros de motilidad en espermatozoides eyaculados, se observó que el grupo NL mostró un porcentaje de motilidad superior al grupo PBS-BSA. Esta diferencia en la motilidad total no fue determinada en el porcentaje de motilidad progresiva. Por otra parte, se observaron diferencias en el patrón de movimiento (*Tabla 4-2*). Así, el grupo Percoll® presentó un patrón con menor velocidad curvilínea (VCL) y menor amplitud lateral de cabeza (ALH) pero con mayor linealidad (LIN) y rectitud (STR).

Si evaluamos conjuntamente los datos (epididimario vs. eyaculado) y usamos el ANOVA de dos vías con origen y tratamiento espermático como factores, eliminando del análisis el grupo control, podemos observar en términos generales que los espermatozoides epididimarios mostraron mayor motilidad (total y progresiva), mayores velocidades (VCL, VSL y VAP) y menor ALH que los eyaculados (*Tabla 4-3 A*). Si analizamos únicamente los tratamientos de forma conjunta, observamos que el grupo Percoll® presenta un patrón de movimiento diferente a los otros dos tratamientos con valores significativamente menores para VCL y ALH, y mayores para los parámetros LIN, STR y WOB ($p > 0.05$, *Tabla 4-3 B*).

Tabla 4-1. Parámetros de motilidad evaluados mediante CASA en espermatozoides epididimarios (media \pm EEM).

Tratamiento	Mot Prog (%)	Motilidad (%)	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
NL	37.56 \pm 1.91	72.66 \pm 2.22	88.68 \pm 3.41	41.71 \pm 2.98	59.97 \pm 3.39	44.37 \pm 1.85	66.79 \pm 1.59	64.21 \pm 1.46 a	3.35 \pm 0.09 a	5.52 \pm 0.20
PBS-BSA	40.47 \pm 2.15	75.16 \pm 2.05	87.27 \pm 2.94	41.06 \pm 2.49	57.37 \pm 2.71	43.82 \pm 1.72	66.84 \pm 1.44	63.48 \pm 1.36 a	3.32 \pm 0.09 a	5.66 \pm 0.20
Percoll	36.55 \pm 1.76	74.88 \pm 1.89	82.11 \pm 2.53	40.22 \pm 1.77	56.48 \pm 2.18	47.74 \pm 1.30	69.92 \pm 1.02	67.38 \pm 1.05 b	2.94 \pm 0.08 b	5.86 \pm 0.18
CONTROL	11.43 \pm 3.26	32.96 \pm 4.29	50.11 \pm 2.28	14.61 \pm 1.92	22.64 \pm 1.29	24.36 \pm 1.33	52.89 \pm 1.70	43.93 \pm 1.90	1.71 \pm 0.25	2.82 \pm 0.47

a,b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4-2. Parámetros de motilidad evaluados mediante CASA en espermatozoides eyaculados (media \pm EEM).

Tratamiento	Mot Prog (%)	Motilidad (%)	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
NL	31.23 \pm 3.02	67.47 \pm 2.12 a	72.72 \pm 2.69 a	35.03 \pm 2.37	50.11 \pm 2.69	46.25 \pm 2.01 a	67.58 \pm 1.55 a	66.09 \pm 1.62	2.64 \pm 0.09 a	5.78 \pm 0.21
PBS-BSA	28.09 \pm 2.73	60.35 \pm 2.43 b	71.81 \pm 2.74 a	33.31 \pm 2.09	47.99 \pm 2.52	45.32 \pm 1.87 a	67.32 \pm 1.55 a	64.91 \pm 1.52	2.66 \pm 0.09 a	5.96 \pm 0.18
Percoll	28.49 \pm 2.01	62.43 \pm 2.25 ab	64.57 \pm 2.53 b	35.66 \pm 2.06	46.38 \pm 2.23	52.61 \pm 1.79 b	75.02 \pm 1.21 b	68.84 \pm 1.40	2.31 \pm 0.09 b	5.93 \pm 0.19
CONTROL	24.50 \pm 3.91	73.54 \pm 2.33	57.36 \pm 2.07	20.93 \pm 1.17	35.50 \pm 1.90	35.89 \pm 1.37	58.32 \pm 1.32	61.25 \pm 1.93	2.04 \pm 0.06	5.96 \pm 0.22

Mot Prog: motilidad progresiva. **VCL:** velocidad curvilínea. **VSL:** velocidad rectilínea. **VAP:** velocidad media. **LIN:** índice de linealidad. **STR:** índice de rectitud. **WOB:** índice de oscilación. **ALH:** amplitud desplazamiento lateral de la cabeza. **BCF:** frecuencia de batido de la cabeza.

a,b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4-3A. Parámetros de motilidad espermática, según origen, evaluados mediante CASA (media \pm EEM).

Origen	Mot Prog (%)	Motilidad (%)	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Epididimario	38.20 \pm 1.22 a	74.23 \pm 1.50 a	86.02 \pm 1.73 a	41.00 \pm 1.38 a	57.94 \pm 1.62 a	45.31 \pm 0.97	67.85 \pm 0.80	65.03 \pm 0.85	3.21 \pm 0.06 a	5.68 \pm 0.13
Eyaculado	29.27 \pm 1.42 b	63.42 \pm 1.22 b	69.70 \pm 1.41 b	34.67 \pm 1.15 b	48.16 \pm 1.31 b	48.06 \pm 1.02	69.97 \pm 0.82	66.61 \pm 0.82	2.54 \pm 0.05 b	5.89 \pm 0.10

a, b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4-3B. Parámetros de motilidad espermática, según tratamiento, evaluados mediante CASA (media \pm EEM).

Tratamiento	Mot Prog (%)	Motilidad (%)	VCL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
NL	34.40 \pm 1.81	70.07 \pm 1.54	80.70 \pm 2.27 a	38.37 \pm 1.91	55.04 \pm 2.19	45.31 \pm 1.37 a	67.18 \pm 1.11 a	65.15 \pm 1.09 a	3.00 \pm 0.07 a	5.65 \pm 0.15
PBS-BSA	34.28 \pm 1.83	67.76 \pm 1.73	79.54 \pm 2.11 a	37.19 \pm 1.64	52.68 \pm 1.89	44.57 \pm 1.27 a	67.08 \pm 1.06 a	64.20 \pm 1.02 a	2.99 \pm 0.07 a	5.81 \pm 0.13
Percoll	32.52 \pm 1.38	68.65 \pm 1.56	73.34 \pm 1.95 b	37.94 \pm 1.36	51.43 \pm 1.62	50.17 \pm 1.11 b	72.47 \pm 0.82 b	68.11 \pm 0.87 b	2.62 \pm 0.07 b	5.90 \pm 0.13

Mot Prog: motilidad progresiva. **VCL:** velocidad curvilínea. **VSL:** velocidad rectilínea. **VAP:** velocidad media. **LIN:** índice de linealidad. **STR:** índice de rectitud. **WOB:** índice de oscilación. **ALH:** amplitud desplazamiento lateral de la cabeza. **BCF:** frecuencia de batido de la cabeza.

a, b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.2 Determinación de la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide mediante espectrofluorimetría

4.2.1. Cinética de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides eyaculados de verraco

La cinética de la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides de verraco incubados en medio TALP durante la hora de medición aparece reflejada en la *figura 4-1*. En ella se puede apreciar que la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides se incrementa de manera lineal conforme aumenta el tiempo de incubación. La media de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenida para los distintos intervalos de tiempo (0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 y 51-60 minutos) queda reflejada en la *tabla 4-4*, habiéndose encontrado diferencias significativas ($p < 0.05$) para los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre todos los intervalos analizados.

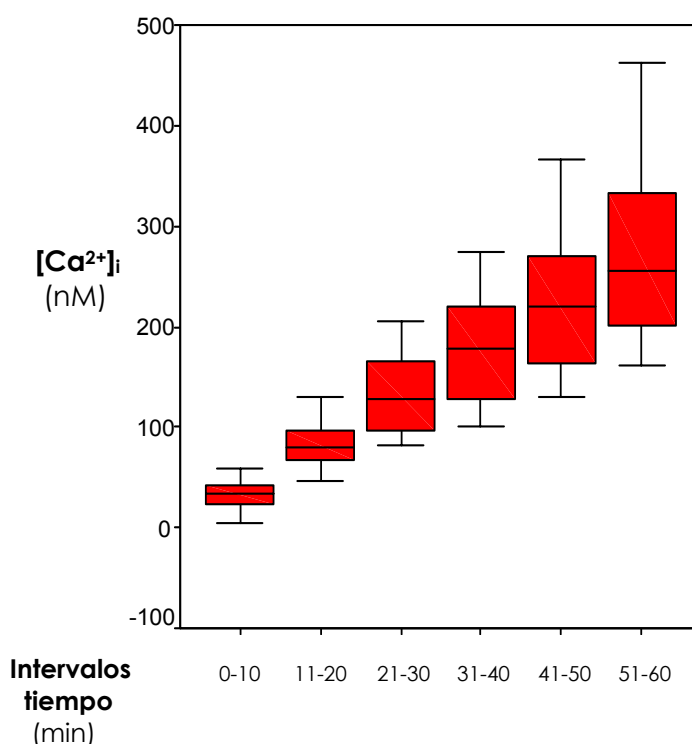


Figura 4-1. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides eyaculados porcinos según intervalos de tiempo de incubación.

Tabla 4-4. $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides eyaculados porcinos según intervalos de tiempo de incubación.

Intervalos Tiempo (min)	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
$[Ca^{2+}]_i$ ± EEM (nM)	32.40 ± 2.28	83.45 ± 3.60	131.62 ± 5.89	176.1 ± 8.31	225.54 ± 10.76	277.28 ± 14.49

4.2.2 Cinética de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides de verraco capacitados *in vitro* mediante tres sistemas de capacitación

La entrada de Ca^{2+} fue aumentando progresivamente durante 60 minutos de incubación de los espermatozoides en medio TALP y estuvo significativamente afectada por el tratamiento y por el origen de los espermatozoides. Los espermatozoides epididimarios experimentaron una menor entrada de Ca^{2+} que los eyaculados (Figuras 4-2 y 4-3) y a su vez los pertenecientes al grupo NL incorporaron menos Ca^{2+} que los de los grupos Percoll y PBS-BSA. Los espermatozoides eyaculados lavados en BSA o mediante columnas de Percoll®, mostraron una mayor y más rápida entrada de Ca^{2+} que los epididimarios (en todos los tratamientos) y que los espermatozoides eyaculados no lavados (NL).

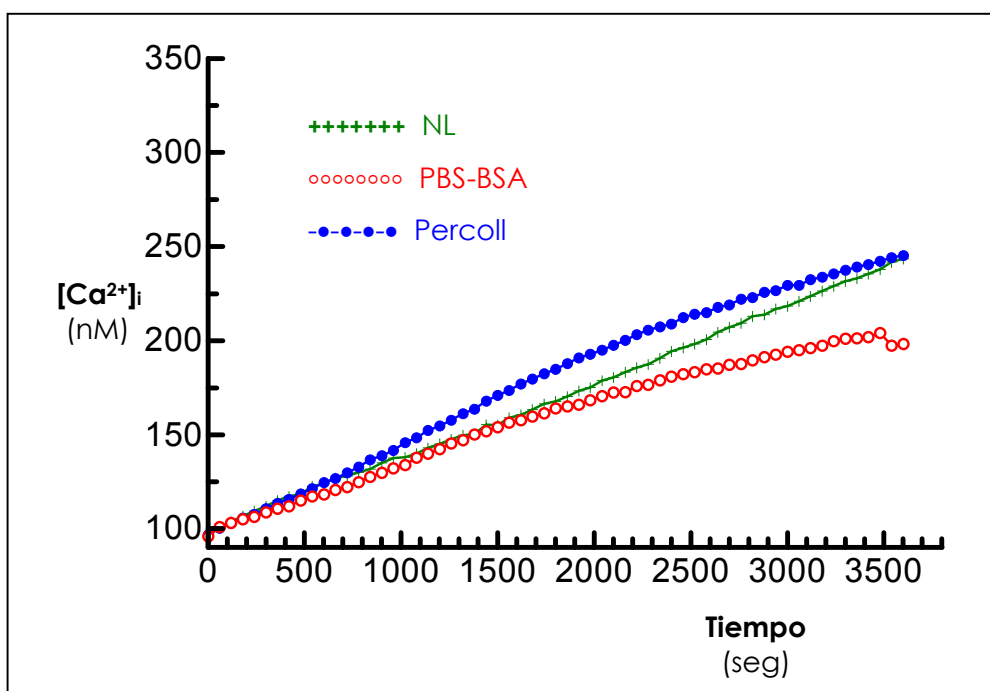


Figura 4-2. Cinética de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides epididimarios capacitados en tres tratamientos.

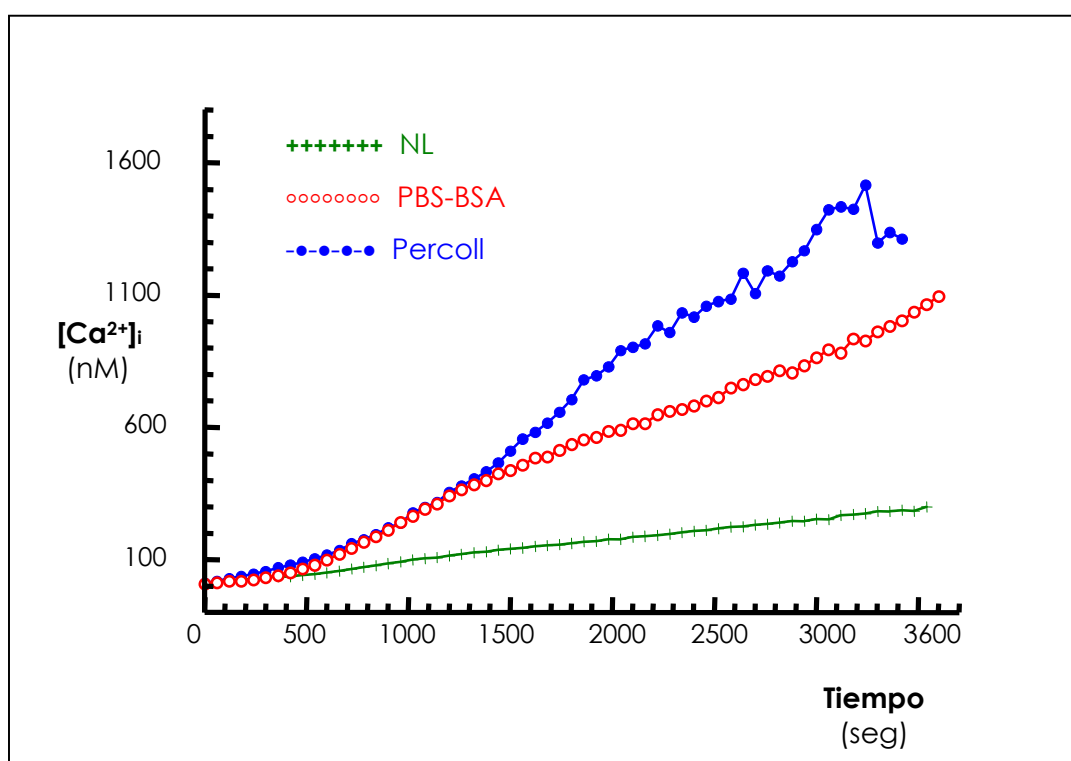


Figura 4-3. Cinética de la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides eyaculados capacitados en tres tratamientos.

En la *tabla 4-4* se refieren los valores de $[Ca^{2+}]_i$, según origen y tratamiento de capacitación, a los 60 minutos de ensayo, así como los valores medios de $[Ca^{2+}]_i$ para espermatozoides epididimarios y eyaculados capacitados por los tres sistemas. Si analizamos los datos separadamente, podemos observar que los espermatozoides epididimarios tratados mediante lavados con BSA son los que presentan una menor $[Ca^{2+}]_i$, mientras que en el caso de los espermatozoides eyaculados, es el grupo experimental NL el que tiene una menor $[Ca^{2+}]_i$.

Tabla 4-4. Valores de concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides epididimarios y eyaculados según tratamientos de capacitación.

Origen	Tratamiento	$[Ca^{2+}]_i$ (nM) 60 min	Media $[Ca^{2+}]_i$ (nM)
Epididimario	NL	236.52 ± 40.99 a	114.51 ± 3.97 a
Epididimario	PBS-BSA	137.37 ± 24.06 a	75.15 ± 3.66 b
Epididimario	Percoll	238.72 ± 49.87 a	115.86 ± 4.80 a
Eyaculado	NL	256.97 ± 59.11 a	152.27 ± 6.37 a
Eyaculado	PBS-BSA	1049.66 ± 106.02 b	660.42 ± 36.51 c
Eyaculado	Percoll	1324.35 ± 78.19 b	604.12 ± 40.14 c

a, b, c. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.3 Determinación de ROS

La generación de ROS, medida en unidades de fluorescencia (UF), se incrementó durante el tiempo de incubación estudiado (135 min) y estuvo afectada tanto por el tratamiento de capacitación usado como por el origen de los espermatozoides; sin embargo, no se encontró interacción entre ambos

efectos ($p < 0.25$). Los espermatozoides eyaculados generaron más ROS que los epididimarios durante el tiempo de incubación y de éstos, los del grupo Percoll produjeron más ROS que los espermatozoides del grupo PBS-BSA y éstos a su vez más que los del grupo NL (Tabla 4-5). El valor de ROS en espermatozoides de epidídimo tratados con Percoll® fue el mayor dentro del grupo “epididimarios” y tuvo un registro similar al de espermatozoides eyaculados no lavados (NL).

Tabla 4-5. Producción de ROS (135 min incubación), en espermatozoides epididimarios y eyaculados en sistemas distintos de capacitación.

Origen	Tratamiento	ROS (UF)
Epididimario	NL	7.66 ± 0.31 a
Epididimario	PBS-BSA	9.68 ± 0.36 b
Epididimario	Percoll	12.07 ± 0.39 c
Eyaculado	NL	12.29 ± 0.56 c
Eyaculado	PBS-BSA	13.43 ± 0.52 d
Eyaculado	Percoll	16.89 ± 0.67 e

a, b, c, d, e. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Iguals conclusiones se obtienen al evaluar los datos de forma separada según el origen de los espermatozoides. El tratamiento Percoll® induce mayor producción de ROS que el PBS-BSA y éstos a su vez más que el tratamiento NL.

En la *figura 4-4* se representa gráficamente la evolución en la generación de sustancias ROS en espermatozoides epididimarios (A) y eyaculados (B) en los tres sistemas de capacitación durante los 135 minutos de ensayo.

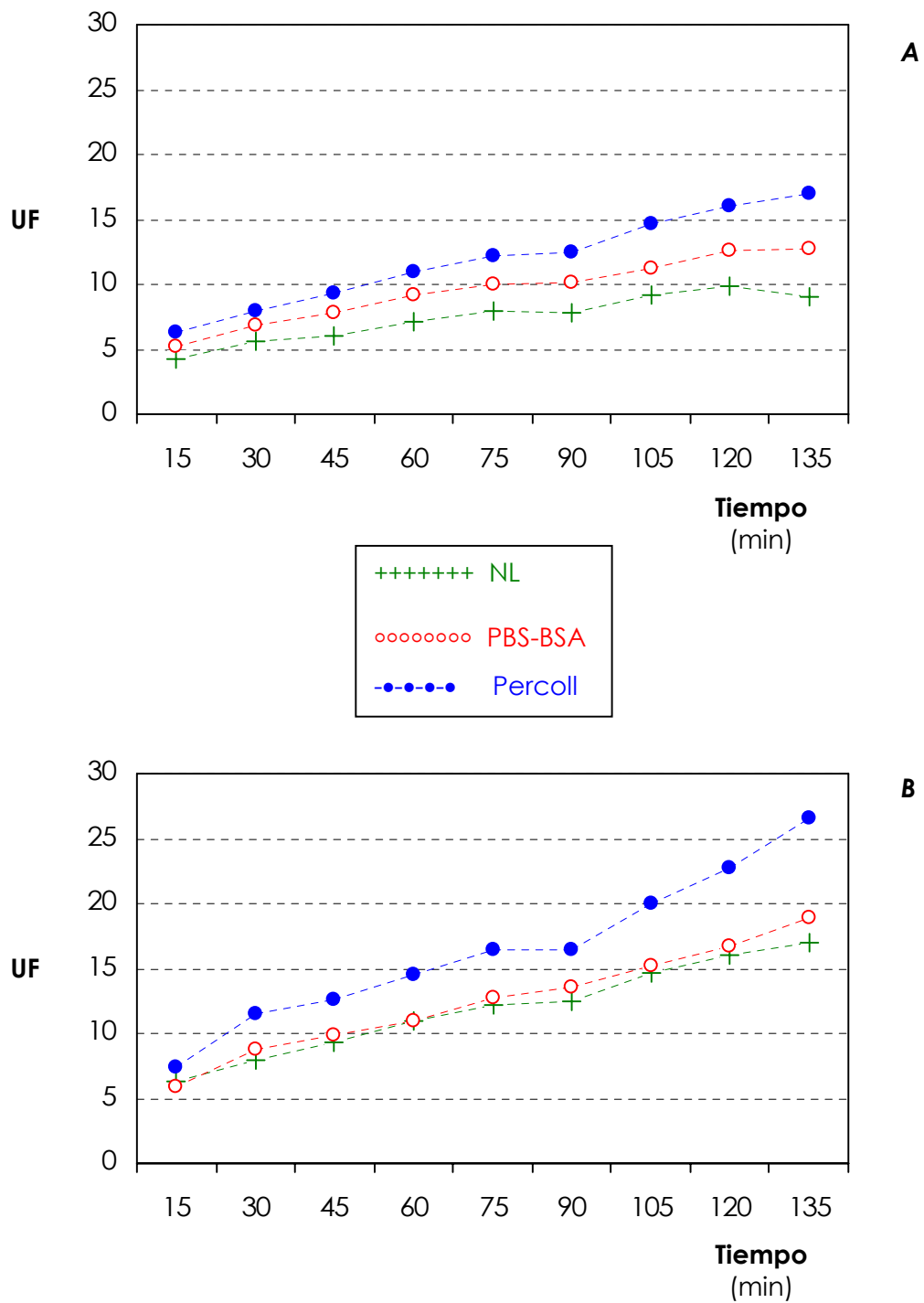


Figura 4-4. Evolución de la generación de ROS en espermatozoides epididimarios (**A**) y eyaculados (**B**) en distintos sistemas de capacitación.

4.4 Evaluación del desorden lipídico en membrana plasmática

El desorden lipídico de la membrana plasmática de los espermatozoides estudiados estuvo afectado tanto por el origen de los espermatozoides como por el tratamiento de capacitación empleado.

En cuanto al origen de los espermatozoides se refiere y, bajo nuestras condiciones experimentales, la alteración del orden lipídico se detectó con M540 desde las primeras mediciones (tiempo = 0), de manera que los valores para células viables y con mayor grado de desorden lipídico se presentaron en el grupo de espermatozoides eyaculados. En este mismo grupo el porcentaje de células muertas también se vio incrementado respecto de los espermatozoides de epidídimo (Tabla 4-6).

Tabla 4-6. Desorden lipídico de membrana en espermatozoides según su origen a tiempo 0.

Origen	Espz viables con bajo desorden lipídico (%)	Espz viables con alto desorden lipídico (%)	Células Muertas (%)
Epididimario	29.95± 4.19 a	59.03± 3.88 a	10.67± 0.70 a
Eyaculado	10.86± 0.88 b	75.27± 1.58 b	13.61±1.34 b

a, b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al realizar el estudio a lo largo del tiempo (135 minutos) observamos que los espermatozoides que procedían del eyaculado presentaron mayor desorden lipídico y menor viabilidad que los espermatozoides procedentes de epidídimo (Figura 4-5 A y B).

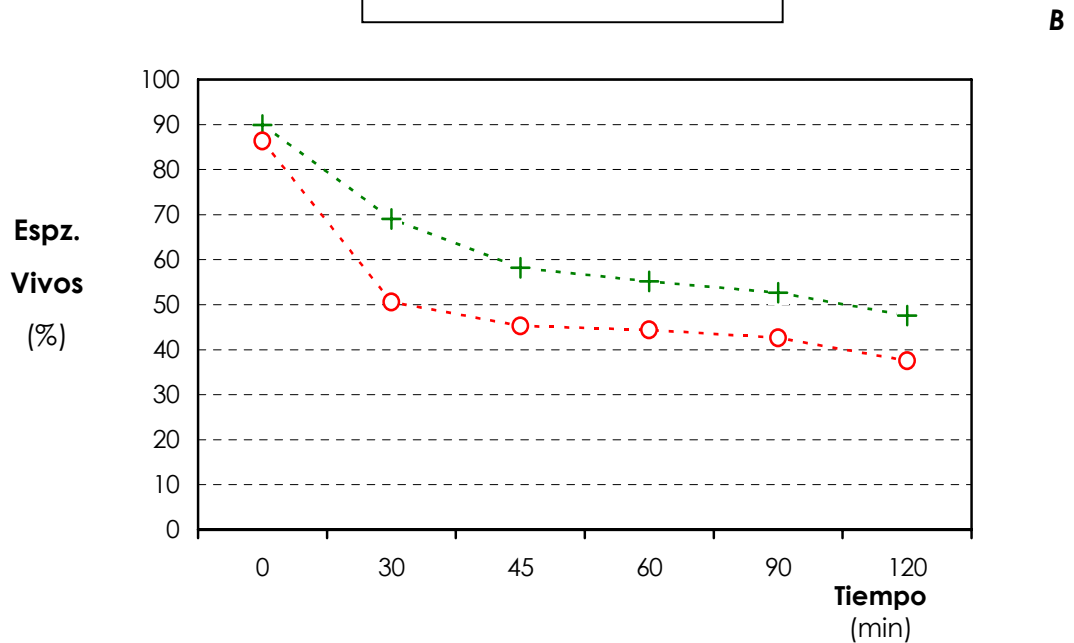
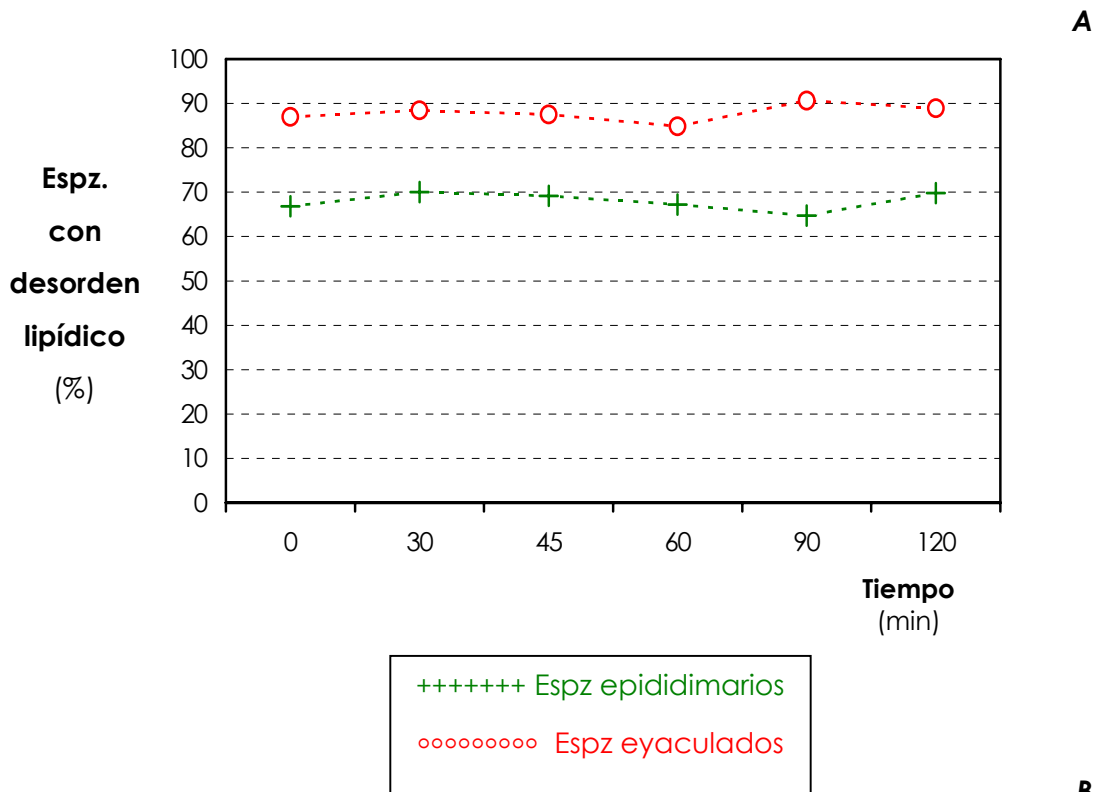


Figura 4-5. Desorden lipídico de la membrana plasmática (**A**) y viabilidad espermática (**B**) a lo largo del tiempo en espermatozoides epididimarios y eyaculados.

Si consideramos de forma aislada el tratamiento espermático, independientemente del origen, observamos que la única variable que se ve modificada es la viabilidad celular (*Tabla 4-7*) que es menor en el grupo PBS-BSA.

Tabla 4-7. Desorden lipídico de membrana en espermatozoides, según tratamiento de capacitación a tiempo 0.

Tratamiento	Espz viables con bajo desorden lipídico (%)	Espz viables con alto desorden lipídico (%)	Células Muertas (%)
NL	24.02 ± 5.53	67.12 ± 5.28	8.67 ± 0.59 a
PBS-BSA	17.35 ± 2.45	66.21 ± 2.78	16.09 ± 1.76 b
Percoll	20.71 ± 4.14	67.61 ± 3.69	11.32 ± 0.80 a

a, b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Observamos igualmente diferencias entre tratamientos dependiendo del origen de los espermatozoides (efecto significativo de la interacción). Así tenemos que todos los tratamientos para espermatozoides eyaculados consiguieron un porcentaje muy bajo de membranas intactas sin diferencias significativas entre ellos (*Tabla 4-8*). Por otra parte en espermatozoides epididimarios el grupo PBS-BSA presentó un porcentaje significativo mayor de bajo desorden lipídico en comparación a los otros dos tratamientos.

En relación al porcentaje de espermatozoides con elevado desorden lipídico, éste fue menor en espermatozoides epididimarios que en eyaculados y fue similar en todos los tratamientos realizados. Observamos como anteriormente describíamos, que el tratamiento resulta afectado también por el origen de los espermatozoides (efecto significativo de interacción). Para espermatozoides eyaculados el tratamiento PBS-BSA determinó un menor porcentaje de células viables con elevado desorden lipídico en comparación con el grupo NL y Percoll, mientras que todos los tratamientos para los espermatozoides epididimarios fueron similares.

Tabla 4-8. Desorden lipídico de membrana en espermatozoides epididimarios y eyaculados con tres tratamientos de capacitación a tiempo 0.

Origen	Tratamiento	Espz viables con bajo desorden lipídico (%)	Espz viables con alto desorden lipídico (%)	Células muertas (%)
Epididimario	NL	37.02 ± 9.58 a	55.84 ± 9.32 a	6.99 ± 0.51 a
Epididimario	PBS-BSA	24.51 ± 3.96 a	62.08 ± 4.08 ab	12.83 ± 0.85 a
Epididimario	Percoll	28.68 ± 7.57 a	58.99 ± 6.39 ab	12.04 ± 1.50 a
Eyaculado	NL	10.09 ± 1.25 b	79.21 ± 1.62 b	10.46 ± 0.88 a
Eyaculado	PBS-BSA	9.71 ± 0.79 b	70.63 ± 3.55 ab	19.57 ± 3.35 b
Eyaculado	Percoll	12.73 ± 2.13 b	76.23 ± 2.22 ab	10.59 ± 0.57 a

a, b. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Si enfocamos el análisis como una media a lo largo del tiempo (Tabla 4-9) observamos que dentro de los espermatozoides epididimarios el tratamiento sí que afecta significativamente el porcentaje de células muertas y a la proporción de células vivas con bajo desorden lipídico. El tratamiento más estable fue el grupo NL con mayor valor de bajo desorden lipídico y menor porcentaje de células muertas. Por el contrario, el tratamiento más agresivo fue el grupo PBS-BSA ya que indujo un mayor número de células muertas y un menor valor de bajo desorden lipídico que el tratamiento NL. El tratamiento Percoll ofreció una situación intermedia. Por el contrario, al utilizar espermatozoides eyaculados no se obtuvieron diferencias significativas para los diferentes tratamientos estudiados.

Cuando estudiamos el desorden lipídico en las células viables a lo largo de los 135 minutos de incubación (Figura 4-6) observamos claramente como los

espermatozoides eyaculados y epididimarios difieren notablemente. Con todos los tratamientos realizados, los espermatozoides eyaculados presentaron mayor desorden lipídico en relación a las células viables que los epididimarios y este patrón no se vio modificado a lo largo del tiempo.

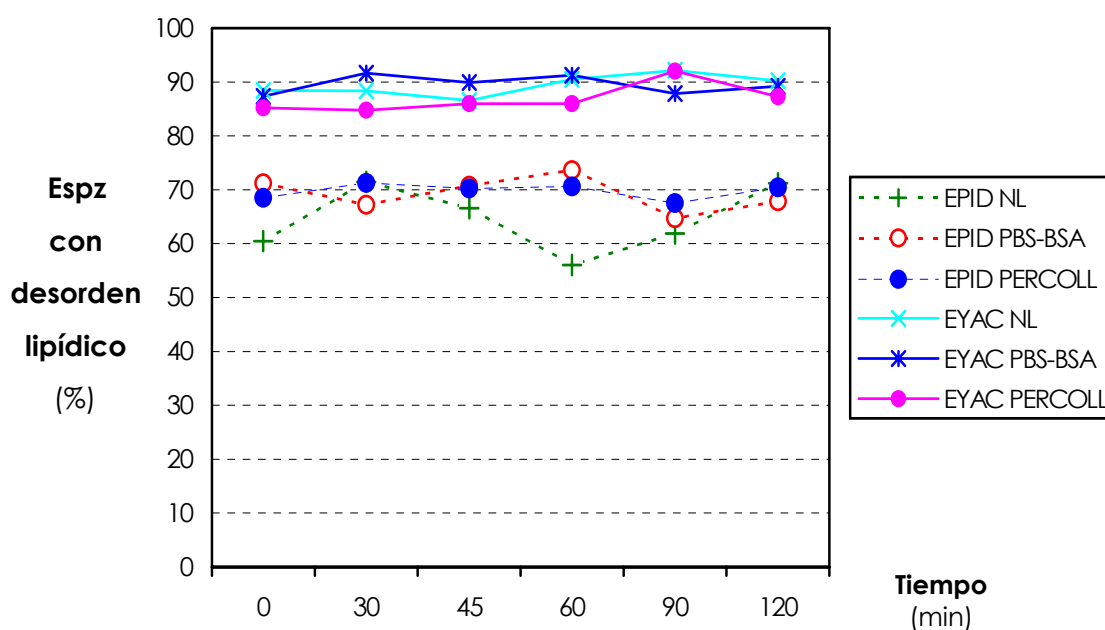


Figura 4-6. Evolución del desorden lipídico de la membrana espermática según tratamiento de capacitación en espermatozoides epididimarios y eyaculados a lo largo del tiempo.

4.5 Evaluación de la reacción acrosómica

La reacción acrosómica resultó afectada por el origen y el tratamiento espermático empleado. El porcentaje de espermatozoides intactos (vivos y con acrosoma no reaccionado) fue superior en espermatozoides epididimarios que en eyaculados y el grupo NL presentó el mayor porcentaje de acrosomas intactos (Tabla 4-9).

El porcentaje de células con acrosomas reaccionados espontáneamente fue en todos los casos muy reducido (<2.5 %) y éste valor fue inferior en espermatozoides epididimarios que en eyaculados y en términos generales fue

superior en el grupo PBS-BSA que en el resto. Finalmente, el porcentaje de células muertas fue menor en espermatozoides epididimarios que en eyaculados. Para ambos tipos espermáticos, el grupo NL presentó el menor porcentaje de células muertas.

Con todos estos datos podemos concluir que el tratamiento NL induce una menor RA en comparación con los otros dos sistemas de capacitación. El tratamiento Percoll® provoca una RA más rápida y más evidente en espermatozoides eyaculados que en espermatozoides epididimarios (Tabla 4-9).

Tabla 4-9. Porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto, reaccionados y células muertas, según origen y tratamiento de capacitación.

Origen	Tratamiento	Acrosomas intactos (%)	Acrosomas reaccionados (%)	Células Muertas (%)
Epididimarios	NL	88.79 ± 1.23 d	0.29 ± 0.04 a	10.91 ± 1.22 a
Epididimarios	PBS-BSA	47.59 ± 4.54 b	0.58 ± 0.06 abc	51.83 ± 4.54 c
Epididimarios	Percoll	54.64 ± 6.17 bc	0.92 ± 0.12 bc	44.43 ± 6.06 bc
Eyaculados	NL	72.17 ± 5.31 c	1.07 ± 0.13 c	26.76 ± 5.33 ab
Eyaculados	PBS-BSA	42.26 ± 5.37 ab	2.31 ± 0.29 d	55.43 ± 5.59 cd
Eyaculados	Percoll	25.78 ± 2.71 a	0.33 ± 0.03 ab	73.89 ± 2.71 d

a, b, c, d. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.6 Estudio de la penetración *in vitro* de ovocitos madurados *in vitro*

Después de las 2 primeras horas de cocultivo, el porcentaje de penetración en ovocitos tras un proceso de FIV resultó afectado por los tratamientos de capacitación tanto en espermatozoides epididimarios como eyaculados (*Tabla 4-10*). El porcentaje de penetración fue más elevado para aquellos espermatozoides sometidos a tratamiento Percoll® que en los grupos PBS-BSA y NL. Sin embargo, no se encontró efecto significativo ni del tipo de espermatozoides ni del tratamiento espermático sobre los otros parámetros estudiados (número de espermatozoides por ovocito, porcentaje de activación ovocitaria y porcentaje de activación espermática).

Al analizar los datos de penetración *in vitro* después de 4 horas de cocultivo (*Tabla 4-11*) podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre los espermatozoides epididimarios y eyaculados en cuanto al porcentaje de penetración, con valores medios más altos para el grupo de espermatozoides epididimarios que en eyaculados. En cualquier caso, observamos como anteriormente describíamos comportamientos diferentes a los tratamientos dependiendo del origen de los espermatozoides (efecto significativo de interacción). Para espermatozoides epididimarios no se encontraron diferencias en la tasa de penetración, mientras que para espermatozoides eyaculados los porcentajes más elevados de penetración se encontraron en el grupo de espermatozoides tratados con Percoll® ($p < 0.05$, *Tabla 4-11*).

En relación al parámetro "número de espermatozoides por ovocito" (Espz/Ovo) los valores más elevados se encontraron en el grupo de espermatozoides de origen epididimario, aunque presentó igualmente comportamientos diferentes a los tratamientos dependiendo del origen de los espermatozoides (efecto significativo de interacción). Para espermatozoides epididimarios el tratamiento con PBS-BSA supuso un número mayor de espermatozoides por ovocito que el grupo NL, quedando el grupo Percoll® en

una situación intermedia. Mientras que en con espermatozoides eyaculados, el tratamiento con Percoll® fue el que ofreció valores mayores.

En cuanto al parámetro porcentaje de activación ovocitaria (estadios de anafase II, telofase II y de pronúcleo femenino) varió en todos los grupos desde el 78 al 92 % y no se vio significativamente afectado ni por el origen de los espermatozoides ni por el tratamiento de capacitación realizado.

Por el contrario, el porcentaje de ovocitos penetrados con activación espermática (cabezas espermáticas descondensadas y formación de pronúcleo masculino) resultó afectado tanto por el origen como por el procesado de los espermatozoides. Se obtuvieron en términos generales valores más altos en el grupo de espermatozoides epididimarios que en el de eyaculados. Dentro de los espermatozoides epididimarios no se encontraron diferencias entre los tratamientos (variando desde 76 al 81%, *Tabla 4-11*), mientras que en el caso de espermatozoides eyaculados el tratamiento con Percoll® supuso un mayor porcentaje de activación espermática que los otros dos tratamientos espermáticos.

Tabla 4-10. Datos de penetración *in vitro* con espermatozoides, según origen y tratamiento, con 2 h de cocultivo.

Origen	Tratamiento	N° ovocitos	Penetración (%)	Espz/Ovo (n)	Activación ovocitaria (%)	Activación espermática (%)
Epidídimo	NL	95	4.21 ± 2.07 ab	1.25 ± 0.25	75.00 ± 25.00	50.00 ± 28.87
Epidídimo	PBS-BSA	100	16.00 ± 3.68 b	1.94 ± 0.39	87.50 ± 8.54	50.00 ± 12.91
Epidídimo	Percoll	96	14.58 ± 3.62 b	1.51 ± 0.15	64.29 ± 13.29	42.86 ± 13.73
Eyaculado	NL	94	1.06 ± 1.06 b	1.00	100	0
Eyaculado	PBS-BSA	92	6.52 ± 2.59 ab	1.00 ± 0	83.33 ± 16.67	0
Eyaculado	Percoll	89	38.20 ± 5.18 c	3.73 ± 0.66	85.29 ± 6.17	41.18 ± 8.57

a, b, c, d. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4-11. Datos de penetración *in vitro* con espermatozoides, según origen y tratamiento, con 4 h de cocultivo.

Origen	Tratamiento	N° ovocitos	Penetración (%)	Espz/Ovo (n)	Activación ovocitaria (%)	Activación espermática (%)
Epidídimo	NL	129	84.50 ± 3.20 b	9.20 ± 0.85 b	88.99 ± 3.01	76.15 ± 4.10 bc
Epidídimo	PBS-BSA	142	84.51 ± 3.05 b	16.86 ± 1.63 cd	82.50 ± 3.48	80.83 ± 3.61 bc
Epidídimo	Percoll	152	90.13 ± 2.43 b	11.10 ± 0.88 bc	80.29 ± 3.41	78.10 ± 3.55 bc
Eyaculado	NL	84	27.38 ± 4.89 a	1.74 ± 0.17 a	78.26 ± 8.79	60.87 ± 10.41 ab
Eyaculado	PBS-BSA	93	30.11 ± 4.78 a	1.71 ± 0.21 a	92.86 ± 4.96	42.86 ± 9.52 a
Eyaculado	Percoll	116	78.45 ± 3.83 b	18.13 ± 1.07 d	85.60 ± 2.16	89.01 ± 3.30 c

a, b, c, d. Diferentes subíndices en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El proceso de capacitación va a implicar una serie de modificaciones sustanciales en la célula espermática. Entre los cambios que se producen durante la capacitación se incluyen las alteraciones en el patrón de movimiento espermático (Yanagimachi, 1994), variaciones en la fluidez y composición de la membrana plasmática (Wolf *et al.*, 1986; Harrison *et al.*, 1996), un incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} provocada por la activación de canales iónicos (Fraser, 1990) lo que va a provocar un aumento en las concentraciones intracelulares de este ión (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), y un aumento en la generación de ROS (Aitken *et al.*, 1995). Como consecuencia final del proceso de capacitación, el espermatozoide experimenta, bajo los estímulos adecuados, la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1981) y es capaz de penetrar la zona pelúcida y fecundar al ovocito (Austin, 1960; Myles y Primakoff, 1997).

El proceso de capacitación puede ser reproducido en condiciones *in vitro* mediante la eliminación del plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal (Visconti *et al.*, 2002). Se han empleado numerosos sistemas para capacitar a los espermatozoides porcinos con resultados muy diferentes (Grant *et al.*, 1994; Suzuki y Nagai, 2003; Matás *et al.*, 2003). Incluso se han obtenido diferencias en los resultados aún utilizando sistemas de capacitación parecidos. Los motivos de esta enorme variabilidad entre y dentro de los tratamientos de preparación espermática siguen siendo hoy en día motivo de estudio y aún no han sido aclarados, al igual que no se conoce exactamente la causa de la elevada polispermia que se presenta en los sistemas de fecundación *in vitro* porcina (Coy y Romar, 2002; Funahashi, 2003; Wang *et al.*, 2003). Sin embargo, desde hace tiempo es bien conocido el hecho de que existen diferencias en la

capacitación de los espermatozoides procedentes de distintos machos, entre eyaculados de un mismo macho, por las diferencias en la composición del plasma seminal, entre espermatozoides de diverso origen (eyaculados y epididimarios) o entre los diversos tratamientos de conservación a los que son sometidos los espermatozoides (frescos, conservados en refrigeración durante varios días y congelados).

Hemos de tener en consideración que durante el proceso de maduración epididimaria y durante la eyaculación, la membrana de los espermatozoides se recubre de proteínas epididimarias y de proteínas procedentes de la secreción de las glándulas accesorias que van a actuar como factores decapacitantes, que evitan las reacciones acrosómicas prematuras (*Dukelow et al., 1967; Oliphant et al., 1985; Fraser et al., 1990; Roberts et al., 2003*). Por otra parte, se han detectado vesículas de membrana en el plasma seminal porcino (*El-Hajj Ghaoui et al., 2004; Piehl et al., 2008*) sugiriendo que este componente del plasma seminal podría tener un efecto positivo sobre la motilidad progresiva del espermatozoide y la estabilidad de la membrana, aunque su función aún no se conoce perfectamente.

Por tanto, parece esencial que para que se produzca con normalidad el proceso de capacitación debe eliminarse el plasma seminal y con él los componentes que inhiben o bloquean el proceso. Pero debemos considerar que parte de estos factores decapacitantes son tanto de origen epididimario como de la secreción de las glándulas accesorias y pueden afectar por tanto a espermatozoides epididimarios y eyaculados (*Fraser, 1990; Manaskova y Jonakova, 2007*).

El plasma seminal también contiene factores que favorecen el proceso de capacitación como las proteínas descritas en el plasma seminal bovino (*bull seminal plasma, BSP*) que facilitan la salida del colesterol presente en la membrana plasmática (*Lusignan et al., 2006*). Otros factores del plasma seminal como el péptido promotor de la fertilidad (*fertility promoting peptide, FPP*)

estimulan la capacitación espermática pero inhiben el proceso de RA espontánea (Green *et al.*, 1996). Los efectos biológicos de estos factores seminales del plasma sobre la funcionalidad de los espermatozoides son complejos y no están a día de hoy del todo aclarados. La solución se complica en parte debido a la alta variabilidad en la composición del plasma seminal entre especies, entre machos dentro de la misma especie y dentro de eyaculados de un mismo macho (Ashworth *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2000).

En este estudio hemos utilizado espermatozoides de origen epididimario que no han entrado en contacto con las proteínas procedentes de las glándulas accesorias frente al uso de espermatozoides eyaculados. Este modelo nos permite de forma indirecta analizar los posibles efectos biológicos de los componentes de estas glándulas sobre el proceso de capacitación.

Analizando los diversos parámetros seminales que indican cambios funcionales derivados del proceso de la capacitación espermática en nuestro desarrollo experimental observamos unas marcadas diferencias en todos los parámetros estudiados entre el semen de origen epididimario y el eyaculado. Los espermatozoides epididimarios presentan en términos generales una mayor estabilidad ante los tratamientos de preparación espermática, de manera que presentan valores inferiores a los de los eyaculados en los parámetros de Ca^{2+} intracelular, generación de ROS, desorden lipídico de membranas espermáticas y también mayores valores en los parámetros de motilidad, porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma estable y mayor capacidad de penetración *in vitro*.

Estas marcadas diferencias entre los dos tipos de espermatozoides empleados podrían estar motivadas por: **1)** diferencias asociadas a los espermatozoides, como es el distinto grado de madurez que presentan los espermatozoides, o bien **2)** por el contacto e interacción de los componentes del plasma seminal con el espermatozoide.

Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo se producen una serie de cambios sustanciales en la estructura del mismo (*Dacheaux et al., 2005*). Entre estos cambios se han descrito modificaciones en la estructura de la cromatina (*Afama et al., 1989*), modificaciones en el contenido proteico (*Saxena et al., 1986*) y en el contenido lipídico de la membrana espermática (*Evans y Setchell, 1979*), y modificaciones en la densidad y localización de los aniones en la superficie de la membrana (*Stoffel et al., 2002*). Todo ello conduce a cambios en la estructura de la membrana espermática que podrían tener consecuencias en el desarrollo de los procesos que llevan a la interacción con el ovocito. Pero lamentablemente, son muy pocos los estudios realizados para comparar las diferencias funcionales entre el espermatozoide epididimario y el eyaculado. *Rath y Niemann (1997)* demuestran que los espermatozoides congelados de origen epididimario presentan una mayor motilidad y capacidad de fecundación *in vitro* que los eyaculados.

El efecto de la secreción de las glándulas accesorias sobre la fertilidad de los espermatozoides no es del todo concluyente. Algunos estudios indican que la adición de una cierta cantidad de plasma seminal podría mejorar la viabilidad de los espermatozoides diluidos en toros, carneros y verracos (*Asworth et al., 1994; Maxwell et al., 1997; Maxwell y Johnson, 1999*). De forma similar, también se ha observado una correlación entre la fertilidad y la presencia de determinadas proteínas del plasma seminal de toros (*Killian et al., 1993*). Por el contrario, otros autores describen que se produce una reducción de la fertilidad después de la exposición de los espermatozoides al plasma seminal en el verraco (*Iwamoto et al., 1992*), en la especie humana (*Iwamoto y Gagnon, 1988*) y en el toro y carnero (*Dott et al., 1988*). Igualmente, se ha observado que la incubación continua de los espermatozoides con el plasma seminal previene los fenómenos de capacitación espermática (*Davis y Niwa, 1974; Kanwar et al., 1979*) hecho que también es evidente en la especie porcina al estudiar espermatozoides eyaculados (*Suzuki et al., 2002, Vadnais et al., 2005*). Estos factores decapacitantes deben ser eliminados de la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide para poder iniciar la capacitación. Además, el proceso de capacitación es reversible,

puediendo ser frenado mediante el contacto de los espermatozoides con sustancias estabilizadoras presentes en el plasma seminal que podrían mediar en los procesos de capacitación (*Chang, 1957*).

La presencia, ausencia o la diferente concentración en la secreción de las glándulas accesorias de ciertos componentes que intervendrían en las rutas metabólicas que afectan al proceso de capacitación (*Fournier-Delpech y Thibault, 1993*), puede ser la responsable de la variabilidad de estos efectos sobre la fertilidad de los espermatozoides. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte del plasma seminal no acompañe al espermatozoide durante su ascenso al lugar de fecundación en el tracto genital femenino, sugiere que su eliminación puede ser necesaria para la adquisición de la capacidad de fecundar y puede ser un factor importante en el proceso de capacitación. Algunas de las proteínas que afectan a la funcionalidad de la membrana son las espermadhesinas de tipo AQN, AWN y PSP (*Calvete et al., 1996 y 1997; Jokanova et al., 2007*). Recientemente, *Lusignan et al. (2007)* describen el efecto favorecedor sobre el proceso de capacitación de espermatozoides epididimarios que presentan un tipo de proteínas del plasma seminal porcino pB1 que se corresponde con la familia de las BSP bovinas (*Calvete et al., 1997*).

Otra posible explicación de las diferencias basadas en el efecto del plasma seminal podría deberse a su capacidad para modular la disponibilidad de Ca^{2+} . En este sentido, *Schmidt y Kamp (2004)* al estudiar la inducción de la hipermotilidad en espermatozoides porcinos, encuentran que en presencia de un 25 % de plasma seminal es necesario elevar cerca de 10 veces la concentración de Ca^{2+} en el medio. Y se ha sugerido que la presencia de citrato en el plasma seminal podría quelar el Ca^{2+} libre limitando la bio-disponibilidad del mismo (*Kam y Lauterwein, 1995*).

Por otra parte en este estudio hemos analizado el efecto del tratamiento de preparación de los espermatozoides sobre los diversos parámetros seminales

indicativos del proceso de capacitación espermática y la capacidad de penetración *in vitro*.

Entre los tratamientos espermáticos utilizados habitualmente en los laboratorios para la preparación de los espermatozoides para su uso en un sistema de fecundación *in vitro*, se encuentran los lavados que se realizan empleando medios suplementados con albúmina o a través de un proceso de centrifugación en un gradiente de Percoll®. Con estos métodos de selección espermática se pretende obtener espermatozoides móviles con morfología normal y separarlos de distintos contaminantes presentes como “debris” o restos celulares y de otros espermatozoides no viables o anormales (Katayama *et al.*, 1989; Sirard *et al.*, 1993; Shamsuddin *et al.*, 1994; Parrish *et al.*, 1995).

El objetivo final de los tratamientos espermáticos es capacitar y favorecer la habilidad de penetrar y fecundar ovocitos *in vitro*. El primero de los tres tratamientos estudiado es el denominado no lavado (NL), consistente en la suspensión de los espermatozoides en el medio de fecundación *in vitro* (TALP). Por tanto, se espera que el proceso de capacitación se vaya a desarrollar fundamentalmente durante la incubación con los ovocitos en la placa de FIV (Martínez *et al.*, 1996). El segundo de los tratamientos implica un proceso de lavado que se repite 3 veces y la dilución del precipitado en una solución de PBS con BSA. Se espera por tanto que el proceso de capacitación se inicie como consecuencia de la captura de colesterol de la membrana espermática que realiza la BSA. Por último, el tercer tratamiento se basa en la centrifugación en un gradiente de Percoll® que permite eliminar las vesículas de membrana y acelerar el proceso de capacitación.

Previamente, ya habíamos demostrado que los métodos de preparación de espermatozoides eyaculados porcinos afectaban al proceso de RA y a los diferentes parámetros de FIV (Matás *et al.*, 2003). Y al analizar nuevos parámetros espermáticos indicadores de la capacitación confirmamos que existen notables diferencias asociadas al uso de distintos tratamientos espermáticos. En términos

generales observamos que el tratamiento espermático mediante el empleo de un gradiente de Percoll® es el método que induce la capacitación de manera más intensa y rápida. Estos resultados coinciden con los estudiados previamente con espermatozoides epididimarios (Suzuki y Nagai, 2003) y eyaculados (Matás et al., 2003). Sin embargo, hemos de tener en consideración que para la mayoría de los parámetros analizados observamos diferencias en los comportamientos con los distintos tratamientos espermáticos aplicados, dependiendo del origen de los espermatozoides. Este hecho se verifica al detectar en el análisis de varianza de dos vías que existe un efecto significativo de interacción origen-tratamiento.

Para facilitar el proceso de discusión pasaremos a ir detallando los cambios detectados en cada una de los parámetros estudiados

5.1 Evaluación de la motilidad espermática mediante análisis computerizado de imágenes (CASA)

Durante el proceso de capacitación se produce un cambio en el patrón de movimiento, denominado hipermotilidad o hiperactivación de la motilidad (Suarez y Ho, 2003), que va a ser de elevada importancia para que tenga lugar el proceso de fecundación, ya que este cambio ha sido observado en condiciones *in vivo*, cuando el espermatozoide alcanza las proximidades del lugar de fecundación (Suárez et al., 1992; Suárez y Ho, 2003) y permite atravesar la ZP del ovocito (Yanagimachi, 1969; Stauss et al., 1995; Bedford, 1998). En el proceso de hiperactivación están implicados diversos sistemas de señalización celular (Marquez y Suarez, 2004), como la protein kinasa C (Harayama y Miyake, 2006) y está relacionado con el metabolismo energético de la célula por la vía del piruvato y lactato (Mollova et al., 2006). La motilidad del espermatozoide hiperactivado se caracteriza por un vigoroso movimiento del flagelo de manera normalmente asimétrica que lleva a movimientos circulares cuando se observa al microscopio sobre un portaobjetos (Suarez y Ho, 2003).

El análisis mediante el sistema CASA es una herramienta de gran ayuda para la valoración de espermatozoides móviles en la especie humana y en los animales domésticos (Mortimer, 1997; 2000; Verstegen *et al.*, 2002). En la especie porcina se ha utilizado para estudiar el movimiento tanto de espermatozoides eyaculados como epididimarios (Holt *et al.*, 1997; Suzuki y Nagai, 2003). Pero hemos de tener en consideración que la mayoría de los sistemas CASA se basan en el estudio de los movimientos de la cabeza espermática y por tanto la evaluación de los estados de hiperactivación de la motilidad basados en cambios en el movimiento flagelar son de tipo indirecto y poco precisos como estimadores de capacitación (Suarez y Ho, 2003).

Diversos autores han intentado relacionar los parámetros que ofrecen los sistemas CASA con la capacidad de fecundación *in vitro* e *in vivo*. En la especie humana, se ha sugerido que niveles bajos en desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) están asociados con fallos en FIV (Jeulin *et al.*, 1996) mientras que otros autores también consideran además parámetros relacionados con la velocidad curvilínea (VCL) (Liu *et al.*, 1999; Hirano *et al.*, 2001) o la velocidad media (VAP) (Mak *et al.*, 2004). En la especie porcina también se ha encontrado una relación entre los parámetros de motilidad y la fertilidad *in vivo* (Holt *et al.*, 1997; Quintero-Moreno *et al.*, 2004; Sutkeviciene *et al.*, 2005).

Al comparar con esta tecnología los parámetros de motilidad de espermatozoides epididimarios y eyaculados observamos que tenían patrones de movimiento diferentes. Los espermatozoides de epidídimo presentaron un mayor número de espermatozoides con motilidad progresiva, y este movimiento era más rápido (mayores valores para VCL, VSL, VAP), pero también presentaban un mayor ALH que los espermatozoides eyaculados. Esto nos sugiere que bajo estas condiciones experimentales, los espermatozoides epididimarios estarían en mejores condiciones que los del eyaculado para desarrollar los procesos funcionales necesarios para alcanzar la fecundación *in vitro* del ovocito, como previamente pusieron de manifiesto Rath *et al.* (1999) utilizando semen congelado de ambos tipos procedentes de los mismos animales. En este mismo estudio,

también se pone de manifiesto que la motilidad del semen epididimario fue superior a la del eyaculado.

Debemos recordar que los espermatozoides epididimarios permanecen inmóviles en la región caudal del epidídimo con un nivel metabólico muy bajo hasta que se diluyen en el medio adecuado (*Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983; Usselman y Cone, 1983; Robaire y Viger, 1995*). Esta inmovilidad permite preservar las reservas energéticas espermáticas y disminuir los riesgos de alteraciones por efecto de agentes oxidantes endógenos producidos por la actividad mitocondrial (*Voglmayr et al., 1985; Robaire y Viger, 1995*), ya que la motilidad es precisamente la principal causa de consumo energético en el espermatozoide (*Roldán, 1998*).

Para los espermatozoides de origen epididimario, los tres tratamientos estudiados incrementaron la motilidad espermática, por lo que podríamos pensar que es la incubación en el medio TALP la que aporta inductores de la capacitación como el HCO_3^- y Ca^{2+} (*Harrison et al., 1996*) y donde los espermatozoides desarrollan un patrón de movimiento vigoroso (*Holt y Harrison, 2002*). Por otra parte, no deberíamos descartar el efecto de dilución y resorción de los factores inhibidores de la motilidad que pudieran estar adheridos a la superficie espermática resultantes del tránsito por el epidídimo (*Fraser et al., 1990*). En nuestro estudio detectamos diferencias entre tratamientos para los espermatozoides epididimarios. Para este tipo de espermatozoides, el tratamiento con Percoll® mostró un patrón de movimiento diferente con valores significativamente superiores para WOB e inferiores para ALH y una tendencia a tener menor velocidad y mayor linealidad que el resto de tratamientos. Por otra parte, *Suzuki y Nagai (2003)* utilizando semen epididimario congelado-descongelado encuentran diferencias entre las células sometidas a un tratamiento con Percoll® y un tratamiento equivalente al no lavado de nuestras condiciones experimentales, con mayores porcentajes de motilidad y motilidad progresiva después del tratamiento con Percoll®. Sin embargo, no se observaron diferencias para los parámetros de motilidad (VCL, VSL, etc.).

Para los espermatozoides eyaculados observamos que la motilidad de los tratados con Percoll® presentaba un patrón de movimiento diferente al resto de tratamientos con relativamente menos motilidad pero con mayor linealidad (LIN) y mayor movimiento de progresión rectilínea (STR) que el resto de tratamientos. Estos resultados coinciden con los descritos por *García-Herreros et al.* (2005) quienes encuentran, al incubar a los espermatozoides porcinos en condiciones capacitantes, un incremento únicamente en estas dos variables (LIN y STR), mientras que las velocidades no difieren de los controles. Igualmente, *Holt et al.* (2002) describen aumentos en la linealidad del movimiento (LIN) cuando se incuban los espermatozoides en medio en presencia de HCO_3^- . Estos hechos podrían sugerir que el tratamiento con Percoll® es el que induce mayores cambios en el espermatozoide asociados con la capacitación.

La motilidad progresiva de los espermatozoides eyaculados se considera como un buen indicador de la capacidad fecundante y se ha descrito una alta correlación con las tasas de fecundación *in vitro* (*Hammit et al.*, 1989; *Flowers y Xu et al.*, 1996; *Turner*, 1997; *Gadea et al.*, 1998; *Gadea y Matás*, 2000). Sin embargo, otros autores no han encontrado correlaciones significativas entre ambos parámetros (*Suzuki et al.*, 1996). Como decíamos anteriormente el sistema CASA no puede evaluar adecuadamente el estado de hiperactivación debido a que no procesa la información del batido del flagelo (*Mortimer*, 1997; *Suarez y Ho*, 2003). Pero además, otro limitante en el proceso de medición mediante este sistema es la aparición de aglutinaciones en espermatozoides capacitados que son frecuentes en la especie porcina, en especial las agregaciones del tipo “cabeza con cabeza” (*Harayama et al.*, 1998). Cuando se producen agregaciones de este tipo, el sistema CASA las considera como partículas de gran tamaño y por tanto las excluye del análisis y se ven modificados los resultados de la evaluación de los parámetros de motilidad de forma significativa (*Mortimer et al.*, 1997; *Suzuki y Nagai*, 2003; *Schmidt y Kamp*, 2004). En nuestro estudio concretamente, fue el grupo de espermatozoides eyaculados lavados en gradiente de Percoll®, el que obtuvo la mayor aglutinación (datos no

presentados) y por tanto donde mayor número de células fueron eliminadas del estudio de motilidad, siendo éstas posiblemente, las más hiperactivas.

Por último, hemos de tomar en consideración que en nuestro estudio se analizaron los valores medios de la población para diversos parámetros de motilidad. La aplicación de esta metodología podría enmascarar cambios en las sub-poblaciones espermáticas que evolucionan de manera diferente ante los tratamientos de capacitación. Diversos autores han planteado modelos de análisis estadístico que permiten discriminar las sub-poblaciones espermáticas que conviven dentro de una misma muestra seminal (*Abaigar et al., 1999, Quintero-Moreno et al., 2004*). En este sentido, *Ramió et al. (2008)*, recientemente, han descrito los cambios que se producen en la proporción de estas sub-poblaciones durante el proceso de capacitación, observando que los cambios mayores se producen en la sub-población espermática que se caracteriza por presentar una alta velocidad y linealidad.

En cualquier caso, las pequeñas diferencias entre tratamientos puestas de manifiesto en los parámetros de motilidad fueron posteriormente verificadas con el resto de valoraciones espermáticas (ROS, Ca^{2+} , RA, etc.).

5.2 Determinación de la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide mediante espectrofluorimetría

Está bien establecido el hecho de que el Ca^{2+} juega un papel crucial en la función espermática (*Dragileva et al., 1999; Ho y Suarez, 2001*). Al igual que ocurre en muchas especies de mamíferos, en la especie porcina la capacitación espermática requiere de la presencia de Ca^{2+} (*Singh et al., 1978; Babcock, 1979; Handrow et al., 1989; Okamura et al., 1993; Wang et al., 1995*) y de HCO_3^- (*Fraser et al., 1987; Boatman et al., 1991; Shi y Roldán, 1995; Harrison et al., 1996*).

Cuando los espermatozoides son incubados *in vitro* en medios capacitantes, el contenido en colesterol de la membrana decrece gradualmente (Go y Wolf, 1985; Zarintash y Cross, 1996), se modifica la fluidez de dicha membrana y comienza la entrada de Ca^{2+} en respuesta a ciertos componentes del medio de capacitación como es el HCO_3^- (Harrison y Gadella, 2005).

En nuestra experiencia, el nivel de Ca^{2+} intracelular se incrementó en todos los grupos experimentales durante el tiempo de incubación en el que realizamos el estudio, aunque sin seguir la misma cinética. La cinética de los cambios encontrada es similar a la descrita por Petrunkina *et al.* (2005) en espermatozoides incubados en medio capacitante, aún cuando estos autores utilizaban técnicas de citometría de flujo para evaluar el nivel de Ca^{2+} intracelular.

En términos generales, la concentración intracelular media de Ca^{2+} en los espermatozoides eyaculados fue superior a la de espermatozoides de epidídimo. Estas diferencias en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y en la cinética a lo largo del tiempo podrían estar motivadas por diferencias en la fluidez de membrana y en la actividad de los canales de Ca^{2+} que presentan los espermatozoides de epidídimo y eyaculados.

En este sentido, se ha descrito la presencia de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Cox y Peterson, 1989; Tiwari-Woodruff y Cox, 1995) y se han aislado proteínas de unión a Ca^{2+} (*calcium binding proteins*, CBP) tanto en el plasma seminal como asociadas a la membrana plasmática (Peterson *et al.*, 1989). La mayoría de las proteínas asociadas a membrana están relacionadas con el proceso de maduración en el epidídimo. Igualmente se conoce que la calmodulina está implicada en el proceso de entrada de Ca^{2+} en el espermatozoide porcino (Peterson *et al.*, 1983). Por otra parte, Cox *et al.* (1991) estudiaron los canales de Ca^{2+} tanto en espermatozoides eyaculados como epididimarios, describiendo la presencia de canales no selectivos de Ca^{2+} y otros cationes que podrían ser bloqueados parcialmente por verapamil, nitrendipina y rojo rutenio. Sin embargo, hasta la fecha no conocemos ningún estudio que

describa diferencias en la funcionalidad de estos canales de Ca^{2+} entre espermatozoides epididimarios y eyaculados que sustente la hipótesis de que la causa sea debida a un funcionamiento diferente de los canales de Ca^{2+} .

Las diferencias podrían ser debidas a la fluidez de membrana que presentan ambos tipos de espermatozoides. Está bien establecido que el aumento de la fluidez de membrana celular mediado por el HCO_3^- , va a provocar un aumento de la permeabilidad de dicha membrana al Ca^{2+} (Harrison *et al.* 1993). Otra cuestión a tener en cuenta es la posible acción de proteínas del plasma seminal que podrían modular la entrada de Ca^{2+} en los espermatozoides eyaculados. En este sentido, Lusignan *et al.* (2007) han demostrado la inducción de la capacitación que produce la proteína pB1 sobre los espermatozoides de epidídimo y Peterson *et al.* (1983) al utilizar agonistas de la calmodulina, bloquean la entrada de Ca^{2+} en espermatozoides porcinos eyaculados. Es por esto, y basándonos en los hallazgos de estos autores, proponemos que los espermatozoides que han tenido un contacto previo con la secreción de las glándulas accesorias (en nuestro caso, espermatozoides eyaculados) y que posteriormente son lavados, se capacitan más rápidamente bajo nuestras condiciones que los que no han estado en contacto con ellas (en nuestro caso los espermatozoides epididimarios).

En este estudio al analizar el desorden lipídico observamos que los espermatozoides epididimarios presentan una mayor proporción de células viables con bajo desorden lipídico y por tanto con menor capacidad para permitir la entrada de Ca^{2+} . Estos datos están igualmente en consonancia con los resultados de penetración obtenidos, ya que como posteriormente pudimos comprobar, fue también el grupo de espermatozoides eyaculados y lavados con Percoll® el que producía un mayor porcentaje de penetración espermática en los ovocitos tras 2 horas de incubación, mientras que los espermatozoides de epidídimo necesitaron al menos 4 horas para responder de un modo similar.

Además, también es importante comentar que el método con el que se procesan los espermatozoides es de gran importancia a la hora de conseguir una capacitación rápida. En nuestro caso, fue el lavado mediante gradientes de Percoll® el que provocó un mayor ingreso de Ca^{2+} por parte de espermatozoides epididimarios y eyaculados. Sin embargo, los tratamientos no afectaron del mismo modo a unos y otros espermatozoides. Así, mientras que para espermatozoides epididimarios los tres tratamientos dieron un resultado final equivalente (evaluado a los 60 min), para los eyaculados el tratamiento más intenso (Percoll®) en la eliminación de factores decapacitantes determinó valores superiores de Ca^{2+} intracelular que los tratamientos PBS-BSA y NL.

Con la información hasta ahora disponible no es posible asignar una causa cierta para estos resultados en los grupos experimentales estudiados, aunque todo apunta a diferencias en la fluidez y estructura de la membrana que pudieran modificar los canales de entrada de Ca^{2+} . En este sentido, *Furimsky et al.* (2005) al estudiar la capacitación en espermatozoides de ratón sometidos a tratamientos con Percoll® encuentran diferencias en la composición lipídica de la membrana con un incremento significativo de DHA y reducción de colesterol que facilitaría la fluidez de membrana en espermatozoides capacitados. Por otra parte, *Barboni et al.* (2001) describen la presencia de receptores en la membrana espermática de verracos de integrina VLA-6, que durante la capacitación se hacen evidentes en la región acrosomal. Estos receptores modulan la entrada de Ca^{2+} en forma de pulso rápido y agudo y podrían servir de inicio a la RA.

En cuanto a la utilidad de medir el Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides, algunos autores han intentado relacionar el contenido intracelular de Ca^{2+} con la fertilidad. Así, *Collin et al.* (2000) al estudiar semen congelado bovino encuentran que los niveles de Ca^{2+} son menores en los toros de mayor fertilidad, mientras que *Petrunkina et al.* (2005) encuentran que la proporción de células vivas con alto nivel de Ca^{2+} intracelular junto con las variables de viabilidad y morfología están bien correlacionadas con la tasa de fertilidad porcina.

5.3 Determinación de ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en la funcionalidad espermática (Aitken, 1995). En niveles bajos, los ROS están implicados en acontecimientos tales como la capacitación (de Lamirande y Gagnon, 1995), la mejora de la hiperactivación (Griveau et al., 1994), la unión a ZP (Kodama et al., 1996) y la RA (Griveau et al., 1995; Zini et al., 1995, Zhang y Zheng, 1996). Sin embargo, en niveles elevados se asocian con una reducción de la motilidad de los espermatozoides, una capacidad disminuida para la fusión de los espermatozoides al ovocito y una disminución de la fertilidad *in vitro* (Sharma et al., 1996)

La generación de ROS (medida en unidades de fluorescencia) por los distintos grupos de espermatozoides fue incrementándose a lo largo del tiempo de incubación y estuvo afectada tanto por el tratamiento espermático como por el origen de estas células. Los espermatozoides eyaculados produjeron mayor cantidad de ROS que los epididimarios; los lavados con Percoll® generaron mayor cantidad de ROS que los tratados con BSA y los no lavados. Las diferencias en ROS detectadas podrían ser el resultado de varias causas, por una parte debida a que se generen más agentes oxidantes como consecuencia de una mayor actividad mitocondrial (Guthrie y Welch, 2005), por la presencia de leucocitos (Amstrong et al., 1999) o inducidos por el efecto pernicioso de la centrifugación prolongada (Shekarriz et al, 1995; Matás et al. 2007). La presencia de leucocitos en el semen no es frecuente en la especie porcina a diferencia de la especie humana (Ricci et al., 2000) y de hecho no se detectaron leucocitos en ninguna de las muestras analizadas en la observación microscópica. Por tanto, no se espera que la presencia de leucocitos sea un problema en el tratamiento de los espermatozoides porcinos una vez que se eliminan por los tratamientos de centrifugación.

Por otra parte, sabemos que el semen representa un sistema redox complejo que combina el potencial antioxidante del plasma seminal y del

espermatozoide frente al potencial pro-oxidante de la célula espermática a través de la generación ROS (Gadea *et al.*, 2004). La defensa antioxidante incluye mecanismos enzimáticos entre los que tenemos: superóxido dismutasa, glutatión reductasa, peroxidasa y catalasa; mientras que los antioxidantes no enzimáticos son: glutatión, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, uratos, caretenoides y ubiquinonas. Hemos de tener en consideración que la interacción entre los mecanismos antioxidantes y pro-oxidantes va a determinar el balance final y la acción sobre la funcionalidad espermática.

En cuanto a los espermatozoides epididimarios se refiere en su ambiente fisiológico la concentración de los espermatozoides (10×10^6), y el movimiento de los mismos, debería crear un ambiente oxidativo para el espermatozoide. Sin embargo, la tensión de oxígeno en el fluido epididimario y la carencia de sustratos convencionales como la glucosa, reduce el metabolismo del espermatozoide en el epidídimo (Dacheux *et al.*, 2005). En el epidídimo porcino se han identificado varios sistemas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (Okamura *et al.*, 1997) que pudieran ayudar a preservar la actividad del espermatozoide durante la maduración y almacenaje en el epidídimo.

Las diferencias encontradas entre espermatozoides epididimarios y eyaculados deben estar basadas mayormente en la diferente actividad metabólica que presentan y en especial en la actividad mitocondrial, ya que los factores que se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide van a ser eliminados durante el tratamiento (Aitken *et al.*, 1998). Estos datos de generación de ROS medidos a lo largo de un tiempo de incubación son equivalentes a los obtenidos previamente al evaluar la concentración intracelular de Ca^{2+} y pueden servir de indicador de la actividad metabólica celular.

Sabemos que la actividad mitocondrial es la responsable principal de la generación de agentes oxidantes como resultado de una disrupción en el transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1999). El acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa permite mantener un

potencial de membrana mitocondrial alto, requisito necesario para la formación de ATP en la mitocondria (Cramer y Knaff, 1990). Para protegerse, la célula espermática porcina presenta altos niveles de actividad superóxido dismutasa tanto a nivel mitocondrial como en el citoplasma (Mennella y Jones, 1980; Guthrie y Welch, 2006).

En lo que al tratamiento espermático se refiere la mayor generación de ROS que se produce podría estar asociada en parte con los tratamientos de centrifugación a los que son sometidos los espermatozoides (Shekarriz et al., 1995; Matás et al., 2007), de manera que para ambos tipos de espermatozoides los tratamientos con Percoll® con una duración de centrifugación mayor (40 min) generaron mayor ROS que los tratados con BSA (3 centrifugaciones) y éstos a su vez más que los no lavados (no centrifugados). Pero como hemos descrito anteriormente, las curvas de generación de ROS son similares a las que presenta la concentración de Ca^{2+} , por lo que pudiera ser un índice de la actividad metabólica del espermatozoide sometido a procesos de capacitación como previamente han descrito de Lamirande y Gagnon (1995) en la especie humana.

5.4 Evaluación del desorden lipídico en membrana espermática

Durante la capacitación espermática que se produce en el tracto genital femenino, la albúmina y ciertas lipoproteínas presentes van a inducir la salida/eliminación de colesterol procedente de la membrana plasmática de los espermatozoides, como ya hemos comentado anteriormente (Wolf et al., 1986; Flesch et al., 2001a; Visconti et al., 2002), provocando un incremento en la fluidez de la membrana necesario para capacitar a los espermatozoides, favoreciendo los eventos de fusión de membrana durante la RA y la interacción espermatozoide-ovocito (Primakoff y Myles, 2002). La presencia de HCO_3^- va a desempeñar un papel determinante en la habilidad de los espermatozoides para experimentar la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro* (Okamura et al. 1985; Visconti et al., 1995b; Harrison, 1996; Harrison et al., 1996;).

La desestabilización de la membranas de los espermatozoides durante la capacitación *in vitro* puede ocurrir si se éstos se incuban en medios adecuados a temperatura fisiológica, en presencia de HCO_3^- , albúmina, Ca^{2+} y sustratos energéticos (glucosa, piruvato, lactato) (Harrison, 1996; Visconti y Kopf, 1998; Watson y Green, 2000). El TALP fue el medio de capacitación en el que se realizaron todas nuestras experiencias y que cumple todas las características comentadas anteriormente.

La respuesta al HCO_3^- y CO_2 presentes en el medio TALP es extremadamente rápida, con un incremento del AMPc en tan sólo 60 seg (Harrison y Miller, 2000). En nuestras condiciones experimentales, la alteración del orden lipídico se detecto con M540 desde las primeras mediciones (tiempo = 0), de manera que los valores para células viables y con desorden lipídico alcanzaban valores próximos al 60% para espermatozoides epididimarios y eyaculados.

El proceso de desestabilización de los lípidos de membrana se vio afectado por el origen de los espermatozoides aunque no por el tratamiento al que fueron sometidos. Los espermatozoides epididimarios presentaron un mayor porcentaje de células viables y con bajo desorden lipídico y un menor porcentaje de células viables con desorden lipídico y una menor proporción de células muertas que los espermatozoides eyaculados desde el inicio de las mediciones y durante todo el proceso de incubación. Todo ello pone de manifiesto la mayor estabilidad de los espermatozoides epididimarios que anteriormente hemos citado. En este sentido, es importante comentar el papel de las espermadhesinas que presentan la característica de unirse a la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide durante la eyaculación (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998) y que van a recubrir la superficie de los espermatozoides modulando en gran medida el proceso de desestabilización de la membrana (Calvete *et al.*, 1996). Se ha comprobado que los agregados de las espermadhesinas presentan afinidad por el colesterol, y que pueden actuar como receptores de las moléculas de colesterol liberadas del espermatozoide. Con esto se consigue disminuir la *ratio*

C/PL, fenómeno indispensable para que tenga lugar el desarrollo de la capacitación espermática (Jonakova *et al.*, 2000).

Aunque Harrison y Gadella (2005) han puesto de manifiesto la relación entre el "scrambling" de fosfolípidos en respuesta al HCO_3^- y la fertilidad, de acuerdo a nuestros resultados, parece claro que el desorden lipídico por sí solo no puede ser considerado como un parámetro que defina perfectamente el estado de capacitación. Uno de los problemas principales en este análisis es que el proceso de capacitación espermática es muy rápido y dinámico y por tanto de difícil evaluación, como previamente han descrito Petrunkina *et al.* (2005).

5.5 Evaluación de la reacción acrosómica

La reacción acrosómica puede considerarse el proceso final o resultante de la capacitación espermática (Flesch y Gadella, 2000), siendo éste un proceso de transición de duración muy reducida, con una sucesión de olas de activación que llevan a una pequeña subpoblación de espermatozoides a desarrollar el proceso de RA. Es por ello que en todos los grupos estudiados, el porcentaje de espermatozoides viables con RA es muy reducido (<2.5 %) como ha sido descrito previamente en otros estudios (Coy y Romar, 2002; Matás *et al.*, 2003).

En nuestra experiencia, el grado de RA espontánea fue inferior para espermatozoides epididimarios que en eyaculados. En principio podríamos pensar que independientemente del tratamiento realizado a los espermatozoides epididimarios, éstos se deberían capacitar y reaccionar de manera más fácil que los eyaculados ya que no han estado en contacto con la secreción de las glándulas accesorias que contiene factores estabilizantes o decapacitantes (Vadnais *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados demuestran lo contrario y están en consonancia con los previamente descritos para, Ca^{2+} intracelular, generación de ROS y desorden lipídico, como consecuencia final del proceso de capacitación. En este sentido, debemos reconocer que la comunidad científica

acepta que el incremento del Ca^{2+} intracelular es necesario para el desarrollo de la RA (Flesh y Gadella, 2000).

El tratamiento afectó a la población de espermatozoides vivos no reaccionados y reaccionados tanto para espermatozoides de origen epididimario como eyaculados. Los valores de espermatozoides intactos más altos fueron para el grupo NL frente a PBS-BSA y Percoll®, lo que pone de manifiesto que este tratamiento es el menos efectivo para inducir la RA. Estos resultados son coherentes con los descritos por Grant *et al.* (1994) al estudiar espermatozoides eyaculados con Percoll® o con los previos de Matás *et al.* (2003) al estudiar estos mismos grupos experimentales a lo largo del tiempo.

Los espermatozoides eyaculados lavados con albúmina presentan el mayor porcentaje de espermatozoides con RA. Este hecho podría explicarse porque el lavado con BSA favorece la salida de colesterol de la membrana y por lo tanto se modifica la fluidez de la misma (Visconti *et al.*, 1998) permitiéndose que se produzca un mayor porcentaje de RA cuando los espermatozoides se encuentran en un medio capacitante en presencia de Ca^{2+} y HCO_3^- .

No obstante, también podríamos pensar por este mismo motivo que los espermatozoides lavados con BSA deberían ser los que mayor porcentaje de penetraciones tuvieran o bien penetraran más rápido a los ovocitos, pero debemos tener presente que la RA tiene que producirse inducida por la ZP en el momento que los gametos se ponen en contacto y que si la RA se produce antes, los espermatozoides no serán capaces de penetrar a los ovocitos. En este sentido, Grant *et al.* (1994) describen mejoras en la capacidad fecundante de espermatozoides porcinos eyaculados tratados con Percoll® vs. Lavados pero sin que este incremento sea debido a cambios en la RA. Del mismo modo Coy y Romar (2002) al estudiar diferentes medios de fecundación *in vitro* no encuentran una relación entre la RA y la capacidad fecundante en un sistema *in vitro*.

Podríamos concluir por tanto, que aunque la RA es un requisito imprescindible para que se produzca la penetración a través de la ZP y la consecuente fusión con la membrana plasmática del ovocito, la relación entre la tasa de penetración *in vitro* y los valores de RA es consistente (Vázquez *et al.*, 1993; Gadea y Matás, 2000; Gadea, 2005), probablemente debido al problema de estudiar un proceso cinético. Como afirman Petrunkina *et al.* (2005) “el estado de subfertilidad puede ser debido tanto a cambios en la membrana demasiado rápidos como demasiado lentos y por tanto, la respuesta a las condiciones de capacitación debe ser la óptima en el tiempo mejor que la máxima”.

5.6 Estudio de la penetración *in vitro* de ovocitos madurados *in vitro*

Hemos observado anteriormente que los espermatozoides de epidídimo necesitan más tiempo para capacitarse, o en otras palabras, son más estables ante los estímulos capacitantes, pero finalmente son capaces de fecundar *in vitro* con mayor efectividad que los eyaculados. Estos resultados están en coherencia con los descritos por Rath y Niemann (1997) al estudiar la capacidad de fecundar *in vitro* que tienen el semen congelado epididimario y eyaculado de los mismos animales.

Para dar luz a la interpretación de estos resultados, Harkema *et al.* (2004) demuestran que los espermatozoides del epidídimo porcino son más lentos que los eyaculados en el proceso de unión a las proteínas de la ZP y que la muerte celular durante el proceso de incubación fue menor en espermatozoides epididimarios. Cuando los espermatozoides epididimarios fueron incubados en presencia de plasma seminal se aceleró el proceso de unión a las mencionadas proteínas de la ZP. Estos datos corroboran la importancia de determinados factores presentes en el plasma seminal que modulan el proceso de capacitación y RA.

Curiosamente para los espermatozoides epididimarios, los tres tratamientos espermáticos estudiados permitieron de igual forma la penetración efectiva de ovocitos *in vitro*. En este sentido, estos resultados coinciden parcialmente con los descritos por *Suzuki y Nagai* (2003) quienes encuentran que al emplear semen epididimario congelado encuentran que el tratamiento con Percoll® incrementó las tasas de penetración en dos de los verracos estudiados mientras que para los otros dos no se encontraron diferencias sustanciales.

Únicamente encontramos diferencias asociados al tratamiento espermático en un mayor número de espermatozoides por ovocito penetrado en el grupo PBS-BSA a las 4 horas de incubación. Este hecho podría poner de manifiesto que el proceso de permeabilización de membrana que se produce en el proceso de capacitación mediado por la salida de colesterol (*Harrison et al.*, 1993), y que se puso de manifiesto al estudiar el desorden lipídico de la membrana, sea fundamental en estos espermatozoides que no han entrado en contacto con la secreción de las glándulas accesorias y los factores que modulan el proceso de capacitación.

En cuanto a los espermatozoides eyaculados se refiere, el tratamiento con Percoll® dio como resultado mayores porcentajes de penetración espermática que en los otros dos tratamientos. Y se hizo evidente a las dos horas de cocultivo confirmándose a las 4 horas.

La centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll® parece ser efectiva para recuperar la capacidad fecundante de algunos de los espermatozoides. Según se ha estudiado en la especie humana el lavado por centrifugación en solución salina elimina el plasma seminal de los espermatozoides más rápidamente que la separación por Percoll® (*Levy et al.*, 1995). Sin embargo, el tratamiento con Percoll® permite obtener fracciones puras de espermatozoides, mientras que los sistemas de lavado producen precipitados en los que se encuentra una población heterogénea de espermatozoides junto con material de desecho celular (*debris* celular) y restos del plasma seminal

(Grant *et al.*, 1994). Por otra parte, el tratamiento con Percoll® permite limpiar la superficie sin dañar la membrana plasmática manteniendo por tanto, la viabilidad espermática (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en nuestra experiencia coinciden con otros trabajos que mencionan el incremento de los porcentajes de penetración tras un lavado con Percoll® de los espermatozoides de verraco (Matás *et al.*, 2003) y la capacidad de producir embriones porcinos *in vitro* (Grant *et al.*, 1994; Jeong y Yang, 2001).

Como **resumen final** del trabajo y haciendo una visión global de todos los parámetros estudiados podemos deducir que los espermatozoides que mejor se capacitan son los eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll® ya que son los que presentan mayor hipermotilidad, mayores niveles de Ca^{2+} , mayor generación de ROS y, lo que podría ser más concluyente, la penetración en los ovocitos resulta más acelerada que en el resto de los grupos estudiados. Matás *et al.* (2003) obtuvieron formación pronuclear más rápida y mayor calidad embrionaria con espermatozoides eyaculados lavados en Percoll®. La explicación a sus resultados creemos que se encuentra en la rapidez con la que se capacita este tipo de espermatozoides bajo este tratamiento.

Es curioso observar también la importancia de la secreción de las glándulas accesorias, pues aunque en términos generales hacen que aparentemente se capaciten más rápido los espermatozoides eyaculados, finalmente la penetración se ve disminuida respecto de los epididimarios por lo que entre sus componentes hay factores que por un lado, facilitan la capacitación pero que finalmente existen otros que dificultan o retrasan la penetración en el ovocito. Por ello, en trabajos futuros intentaremos realizar estudios que permitan discriminar estos factores e intentar dilucidar que es lo que produce realmente el lavado con Percoll®, que selecciona tanto a los espermatozoides como parte de la secreción de las glándulas accesorias haciéndolos en definitiva más fértiles para su uso en FIV.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en los patrones de motilidad entre los espermatozoides incubados en el medio de FIV y los no incubados (epididimarios o eyaculados). Sin embargo, dadas las características del sistema CASA, creemos que no es posible discernir mediante los parámetros de motilidad que tratamiento induce un mayor número de espermatozoides capacitados. No obstante, después de todos los estudios realizados, el parámetro STR (índice de rectitud) podría ser el mejor indicador de capacitación espermática.
2. Los espermatozoides epididimarios y eyaculados al ser incubados en el medio de FIV muestran una entrada creciente de Ca^{2+} durante los 60 minutos de estudio. Los espermatozoides eyaculados lavados (PBS-BSA y Percoll®) son los que presentaron la concentración de Ca^{2+} intracelular más alta, por lo que deducimos que la secreción de las glándulas accesorias posee algún factor(es) que modula la entrada de este ión.
3. La generación de ROS es superior en espermatozoides eyaculados que en los espermatozoides de epidídimo siendo el tratamiento que induce una mayor generación de ROS, el lavado a través de un gradiente de Percoll®.
4. Los espermatozoides procedentes de epidídimo presentan el mayor porcentaje de bajo desorden lipídico al ser incubados en el medio de FIV, siendo más estables que los eyaculados. Este hecho podría explicar porqué necesitan más tiempo en el medio de fecundación para penetrar a los ovocitos respecto de los eyaculados lavados en gradiente de Percoll®.

5. Los espermatozoides eyaculados lavados en gradiente de Percoll® son los que experimentan mayor porcentaje de reacción acrosómica y mueren mas rápidamente que el resto.

6. La penetración con espermatozoides de epidídimo, a diferencia de los que ocurre con espermatozoides eyaculados, no se ve afectada por el tratamiento al que se someten los espermatozoides en los tiempos estudiados. Los espermatozoides eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll® penetran y se activan igual que los epididimarios con cuatro horas de cocultivo. Sin embargo, son capaces de penetrar con tan sólo dos horas de cocultivo.

Como **conclusión general** podemos decir que las pruebas utilizadas en este estudio evalúan la capacitación espermática aunque no todas proporcionan la misma información. No obstante, al analizar conjuntamente todos los parámetros, creemos que los espermatozoides que presentan un estado de capacitación más adecuado para su uso en FIV son los eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll®.

7. RESUMEN

7. RESUMEN

La capacitación espermática puede ser mimetizada *in vitro* eliminando el plasma seminal por distintos sistemas de lavado y/o incubando a los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal. Entre los tratamientos espermáticos empleados habitualmente en los laboratorios para capacitar a los espermatozoides se encuentran los lavados que se realizan con medios enriquecidos con albúmina o a través de gradientes de Percoll®. No obstante, los resultados de fecundación *in vitro* entre laboratorios son muy heterogéneos. La explicación a esta variabilidad la podríamos encontrar en el sistema de capacitación empleado o bien el tipo de espermatozoide con el que se trabaja.

Aunque en la mayoría de los casos, el medio de capacitación contiene sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), un aceptor de colesterol (albúmina), HCO_3^- y Ca^{2+} , además de determinados electrolitos; el mecanismo por el cual estos componentes promueven la capacitación sigue siendo motivo de estudio y su efecto sobre los espermatozoides también varía según el origen de éstos o según el tratamiento al que se les somete para capacitarlos previamente. Parte del proceso de capacitación ha podido ser ya identificado, así, se ha determinado una correlación entre la capacitación y la salida de colesterol de la membrana plasmática, lo que conlleva un incremento en la fluidez de la membrana, una modificación en la concentración de iones y una hiperpolarización de la membrana. Todo ello es necesario para que se produzca la hiperactivación y finalmente la reacción acrosómica.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar los cambios que acontecen en los espermatozoides (procedentes de epidídimo y eyaculados) sometidos a tres sistemas de capacitación *in vitro* evaluados mediante una batería de técnicas que determinan distintos estadios de la capacitación espermática.

Los espermatozoides de epidídimo procedían de testículos de animales sacrificados en matadero, solamente se utilizaron los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo. Los espermatozoides eyaculados se obtuvieron a partir de verracos de fertilidad probada. Se realizaron tres tratamientos de capacitación:

- 1) Espermatozoides no lavados (**NL**).
- 2) Espermatozoides lavados en medio PBS con un 0.3% de BSA (**PBS-BSA**).
- 3) Espermatozoides lavados a través de un gradiente de Percoll®, 45/75% y 45/90% v/v para espermatozoides epididimarios y eyaculados, respectivamente (**Percoll**).

Posteriormente, los espermatozoides de los tres grupos experimentales se resuspendieron en el medio de fecundación TALP.

Para la determinación de la capacitación espermática utilizamos la medición de los siguientes parámetros:

- Parámetros de motilidad espermática determinada por análisis computerizado de imágenes (CASA).
- Incremento de los niveles de Ca^{2+} evaluado mediante espectrofluorometría, utilizando el fluorocromo Fura2-AM.
- Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides marcados con H_2DCFDA y evaluados mediante citometría de flujo.
- Desorden lipídico de membrana plasmática evaluado mediante citometría de flujo con Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro1.
- Reacción acrosómica, evaluada mediante citometría de flujo utilizando yoduro de Propidio (IP) y lectina PNA.
- Penetración *in vitro* homóloga con ovocitos madurados *in vitro* cocultivados durante 2 y 4 horas.

En lo referente a la motilidad, encontramos que el tratamiento de los espermatozoides y la incubación de los mismos en el medio TALP inducen un incremento significativo en todos los parámetros de motilidad estudiados

comparados con el grupo control. En cuanto al efecto que tuvo sobre ellos el tratamiento espermático, se observó que el grupo NL mostró un porcentaje de motilidad superior al grupo PBS-BSA. Esta diferencia en la motilidad total no fue determinada en el porcentaje de motilidad progresiva. Por otra parte, se observaron diferencias en el patrón de movimiento. El grupo Percoll® presentó un patrón distinto a los otros dos tratamientos, con menor velocidad curvilínea (VCL) y menor amplitud lateral de cabeza (ALH) pero mayor linealidad (LIN) y rectitud (STR). Al evaluar el efecto del tratamiento espermático sobre los espermatozoides epididimarios y eyaculados sobre los distintos parámetros de motilidad, observamos que en términos generales los espermatozoides epididimarios mostraron mayor motilidad (total y progresiva), mayores velocidades (VCL, VSL y VAP) y menor ALH que los eyaculados.

El nivel de Ca^{2+} intracelular se incrementó en todos los grupos durante el tiempo de incubación del estudio. En términos generales, la concentración media en espermatozoides eyaculados fue superior a la de espermatozoides de epidídimo (472.27 nM vs. 101.84 nM), y los espermatozoides lavados con PBS-BSA o bien con Percoll® fueron los que presentaron los niveles más altos de Ca^{2+} (660.42 nM vs. 604.12 nM). La cinética de entrada de Ca^{2+} a lo largo del tiempo fue similar para todos los verracos y para los espermatozoides procedentes de los diferentes epidídimos utilizados en el estudio.

La producción de ROS fue incrementándose a lo largo del tiempo de incubación y estuvo afectada por el tratamiento espermático y por el origen de los espermatozoides. Los espermatozoides eyaculados produjeron la mayor cantidad de ROS, y dentro de éstos, los lavados con Percoll®.

El desorden lipídico de la membrana plasmática de los espermatozoides estudiados estuvo afectado tanto por el origen de los espermatozoides como por el tratamiento de capacitación empleado. Los espermatozoides eyaculados presentaron un mayor porcentaje de células viables y mayor desorden lipídico al inicio de la medición (tiempo = 0). Al finalizar el estudio (135 min) observamos que los espermatozoides de epidídimo presentaban menor desorden lipídico y mayor viabilidad que los espermatozoides

eyaculados. El tratamiento con PBS-BSA supuso una reducción de la viabilidad espermática en comparación con el resto de grupos.

La reacción acrosómica se vio influenciada tanto por el tratamiento como por el origen de los espermatozoides, de manera que el mayor porcentaje de reaccionados se obtuvo en espermatozoides eyaculados, y dentro de éstos, en los que habían sido lavados con BSA.

Los resultados de penetración *in vitro* se vieron afectados tanto por el origen espermático como por el tratamiento al que fueron sometidos los espermatozoides. A las 2 horas de cocultivo la penetración espermática fue significativamente superior cuando los espermatozoides eyaculados habían sido lavados a través de un gradiente de Percoll®, siendo similar para el resto de grupos. Cuando se dejaron transcurrir 4 horas de cocultivo, los resultados de penetración de espermatozoides epididimarios fueron muy superiores a los eyaculados, salvo para el caso del tratamiento Percoll®. Además, el mayor número de espermatozoides por ovocito se obtuvo con espermatozoides eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll®.

De los resultados obtenidos se desprende que tanto la procedencia de los espermatozoides (epidídimo o eyaculado) como el tratamiento de capacitación al que se les somete afecta en gran medida a los resultados de la penetración *in vitro* y por lo tanto, la capacitación se produce de manera diferente entre estos grupos, como se ve reflejado en los distintos parámetros estudiados. No obstante, todos estos parámetros a pesar de que han sido descritos como herramientas para evaluar la capacitación, realmente no son capaces de discriminar o indicar el grado de capacitación en el que se encuentran los espermatozoides, por lo que no los consideramos realmente útiles para estandarizar o predecir los resultados de FIV. Sin embargo, si que podemos afirmar que los espermatozoides eyaculados y lavados a través de un gradiente de Percoll® presentan un mayor grado de capacitación que el resto de grupos, hecho que se ve avalado por la rapidez con que estos espermatozoides son capaces de penetrar a los ovocitos.

8. SUMMARY

8. SUMMARY

Sperm capacitation can be imitated *in vitro* by separation of the seminal plasma by different systems of washing and/or incubating spermatozoa in medium comparable to that of the oviductal fluid. Between the sperm treatments routinely used in the laboratories, semen samples are washed of albumin or centrifugations through a Percoll's® gradient. Nevertheless, the results of *in vitro* fertilization between laboratories are very heterogeneous. The explanation to this variability we might find it in the capacitation system used or the kind of sperm.

In most cases, the capacitation medium contains energetic substrata (pyruvate, lactate, glucose), an acceptor of cholesterol (albumin), bicarbonate and calcium in addition to certain electrolytes; the mechanism for which these components promote capacitation continues to be a focus of study. Part of the capacitation process has been identified to be the efflux of cholesterol from the plasma membrane, which increases membrane fluidity, thus causes changes in ion concentration and membrane hyperpolarization. These processes are necessary for hyperactivation and finally the acrosome reaction to take place.

The aim of this work was examine and characterize the changes that happen in the sperms (from epididymis and ejaculated) submitted to three systems of *in vitro* capacitation, evaluated by means of a battery of tests to determine different levels of the sperm capacitation.

The epididymal spermatozoa from animals slaughtered at slaughter house. Spermatozoa were collected from the tail of the epididymis. The ejaculated spermatozoa were obtained from boars with proven fertility. Three treatments of capacitation were used:

- 1) Spermatozoa unwashed (**NL**).
 - 2) Spermatozoa washed in PBS with 0.3 % BSA (**PBS-BSA**).
 - 3) Spermatozoa washed in a Percoll's® gradient (45/75 % and 45/90 % v/v for epididymal and ejaculated spermatozoa, respectively (**Percoll**)).
- Then, all samples were re-suspended in fertilization TALP medium.

For determining sperm capacitation, we measured the following parameters:

- Sperm motility parameters determined by CASA.
- Increase in the levels of calcium was evaluated by fluorometry using Fura 2-AM.
- Production of reactive oxygen species (ROS) by spermatozoa stained with H₂DCFDA and evaluated by flow cytometry.
- Lipid disorder of plasma membrane evaluated by flow cytometry where spermatozoa were stained with Merocyanin 540 and Yo-Pro1.
- Acrosome reaction evaluated by flow cytometry using Propidium iodide and PNA lectin.
- *In vitro* penetration with oocytes matured *in vitro* cocultured for 2 and 4 hours.

All motility parameters were greatly modified in epididymal spermatozoa. However, independent of sperm origin, we observed differences existed in VCL, LIN and STR between samples washed with Percoll® compared to the other two groups.

The sperm treatments and their incubation in TALP medium induce a significant increase in all the motility parameters compared with the control group. We observed that NL group showed a percentage of motility higher than PBS-BSA group. This difference in the total motility was not determined in the percentage of progressive motility. We observed differences in motility pattern in Percoll® group, with lower VCL and ALH, but higher LIN and STR. Finally, we observed that epididymal spermatozoa showed higher motility (total and progressive), higher speed (VCL, VSL and VAP) and lower ALH than ejaculated spermatozoa.

The level of intracellular Ca^{2+} increased in all the groups during incubation throughout the study. In general, the average concentration of intracellular Ca^{2+} in ejaculated spermatozoa was higher than epididymal spermatozoa (472.27 nM vs. 101.84 nM). Spermatozoa washed in PBS-BSA or with Percoll® showed the highest levels of Ca^{2+} concentration (660.42 nM vs. 604.12 nM). Ca^{2+} influx kinetic throughout the time was similar for all boars and for all epididymal spermatozoa analysed.

ROS production increased throughout the time of incubation and was affected by sperm treatment and by the sperm origin. The ejaculated spermatozoa produced increased levels of ROS, particularly when washed through Percoll® gradient.

Membrane lipid disorder was modified in both epididymal and ejaculated samples as well as for different capacitation treatments. The epididymal spermatozoa presented a higher percentage of viable cells and lower lipid disorder than ejaculated spermatozoa. Ejaculated spermatozoa presented a higher percentage of viable cells and higher lipid disorder at the beginning of the study (time = 0). At the end of the study (135 min), the epididymal spermatozoa presented lower lipid disorder and higher viability than ejaculated spermatozoa. The treatment with PBS-BSA produced a reduction of sperm viability in comparison with the rest of groups.

The acrosome reaction was influenced by both sperm treatment and sperm origin. There were a higher percentage of reacted spermatozoa in ejaculated samples, particularly when washed in PBS-BSA.

In vitro penetration results showed that in 2 hours of coculture the sperm penetration was significantly better with ejaculated spermatozoa which had been washed through a Percoll's® gradient. There were no significant differences in penetration between the other groups. When they were left in coculture for 4 hours, penetration of epididymal spermatozoa was significant higher than samples with ejaculated spermatozoa, except for samples treated

with Percoll's®. In addition, more spermatozoa were found per oocyte in groups with ejaculated spermatozoa washed with Percoll's® gradient.

Sperm capacitation was dependent on sperm treatment, whether epididymal or ejaculated and to whichever parameter measured. Nevertheless, all these parameters, in spite of the fact that they have been described as tools to evaluate the sperm capacitation, really are not capable of discriminating or indicating the level of capacitation; for this reason we do not consider them to be really useful to standardize or to predict IVF results. Anyway, we can affirm that ejaculated spermatozoa washed with Percoll® gradient have a level of capacitation higher than the rest of groups, that we can verify by the speed with these spermatozoa are capable of penetrating oocytes.

9. ABREVIATURAS

9. ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa

ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza espermática

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ATP: adenosín trifosfato

BSA: *Bovine Serum Albumine* (albúmina sérica bovina)

BTS: *Betswille Thawing Solution*

BCF: frecuencia de batida de cabeza espermática

CASA: *Computer Assisted Sperm Analysis*

CO: *cumulus oophorus*

COCs: complejos *cumulus oophorus*-ovocito

C/PL: *ratio* Colesterol/Fosfolípidos de la membrana espermática

DMSO: dimetil sulfóxido

EPID: epididimario

Espz: espermatozoide

Espz/Ovo: número de espermatozoides por ovocito

EYAC: eyaculado

FICT: isotiocianato de fluoresceína

FIV: fecundación *in vitro*

Fn-II: proteínas del plasma seminal con dominio fibronectina tipo II

FO: fluido oviductal

GPI: glicosilfosfatidilinositol

HCG: *Human Chorionic Gonadotrophin* (Gonadotropina coriónica humana)

IP: ioduro de Propidio

LIN: índice de linealidad

MAE: membrana acrosomal externa

MAI: membrana acrosomal interna

M540: Merocianina 540

MIV: maduración *in vitro*

Mot: motilidad

Mot Prog: motilidad progresiva

MP: membrana plasmática

NCM: *Non Capacitating Medium* (medio no capacitante)

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (tampón fosfato salino de *Dulbecco* modificado)

PC: fosfaditilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PKA: proteín quinasa

PPF: *Porcine follicular fluid* (fluido folicular porcino)

PNA: lectina *Peanut agglutinin*

PMSG: *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (gonadotropina sérica de yegua gestante)

PS: fosfatidilserina

PSA: lectina *Pisum sativum agglutinin*

PVA: polivinil alcohol

RA: reacción acrosómica

ROS: *Reactive Oxygen Species* (especies reactivas de oxígeno)

SCA: *Sperm Class Analyzer*

SM: esfingomielina

SS: solución salina

STR: índice de rectitud

TALP: *Tyrod's Albumin Lactate Pyruvate* (medio Tyrod's con albúmina, lactato y piruvato)

VCL: velocidad curvilínea

VSL: velocidad rectilínea

VAP: velocidad media

WOB: índice de oscilación

ZP: zona pelúcida

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, del Barrio G (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod.* 60: 32-41.

Abeydeera LR, Day BN (1997). Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod.* 57: 729-734.

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online.* 8: 616.

Aitken RJ, Bridle JP (1993). Analysis of the ability of three targeting probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 8: 1663-69.

Aitken RJ (1994). A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev.* 6: 19-23.

Aitken RJ (1995). Mechanisms and prevention of lipid peroxidation in human spermatozoa. En: Fenichel P, Parinaud J. (eds.), *Human sperm acrosome reaction.* Inst Natl Sante' Recherche Medicale (Paris) pp. 339-353.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duim M (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci.* 108: 2017-2025.

Aitken RJ, Vernet P (1998). Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 53: 109-18.

Aitken RJ, Baker MA, O'Bryan M (2004). Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *J Androl.* 25: 455.

Akama K, Oka S, Tobita T, Hayashi H (1998). Changes in chromatin structure of boar late spermatids to mature spermatozoa by using modification with dansyl chloride. *Biochim Biophys Acta.* 1008: 198-202.

Alonso MA, Millán J (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocyte. *J Cell Sci.* 114: 3957-65.

Amann RP, Schanbacher BD (1983). Physiology of male reproduction. *J Anim Sci.* 57 Suppl 2: 380-403.

Amann RP (1989). Structure and function of the normal testis and epididymis. *J Amer Col Toxicol.* 8: 457-471.

- Anzar M, Graham EF (1996).** Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology*. 45: 513-20.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC (1999).** Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med*. 26: 869-80.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM (1999).** Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci*. 96: 6757-62.
- Arver S, Eliasson R (1980).** Zinc and magnesium in bull and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 60: 481-484.
- Asari M, Sasaki K, Miura K, Ichihara N, Nishita T (1996).** Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *Am J Vet Res*. 57: 439-443.
- Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF (1994).** Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 6: 173-180.
- Aumuller G, Renneberg H, Schiemann PJ, Wilhelm B, Seitz J, Konrad L, Wennemuth G (1997).** The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Exp Med Biol*. 424: 192-219.
- Austin CR (1951).** Observation of the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res*. 4: 581-596.
- Austin C R, Bishop MWH (1958).** Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc Roy Soc (London), Series B*. 149: 241.
- Austin CR (1960).** Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 3: 310-311.
- Babcock DF, Singh JP, Lardy HA (1979).** Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa. *Dev Biol*. 69: 85-93.
- Bailey JL, Storey BT (1994).** Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol Reprod Dev*. 39: 297-308.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G (1996).** Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci*. 15: 189-205.
- Barboni B, Lucidi P, Mattioli M, Berardinelli P (2001).** VLA-6 integrin distribution and calcium signalling in capacitated boar sperm. *Mol Reprod Dev*. 59: 322-9.
- Barros C, Yanagimachi R (1971).** Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature*. 233: 268-9.

- Bavister BD (1990).** Test of sperm fertilizing ability. En: Gamete Physiology. Asch RH, Balmaceda JP, Johnston I (eds.) Norwell. Serono Symposia (Massachusetts, USA) pp. 77-105.
- Bedford JM (1975).** Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. En: American Handbook of Physiology. Vol. V. Section 7. Male Reproductive System. Hamilton DW, Greep W (eds.) Waverly Press (Baltimore, USA) pp. 303-318.
- Bedford JM (1998).** Mammalian fertilization misread? Biol Reprod. 59: 1275-87.
- Bedford JM, Cross NL (1999).** Sperm Capacitation. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E, Neill JD (eds.) Academic Press (San Diego, USA). pp: 597-602.
- Benoff S (1993).** Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Hum Reprod. 8: 2001-6.
- Berger T, Horton MB (1988).** Evaluation of assay conditions for the zonafree hamster ova bioassay of boar sperm fertility. Gamete Res. 19: 101-111.
- Berger T, Parker K (1989).** Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. Gamete Res. 22: 385-397.
- Berridge MJ (1993).** Inositol trisphosphate and calcium signaling. Nature. 361: 315-325.
- Berridge MJ (1997).** Elementary and global aspects of calcium signalling. J Physiol (London). 499: 291-306.
- Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF (1998).** Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. Lupus7 Suppl. 2: 126-31.
- Blandau R, Rumery RE (1964).** The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. Fertil Steril. 15: 571-579.
- Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JW (1990).** Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. J Cell Biol. 111: 69-78.
- Boatman DE, Robbins RS (1991).** Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. Biol Reprod. 44: 806-813.
- Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y (1997).** Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. Rev Reprod. 2: 165-74.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S (2005).** Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. Reproduction 129: 263-268.
- Briz M, Bonet S, Pinart E, Egozcue J, Camps R (1995).** Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. J Androl. 16: 175-188.
- Brokaw CJ (1987).** Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. J Cell Biochem. 35: 175-84.

- Brooks DE (1983).** Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci.* 36: 205-221.
- Brown DA, London E (2000).** Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 275: 17221-24.
- Burgoyne RD, Morgan A (1995).** Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18: 191-6.
- Calvete JJ, Sanz L, Enßlin M, Töpfer-Petersen E (1996).** Sperm surface proteins. En: Rath D, Johnson LA, Weitze KF (eds.). *Boar Semen Preservation III. Reprod Dom Anim.* 31: 101-105.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E (1997).** Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *Febs Lett.* 407: 201-206.
- Calvin HI, Bedford JM (1971).** Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 13: 65-75.
- Camatini M, Anelli G, Casale A (1986).** Immunocytochemical localization of calmodulin in intact and acrosome-reacted boar sperm. *Eur J Cell Biol.* 41: 89-96.
- Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián Pérez JA (2006).** Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analysed by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theriogenology.* 66: 841-50.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, David E. C, Hille B, Garbers DL Babcock DF (2003).** CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Cell Biology.* 100: 14864-68.
- Centurión F, Vázquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, García EM, Martínez EA (2003).** Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod.* 69: 640-646.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM (2001).** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction.* 121: 395-401.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P (1990).** Identification of heparin433 binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 26: 313-318.
- Chang MC (1951).** Fertilizing capacity of sperm deposited into the Fallopian tubes. *Nature.* 68: 697-698.
- Chang MC (1952).** Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature *in vitro* on their subsequent fertilization and activation *in vivo*. *J Exp Zool.* 121: 351-381.
- Chang MC (1957).** A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature.* 179: 258-9.
- Cheng WTK (1985).** *In vitro* fertilization of farm animal oocytes. PhD Thesis. Council for National Academic Awards. (Cambridge, UK).

- Chenoweth P (1997).** Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Youngquist RS (ed.) Saunders. pp. 217.
- Chevrier C, Dacheux JL (1992).** Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. Cell Motil Cytoskeleton. 23: 8-18.
- Cohen J, Felten P, Zeilmaker GH (1981).** In vitro fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures. Fertil Steril. 36: 356-362.
- Colenbrander B, Kemp B (1990).** Factors influencing semen quality in pigs. J Reprod Fertil Suppl. 40:105-15.
- Collin S, Sirard MA, Dufour M, Bailey JL (2000).** Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. J Androl. 2000. 21: 938-43.
- Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF (1994).** Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. Dev Biol. 165: 10-9.
- Cooper TG (1990).** In defense of a function for the human epididymis. Fertil Steril. 54: 965-75.
- Cooper TG, Yeung CH, Meyer R, Schulze H (1990).** Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture. J Reprod Fertil. 90: 81-91.
- Cooper TG (1996).** The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. Springer-Verlag (Berlin).
- Cooper TG (1998).** Epididymis. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E, Neill JD (eds.) Vol 2. Academic Press (San Diego, USA). pp: 1-12.
- Coronel CE, Lardy HA (1992).** Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig. Mol Reprod Dev 33: 74-80.
- Cox T, Peterson RN (1989).** Identification of calcium conducting channels in isolated boar sperm plasma membranes. Biochem Biophys Res Commun. 30: 162-8.
- Cox T, Campbell P, Peterson RN (1991).** Ion channels in boar sperm plasma membranes: characterization of a cation selective channel. Mol Reprod Dev. 30: 135-47.
- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C (1993).** Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. Theriogenology 40: 539-546.
- Coy P, Romar R (2002).** In vitro production of pig embryos: a point of view. Reprod Fertil Dev. 14: 275-86.
- Crabo BG, Hunter AG (1975).** Sperm maturation and epididymal function. En: Control of male fertility. Sciarra JJ, Markland C, Speidel J (eds.) Harper & Row. pp. 2-23.
- Cross NL, Morales P, Over JW, Hanson FW (1986).** Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res. 15: 213-226.

- Cross NL, Overstreet JW (1987).** Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res.* 16: 23-35.
- Cross NL (1998).** Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59: 7-11.
- Cummings RD (1994).** Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods Enzymol.* 230: 66-86.
- Cummins JM (1995).** Tests of sperm function. En: *Gametes. The Spermatozoon.* Grudzinskas JG, Yovich JL (eds.) Cambridge University Press. pp. 70-103.
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F (2003).** Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech.* 61: 7-17.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F (2005).** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63(2):319-41.
- Darin-Bennett A, White IG (1977).** Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 14: 466-470.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F (1999).** Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev.* 79: 481-510.
- Darszon A, Beltran C, Felix R, Nishigaki T, Trevino CL (2001).** Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* 240: 1-14.
- Darszon A, López-Martínez P, Acevedo JJ, Hernández-Cruz A, Treviño CL (2006).** T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium.* 40: 241-52.
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR (1993).** Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil.* 99: 135-143.
- Davis BK, Niwa K (1974).** Inhibition of mammalian fertilization in vitro by membrane vesicles from seminal plasma. *Proc Soc Exp Biol Med.* 46: 11-6.
- Davis BK, Byrne R, Hungund B (1979).** Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 558: 257-66.
- Davis BK, Byrne R, Bedigian K (1980).** Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 1546-50.
- Davis RO, Siemers RJ (1995).** Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev.* 7: 857-69.
- Day BN (2000).** Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim Reprod Sci.* 60:161-172.
- De Alba C, Marigorta P, Saiz F, Strzezek I, Lyczynsky A, Martin S (1996).** Aspartate aminotransferase activity changes during boar semen preservation at 15°C. *J Physiol Pharmacol.* 47: 2.

- De Lamirande E, Belles-Isles M, Gagnon C (1984).** Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Ann N Y Acad Sci.* 438: 25-31.
- De Lamirande E, Gagnon C. (1995)** Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Rad Bio Med.* 18: 487-495.
- De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997a).** Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 3: 175-94.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C (1997b).** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* 2: 48-54.
- De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003).** Bicarbonate dependent exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of capacitating human sperm. *Biol Reprod.* 68: 2122-2134.
- Desnoyers L, Manjunath P (1992).** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* 267: 10149-55.
- Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA (1997).** Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 56: 861-869.
- Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E (1994).** Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1200: 48-54.
- Dott HM, Harrison RAP, Foster GCA (1979).** The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil.* 55: 113-124.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H (1999).** Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod.* 61: 1226-34.
- Dukelow W, Chernoff H, Williams W (1967).** Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J Reprod Fertil.* 14: 393-9.
- Espinosa F, López-González I, Muñoz-Garay C, Felix R, De la Vega-Beltrán JL, Kopf GS, Visconti PE, Darszon A (2000).** Dual regulation of the T-type Ca^{2+} current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* 475: 251-6.
- Evans RW, Setchell BP (1979).** Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis fluid. *J Reprod Fertil.* 57: 189-96.
- Fayemi EO, Crabo BG, Graham EF (1979).** Assay of frozen boar semen with Sephadex filtration. *Theriogenology* 12: 13-7.
- Fazeli A, Duncan A, Watson P, Holt W (1999).** Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60: 879-886.

Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane *Biochem Biophys Res Commun.* 262: 787-792.

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

Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, Van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM (2001a). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* 114: 3543-55.

Flesch FM, Wijnand E, van de Lest CH, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM (2001b). Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 60: 107-15.

Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod.* 59: 12-6.

Flowers S. 1998. Future studies on rapid warming of boar semen on sperma morphology and physiology. *Reprod Fertil.* 75: 133-138.

Flowers WL, Turner ZA (1997). Relationships among motility, morphology and fertility estimates for boar semen. *J Anim Sci* 75: 223.

Flowers WL (2004) Anatomía y fisiología del verraco. *Av Tecnol Porc.* 2: 40- 51.

Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod.* 62: 1790-803.

Fournier-Delpech S, Thibault C (1993). Acquisition of sperm fertilizing ability. En: *Reproduction in Mammals and Man.* Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds.) Ellipses (Paris). pp. 257-278.

Forf WCL (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 10: 387-399.

Foxcroft GR, Xu X, Seth PC, Harbison DS, Cheung AP (1995). Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* 53: 212.

Fraser LR (1987). Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil.* 81: 77-89.

Fraser LR (1990). Sperm capacitation and its modulation. En: *Fertilization in Mammals.* Bavister BD, Cummings J, Roldán ER (eds.) Norwell (Milán). pp. 141-153.

Fraser LR, Harrison RA, Herod JE (1990). Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 89: 135-148.

Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995). Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev.* 40: 233-41.

Frei B, Stocker R, England L, Ames BN (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol.* 264: 155-163.

Fridovich I (1976). Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 74: 530-9.

Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272: 18515-18517.

Fridovich I (2003). Editorial commentary on "Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide" by **H. Zhao** et al. *Free Radic Biol Med* 34: 1357-58.

Funahashi H, Day BN (1993). Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil.* 99: 97-103.

Funahashi H, Day BN (1997). Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fertil.* 52: 271-283.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN (1997). Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol Reprod.* 57: 49-53.

Funahashi H (2003). Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod Fertil Dev.* 15: 167-177.

Funahashi H, Romar R (2004). Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pretreatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. *Reproduction.* 128: 789-800.

Furimsky A, Vuong N, Xu H, Kumarathasan P, Xu M, Weerachayanukul W, Bou Khalil M, Kates M, Tanphaichitr N (2005). Percoll gradient-centrifuged capacitated mouse sperm have increased fertilizing ability and higher contents of sulfogalactosylglycerolipid and docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine compared to washed capacitated mouse sperm. *Biol Reprod.* 72: 574-83.

Gadea J, Ruiz S, Coy P, Poto A, Peinado B, Romar R, Campos I, Zubilaga O (1998). *In vitro* fertilization with frozen boar semen. *Arch Zootec.* 47: 299-304.

Gadea J, Matás C (2000). Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology.* 54: 1343-1357.

Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm alter cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62: 690-701.

Gadea J (2005). Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology* 63: 431-444.

- Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, van Golde LMG, Harrison RAP (1999).** Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev.* 53: 108-125.
- Gadella BM, Harrison RA (2000).** The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development.* 127: 2407-20.
- Gadella BM, Van Gestel RA (2004).** Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 307-329.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS (1997).** Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 56: 707-19.
- Garbers DL, Tubb DJ, Hyne RV (1982).** A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem.* 257: 8980-4.
- García Herreros M, Aparicio IM, Núñez I, García-Marín LJ, Gil MC, Peña Vega FJ (2005).** Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology.* 63: 795-805.
- Garner DL, Hafez ESE (1989).** Espermatozoides y plasma seminal. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* Hafez ESE (ed.) Interamericana/McGraw-Hill (Mexico). pp. 205-226.
- Garner DL, Hafez ESE (1993).** Spermatozoa and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals*, 6th edition. Hafez ESE (ed). Lea and Febiger. (Philadelphia. USA). pp. 165-187.
- Garner DL, Hafez ESE (1996).** Espermatozoides y plasma seminal. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Hafez ESE (ed.) Interamericana McGraw-Hill (México). pp. 158-179.
- Garty NB, Salomon Y (1987).** Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *Febs Lett.* 218: 148-52.
- Gatti JL, Druart X, Guérin Y, Dacheux F, Dacheux JL (1999).** A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol Reprod.* 60: 937-45.
- Geisert RD (1999).** Pigs. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (eds.) Academic Press (San Diego, USA). pp. 792-799.
- Ghaoui Rel-H, Thomson PC, Evans G, Maxwell WM (2004).** Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reprod Dom Anim.* 39: 173-80.
- Gil MA, Ruiz M, Cuello C, Vázquez JM, Roca J, Martínez EA (2004).** Influence of sperm/oocyte ratio during in vitro fertilization of in vitro matured cumulus-intact pig oocytes on fertilization parameter and embryo development. *Theriogenology.* 61: 551-560.

- Go KJ, Wolf DP (1985).** Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod.* 32: 145-153.
- Goldstein IJ, Cortez RD (1986).** Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. En: *The Lectins*. Liener JE, Sharon N, Goldstein IJ (eds.) Academic Press (New York, USA) pp. 233-247.
- Gómez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ (1996).** Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17: 276-287.
- Goyal HO, Williams CS. (1991).** Regional differences in the morphology of the goat epididymis: a light microscopic and ultrastructural study. *Am J Anat.* 190: 349-69.
- Grant SA, Long SE, Parkinson TJ (1994).** Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil.* 100: 477-483.
- Green CM, Cockle SM, Watson PF, Fraser L (1996).** A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, a TRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatazoa. *Mol Reprod Dev.* 45: 244-252.
- Green CE, Watson PF (2001).** Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction.* 122: 889-98.
- Griveau JF, Renard P, Le Lannou D (1994).** An in vitro promoting role of human sperm capacitation for hydrogen peroxide. *Int J Androl.* 17: 300-307.
- Griveau JF, Renard P, Le Lannou D (1995).** Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl.* 18: 67-74.
- Griveau JF, Le Lannou D (1997).** Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *Int J Androl.* 20: 195-200.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985).** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-50.
- Gross MK, Toscano DG, Toscano WA (1987).** Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J Biol Chem.* 262: 8672-8676.
- Guthrie HD, Welch GR (2006).** Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 84: 2089-100.
- Hafez ESE (1993).** Anatomy of male reproduction. En: *Reproduction in Farm Animals*, 6th edition. Hafez ESE (ed). Lea and Febiger. (Philadelphia, USA). pp 3-19.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999).** *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press (Oxford, RU). pp. 936.

- Hamilton DW (1975).** Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. En: Handbook of Physiology. Hamilton DW, Greep W (eds.) Waverly Press (Baltimore, USA). pp. 259-301.
- Hammit DG, Martin PA, Callanan T (1989).** Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine semen quality before and after cryopreservation. Theriogenology. 32: 385-99.
- Hammer CE, Williams WL (1964).** Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. Proc Soc Exp Biol Med. 117: 240-3.
- Handrow RR, First NL, Parrish JJ (1989).** Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. J Exp Zool. 252: 174-82.
- Harayama H, Kato S (1992).** Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. Anim Sci Technol (Jpn). 3: 462-467.
- Harayama H, Miyake M, Shidara O, Iwamoto E, Kato S (1998).** Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 10: 445-50.
- Harayama H, Miyake M (2006).** A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa. Mol Reprod Dev. 73: 1169-78.
- Harkema W, Colenbrander B, Engel B, Woelders H (2004).** Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. Theriogenology. 61: 215-26.
- Harrison RA, Mairet B, Miller NG (1993).** Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. Mol Reprod Dev. 35: 197-208.
- Harrison RA (1996).** Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev. 8: 581-594.
- Harrison RA, Ashworth PJC, Miller NGA (1996).** Bicarbonate/ CO_2 , an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. Mol Reprod Dev 45: 378-391.
- Harrison RA, Miller NG (2000).** cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. Mol Reprod Dev. 55: 220-228.
- Harrison RA, Gadella BM (2005).** Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. Theriogenology. 63: 342-51.
- Hinton BT, Dott HM, Setchell BP (1979).** Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. J Reprod Fertil. 55: 167-172.
- Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C (2001).** Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. J Assist Reprod Genet. 18: 213-218.

Ho HC, Suarez SS (2001). An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod.* 65: 1606-15.

Holt C, Holt WV, Moor HDM, Reed HCB, Curnock RM (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl.* 18: 312-23.

Holt WV, Harrison RA (2002). Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl.* 23: 557-565.

Hoodbhoy T, Talbot P (1994). Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev.* 39: 439-48.

Hoodbhoy T, Talbot P (2001). Characterization, fate and function of hamster cortical granule components. *Mol Reprod Dev.* 58: 223-35.

Humphries GM, Lovejoy JP (1984). Membrane structure and the tenuously maintained resistance to staining with N epsilon-dansyl-L-lysine shown by many cells. *J Membr Biol.* 77: 115-22.

Hunter RHF (1982). The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. I Wilmot. *Anim Reprod Sci.*

Hunter RHF (1988). Their Role in Fertility and Infertility. En: *The Fallopian Tubes.* Springer-Verlag (Berlin). pp. 53-80.

Hunter RHF (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev.* 29: 385-391.

Hunter T (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 100: 113-127.

Hyne RV, Garbers DL (1979). Calcium-dependent increase in adenosine 3',5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 5699-703.

Iwamatsu T, Chang MC (1971). Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil.* 26: 197-208.

Iwamoto T, Gagnon C (1988). Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *J Androl.* 9: 377-383.

Iwamoto T, Tsang A, Luterman M, Dickson J, de Lamirande E, Okuno M, Mohri H, Gagnon C (1992). Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 31: 55-62.

Jeong BS, Yang X (2001). Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Mol Reprod Dev.* 59: 330-335.

Jeulin C, Lewin LM, Chevrier C, Schoevaert-Brossault D (1996). Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: manual and computer-aided image analysis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 35: 147-61.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000).** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 62: 143-172.
- Jonakova V, Manasková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M (2000).** Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev.* 56: 275-7.
- Jonakova V, Manasková P, Tichá M (2007).** Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 849: 307-14.
- Jones R (1998).** Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 53: 73-84.
- Jonson M, Everitt B (1980).** Essential reproduction. Blackwell Sci Pub. 1^a Ed. pp. 33.
- Kalab P, Peknicová J, Geussová G, Moos J (1998).** Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev.* 51: 304-14.
- Kamp G, Lauterwein J (1995).** Multinuclear magnetic resonance studies of boar seminal plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1243: 101-9.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A (1979).** Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 31: 321-7.
- Katayama KP, Stehlik E, Jeyendran RS (1989).** In vitro fertilization outcome: glass wool-filtered sperm versus swim-up sperm. *Fertil Steril.* 52: 670-2.
- Kato S, Shibukawa T, Harayama, Kannan Y (1996).** Timing of Shedding and Disintegration of Cytoplasmic Droplets from Boar and Goat Spermatozoa. *J Reprod Dev.* 23: 237-241.
- Keating J, Grundy CE, Fivey PS, Elliott M, Robinson J (1997).** Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil.* 110: 71-77.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. (1993).** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 49: 1202-1207.
- Kirchhoff C (1999).** Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol.* 188: 133-202.
- Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C (1996).** Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl.* 17: 151.
- Kumar GP, Laloraya M, Laloraya MM (1991).** Superoxide radical level and superoxide dismutase activity changes in maturing mammalian spermatozoa. *Androl.* 23: 171-175.
- Kwok SCM, Yang D, Dai G, Soares MJ, Chen S, McMurtry JP (1993).** Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family. *DNA Cell Biol.* 12: 605-610.
- Langlais L, Roberts KD (1985).** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12: 1883-224.

Larsen RE (1986). Semen collection from the boar. En: Current therapy in 2. Morrow DA (ed). Saunders, WB. (Philadelphia, USA). pp. 969-972.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci.* 60-61: 327-36.

Lavon V, Bournsell JC (1971). Characterization of boar seminal plasma, vesicular secretion and epididymal plasma proteins by gel disc electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide. *J Reprod Fertil.* 27: 227-232.

Lee MA, Storey BT (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod.* 34: 349-56.

Levay PF, Fourie FR, Bezuidenhout C, Koch A (1995). Effectiveness of various sperm processing methods in removing seminal plasma from insemination media. *Hum Reprod.* 10: 2056-60.

Leyton L, Saling P (1989). 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell.* 57: 1123-1130.

Lindemann CB, Kanous KS (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl.* 23: 1-22.

Llanos MN, Meizel S (1983). Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm in vitro. *Biol Reprod.* 28: 1043-1051.

Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.* 278: 15922-6.

Lusignan MF, Bergeron A, Crête MH, Lazure C, Manjunath P (2007). Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod.* 76: 424-32.

Maas DH, Storey BT, Mastroianni Jr L (1977). Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril.* 28: 981-985.

Mack SR, Everingham J, Zaneveld LJ (1986). Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. *J Exp Zool.* 240: 127-36.

Manaskova P, Jonakova V (2008). Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J Reprod Immunol.* 78: 40-8.

Manjunath P, Sairam MR (1987). Purification and characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J.* 241: 685-692.

Manjunath P, Baillargeon L, Marcel YL, Seidah NG, M. C, Chapdelaine A (1988). Diversity of novel proteins in gonadal fluids. En: *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems.* Mckerns KW, Chrétien M (eds.) (Plenum Press, New York). pp. 259-273.

Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A (1989). Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem.* 264: 16853-57.

Manjunath P, Therien I (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 53: 109-119.

Marchetti C, Obert G, Deffosez A (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 17: 1257.

Marquez B, Suarez SS (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod.* 70: 1626-33.

Martínez EA, Vázquez JM, Matás C, Gadea J, Alonso I, Roca J (1996). Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biol Reprod.* 55: 134-140.

Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr (1977). Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril.* 28: 981-5.

Mastroianni L Jr, Komins J (1975). Capacitation, ovum maturation, fertilization and preimplantation development in the oviduct. *Gynecol Invest.* 6: 226-233.

Matás C, Martínez E, Vázquez JM, Roca J, Gadea J (1996). In vitro penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology.* 46: 503-513.

Matás C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S (2003). Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs. *Reproduction.* 125: 133-41.

Matás C, Decuadro G, Martínez-Miró S, Gadea J (2007). Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology.* 67: 1087-91.

Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Seren E (1988). Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocytes. *Gamete Res.* 21: 223-232.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E (1989). Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 31: 1201-7.

Marín S (1982). Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Aedos (Barcelona).

Maxwell WMC, Johnson LA (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology.* 48: 209-19.

Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev.* 8: 1165-78.

Maxwell WMC, Johnson LA (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology.* 52: 1353-1362.

Medeiros CM, Parrish JJ (1996). Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Mol Reprod Dev.* 44: 525-532.

Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 13: 29-35.

Mennella MR, Jones R (1989). Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem J.* 191: 289-97.

Mollova M, Atanasov B, Nedkova R, Kyurkchiev S (2006). Biochemical and immunochemical characterization of boar sperm flagellar protein with role in hyperactivation/capacitation process. *Reprod Biol.* 6: 79-94.

Monks NJ, Stein DM, Fraser LR (1986). Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue. *Int J Androl.* 9: 67-76.

Mortimer ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 3: 403-39.

Mortimer ST (2000). CASA-practical aspects. *J Androl.* 21: 515-24.

Morton B, Harrigan-Lum J, Albagli L, Jooss T (1974). The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 56: 372-379.

Muller K, Pomorski T, Muller P, Zachowski A, Hermann A (1994). Protein dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry.* 33: 9968-74.

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

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S (1999). Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril.* 71: 919-23.

Neill JM, Olds-Clarke PA (1987). A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* 18: 121-40.

Niwa K (1993). Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil. Suppl.* 48: 49-59.

Nolan JP, Graham JK, Hammersted RH (1992). Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch Biochem Biophys.* 292: 311-322.

Nolan JP, Magargee SF, Posner RG, Hammerstedt R (1995). Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochemistry.* 33: 9968-74.

O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT (1999). Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology.* 52: 289-301.

O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT (2003). Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl.* 26: 109-14.

Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 260: 9699-705.

Okamura N, Tanba M, Fukuda A, Sugita Y, Nagai T (1993). Forskolin stimulates porcine sperm capacitation by increasing calcium uptake. *Febs Lett.* 316: 283-286.

Okamura N, Iwaki Y, Hiramoto S, Tamba M, Bannai S, Sugita Y (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 1336: 99-109.

Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. (2004). Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem.* 279: 33742-50.

Oliphant G, Reynolds A, Thomas T (1985). Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat.* 174: 269-83.

Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec.*19: 426-436.

Orgebin-Crist MC, Jonas-Davies J, Storey P, Olson GE (1984). Effect of D-valine and cytosine arabinoside on [3H]thymidine incorporation in rat and rabbit epididymal epithelial cell cultures. *In Vitro.* 20: 45-52.

Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS (1999). Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod.* 5: 1017-1026.

Osman RA, Andria ML, Jones DA, Meizel S (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 160: 828-833.

O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM (2001). Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11: 1571-84.

Overstreet JW, Bedford JM (1974). Transport, capacitation and fertilizing ability of epididymal spermatozoa. *J Exp Zool.* 189: 203-14.

Parks JE, Hammerstedt RH (1985). Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod.* 32: 653-668.

Parks JE, Arion JW, Foote RH (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 37: 1249-58.

Parks JE, Lynch DV (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 29: 255-66.

- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL (1994).** Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod.* 51: 1099-1108.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL (1995).** Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 44: 859-69.
- Pavlok A (1981).** Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *Int J Fertil.* 26: 101-6.
- Pawson T (2004).** Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell.* 116: 191-203.
- Pérez-Pé R, Barrios B, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA (2001).** Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromat.* 760: 113-121.
- Petters RM, Wells KD (1993).** Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 48: 61-73.
- Peterson RN, Ashraf M, Russell LD (1983).** Effect of calmodulin antagonists on Ca²⁺ uptake by boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 114: 28-33.
- Peterson RN, Chaudhry P, Tibbs B (1989).** Calcium-binding proteins of boar spermatozoan plasma membranes: identification and partial characterization. *Gamete Res.* 23: 49-60.
- Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Töpfer-Petersen E, Waberski D (2005).** Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology.* 64: 1766-82.
- Phillips DM, Jones R, Shalgi R (1991).** Alterations in distribution of surface and intracellular antigens during epididymal aturation in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 29: 347-356.
- Piehl LL, Cisale H, Torres N, Capani F, Sterin-Speziale N, Hager A (2006).** Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Anim Reprod Sci.* 92: 401-10.
- Pinart E, Sancho S, Briz M., Bonet S, Garcia N, Badia E. (2000).** Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *J Morphol.* 244: 190-202.
- Pinart E, Bonet S, Briz M, Pastor L.M, Sancho S, Garcia N, Badia E, Bassols J. (2001).** Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid *Sus domesticus* males. *Int J Androl.* 24: 153-164.
- Polge C (1978).** Fertilization in the pig and horse. *J Reprod Fertil.* 54: 461-70
- Pollanen P, Cooper TG (1994).** Immunology of the testicular efferent ducts. *J Reprod Immunol.* 26: 167-216.
- Pommer AC, Rufflant J, Meyers SA (2003).** Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod.* 68: 1208-1214.

- Prathers RS, Day BN (1998).** Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology*. 49: 23-32.
- Primakoff P, Myles DG (2002).** Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*. 21: 2183-5.
- Pukazhenti BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J (1998).** Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev*. 49:48-57.
- Purohit SB, Laloraya M, Kumar GP (1999).** Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl*. 1: 95-107.
- Pursel VG, Johnson LA (1975).** Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*. 40: 99-102.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers, DL (2003).** Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 14869-74.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004).** Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 61: 673-90.
- Ramió-Lluch L, Rivera M, Rigau T, Balasch S, Rodríguez-Gil J (2006).** OC5 Filtration Thought Sephadex Columns Does not Alter the Subpopulation Characteristics in Fresh Boar Semen. *Reprod Dom Anim. Suppl 2*, 41: 104.
- Ramió L, Rivera MM, Ramírez A, Concha II, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2008).** Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. *Theriogenology*. 69: 501-12.
- Rath D (1992).** Experiments to improve in Vitro fertilization techniques for in vivo matured porcine oocytes. *Theriogenology*. 37: 885-896.
- Rath D, Niemann H (1997).** In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*. 47: 785-93.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA (1999).** In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci*. 77: 3346-52.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM (2001).** Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*. 65: 462-470.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001).** A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413: 603-609.
- Ricci G, Presani G, Guaschino S, Simeone R, Perticarari S (2000).** Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Human Reprod* 15: 1329-37.

Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Elkovitz N, Breitbart H (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 70: 518-522.

Robaire B, Hermo L (1988). Efferent ducts, epididymis and vas deferens: Structure functions and their regulation. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E, Neill JD. (eds.) Raven Press (New York, USA). pp. 999-1080.

Robaire B, Viger RS (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod.* 52: 226-36.

Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM (2003). Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod.* 69: 572-81.

Rochwerger L, Cohen DJ, Cuasnicú PS (1992). Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol.* 153: 83-90.

Rodríguez-Martínez H, Ekstedt E, Einarsson S (1990). Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int. J Androl.* 13: 238-243.

Rodríguez-Martínez H, Larsson B, Pertoff H (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev.* 9: 297-308.

Rodríguez-Martínez H, Thienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl* 58: 129-145.

Roldán ERS (1998). Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis. En: *Gametes: Development and function.* Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L (eds.) Serono (Roma, Italia). pp. 219-228.

Sakata Y, Saegusa H, Zong S, Osanai M, Murakoshi T, Shimizu Y, Noda T, Aso T, Tanabe T (2002). Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *Febs Lett.* 516: 229-33.

Sanocka D, Kurpisz M (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 23: 2-12.

Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Schmid ER, Amselgruber W, Sinowatz F, Ehrhard M, Topfer-Petersen E (1992). The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *Febs Lett.* 300: 213-218.

Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius H-J, Topfer-Petersen E (1993). Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev.* 35: 37-43.

Saxena NK, Saxena N, Hunt W, Peterson RN, Henry L, Russell LD (1986). Increase in the concentration of major boar sperm surface proteins during maturation in the epididymis. *J Cell Sci.* 82: 295-308.

Schmidt H, Kamp G (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction.* 128: 171-9.

- Schroeder F, Nemezc G, Wood W G, Joiner C, Morrot G, Ayrault Jarrier M, Devaux P F (1991).** Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*. 1066: 183-92.
- Schroter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R (1999).** The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod*. 5: 302-13.
- Senger PL (1999).** Pathways to Pregnancy and Parturition. *Current Conceptions*. (Washington, USA). pp 37-51.
- Setchell BP (1991).** Male reproductive organs and semen. En: *Reproduction in Domestic Animals*. Cupps PT (ed.). Academic Press (California, USA). 6: 221-249.
- Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE (1994).** Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (eds.) Raven Press (New York, USA). pp: 1063-1175.
- Shalgi R, Matityahu A, Gaunt SJ, Jones R (1990).** Antigens on rat spermatozoa with a potential role in fertilization. *Mol Reprod Dev*. 25: 86-96.
- Shamsuddin M, Rodríguez-Martínez H (1994).** A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim Reprod Sci*. 36: 61-75.
- Sharma RK, Agarwal A (1996).** Role of reactive oxygen species in male infertility (review). *Urology*. 48: 835-50.
- Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AL, Agarwal A (1995).** A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol*. 28: 31-5.
- Shi QX, Roldan ER (1995).** Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod*. 52: 540-546.
- Shivaji S, Scheit K-H, Bhargava PM (1990).** *Proteins of Seminal Plasma*. Wiley & Sons. (New York, USA).
- Si Y, Okuno M (1999).** Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod*. 61:240-246.
- Simons K, Toomre D (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Simons K, Vaz W L (2004).** Model systems, lipid rafts, and cell membranes1. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 33: 269-295.
- Singh JP, Babcock DF, Lardy HA (1978).** Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J*. 172: 549-556.
- Sirard MA, Dubuc A, Bolamba D, Zheng Y, Coenen K (1993).** Follicle–oocytes–sperm interactions in vivo and in vitro in pigs. *J Reprod Fertil (Suppl)*. 48: 3-16.

- Snider DR, Clegg ED (1975).** Alteration of Phospholipids in Porcine Spermatozoa during *In Vivo* Uterus and Oviduct Incubation. *J Anim Sci.* 40: 269-274.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS (1995).** Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod.* 53: 1280-5.
- Stein DM, Fraser LR (1984).** Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* 10: 283-299.
- Stillwell W, Wassall SR, Dumaual AC, Ehringer WD, Browning CW, Jenki LJ (1993).** Use of merocyanine (MC540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1146: 136-44.
- Stoffel MH, Busato A, Friess AE (2002).** Density and distribution of anionic sites on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochem Cell Biol.* 117: 441-5.
- Storey BT (1997).** Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 3: 203-13.
- Strzezek J, Hopfer E, Zaborniak A (1987).** Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Anim Reprod Sci.* 13: 133-142.
- Strzezek J (2002).** Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol.* 2: 243-66.
- Suarez SS, Vincenti L, Ceglia MW (1987).** Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool.* 244: 331-336.
- Suarez SS, Dai XB, DeMott RP, Redfern K, Miranda MA (1992).** Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated *in vitro*. *J Androl.* 13: 75-80.
- Suarez SS (2002).** Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim.* 37: 140-143.
- Suarez SS, Ho HC (2003).** Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Dom Anim.* 38: 119-124.
- Sun GH, Liu HW, Lin YC, Yu DS, Chang SY (2000).** Identification of maturation-related wheat-germ lectin-binding proteins in the culture of human corpus epididymal epithelial cells. *Arch Androl.* 45: 53-60.
- Sutkeviciene N, Andersson MA, Zilinskas H, Andersson M (2005).** Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology.* 63: 739-47.
- Suzuki F, Yanagimachi R (1989).** Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.* 23: 335-47.
- Suzuki F (1990).** Morphological aspects of sperm maturation. En: *Fertilization in Mammals.* Bavister BD, Cummins J, Roldán ERS (eds.) Norwell (Massachusetts, USA). pp. 65-75.
- Suzuki K, Mori T, Shimizu H (1996).** Effect of the duration of preincubation on the ability of pig spermatozoa to penetrate oocytes *in vitro*. *Anim Sci Technol.* 67: 24-27.

- Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H (2002).** Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl.* 25: 84-93.
- Suzuki K, Nagai T (2003).** In vitro fertility and motility characteristics of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. *Theriogenology.* 60: 1481-94.
- Talbot P, Dandekar P (2003).** Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech.* 61: 349-57.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL (2001).** Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 65: 784-792.
- Tardif S, Dubé C, Bailey JL (2003).** Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod.* 68: 207-13.
- Tash JS (1989).** Protein phosphorylation; the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskel.* 14:332 -339
- Therien I, Bleau G, Manjunath P. (1995).** Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod.* 52: 1372-1379.
- Therien, I, Soubeyrand, S, Manjunath, P. (1997).** Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by highdensity lipoprotein. *Biol Reprod.* 57: 1080-1088.
- Therien I, Moreau R, Manjunath P (1998).** Major proteins of bovine seminal plasma and high449 density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* 59: 768-776.
- Therien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P (2005).** Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev.* 71: 97-106.
- Thienthai P, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H (2004).** Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci.* 80: 131-146.
- Tiwari-Woodruff SK, Cox TC (1985).** Boar sperm plasma membrane Ca(2+)-selective channels in planar lipid bilayers. *Am J Physiol.* 268: 1284-94.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostolova Z, Sanz L, Calvete JJ (1998).** Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Androl.* 30: 217-224.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hundrieser M (2000).** Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 653-662.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H (2005).** The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci.* 89: 159-170.

- Tramer F, Rocco F.; Micali F, Sandri G, Panfili E. (1998).** Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 59: 753-8.
- Turner TT (1991).** Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann NY Acad Sci.* 637: 364-383.
- Turner TT, Gleavy JL, Harris JM (1990).** Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *J Androl.* 11: 422-8.
- Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall A, Cowland J, Borregard N, Kjeldsen L. (2005).** Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl.* 26: 333-342.
- Usselman M, Cone R (1983).** Rat sperm and mechanically inmovilized in the cauda epididymis by "inmobilin", a high molecular weight glycoprotein. *Biol Reprod.* 29: 1241-1253.
- Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K (2005).** Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci.* 87: 121-132.
- Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Coy P, Pastor LM (1993).** Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev.* 36: 84-88.
- Vázquez JM, Martínez E, Pastor LM, Roca J, Matás C, Calvo (1996).** A.Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochem.* 98: 93-100.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002).** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57: 149-79.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS (1995a).** Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121: 1129-1137.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL (1995b).** Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121: 1139.
- Visconti PE, Kopf GS (1998).** Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59: 1-6.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS (1998).** The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl.* 19: 242-8.
- Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG (1999).** Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod.* 61: 76-84.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB (2002).** Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod Immunol.* 53: 133-150.

Voglmayr J, R. Sawyer, Dacheux J (1985). Glycoproteins: a variable factor insurface transformations of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biol Reprod.* 33: 165-176.

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

Wang WH, Day BN, Wu GM (2003). How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech.* 61: 335-41.

Watson PF, Green CE (2000). Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common? En: *Boar Semen Preservation IV.* Johnson LA, Guthrie HD (eds.). Allen Press, Lawrence. pp. 53-60.

Way AL, Henault MA, Killian GJ (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa, *Theriogenology* 43: 1301-1316.

White DR, Aitken RJ (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22: 163-177.

Williamson P, Mattocks K, Schlegel RA (1983). Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochim Biophys Acta.* 732: 387-93.

Wolf DE, Hagopian S, Ishijima S (1986). Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J Cell Biol.* 102: 1372-1377.

Wolf DE, Lipscomb AC, Maynard VM (1988). Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry.* 27: 860-5.

Xu X, Seth PC, Harbison DS, Cheung AP, Foxcroft GR (1996). Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology.* 46: 1325-1337.

Yanagimachi R (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 18: 275-86.

Yanagimachi R (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil.* 23: 193-6.

Yanagimachi R (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro.* Mastroianni L, Biggers JD (eds.) Plenum Press (New York, USA).

Yanagimachi R (1982). Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 5: 323-344.

Yanagimachi R (1988). Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E, Neill JD (eds.). Raven Press (New York, USA). pp. 135-185.

- Yanagimachi R (1994).** Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill JD (eds.) Raven Press (New York, USA). pp. 189-317.
- Yap AS, Mullin JM, Stevenson BR (1998).** Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J Membr Biol.* 163: 159-67.
- Yeagle PE (1985).** Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* 822: 267-87.
- Yeagle PL (1991).** Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 73: 1303-10.
- Yeung CH, Oberlander G, Cooper TG (1992).** Characterization of the motility of maturing rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. *J Reprod Fertil.* 96: 427-441.
- Yeung CH, Cooper TG, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E (1993).** Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod.* 49: 274-80.
- Zarintash RJ, Cross NL (1996).** Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod.* 55: 19-24.
- Zhang H, Zheng RL (1996).** Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Rad Res.* 24: 261-268.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM (1996).** pH regulation in mouse sperm. Identification of Na, Cl⁻ and HCO⁻ dependent and arylaminobenzoatedependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. *Dev Biol.* 173: 510-520.
- Zhou R, Shi B, Chou KC, Oswald MD, Haug (1990).** A. Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. *Biochem Biophys Res Commun.* 172: 47-53.
- Zhu J, Xu X, Cosgrove JR, Foxeroff GR (2000).** Effects of semen plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. *Theriogenology.* 54: 1443-1452.
- Zini A, De Lamirande E, Gagnon C (1995)** Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl.* 16: 424-431.