



Facultad de Veterinaria. Patología Animal

**ANALISIS MEDIANTE CITOMETRIA DE
FLUJO DE LA RESPUESTA DE LOS
ESPERMATOZOIDES DE VERRACO A
DIFERENTES MEDIOS DE INCUBACION**

Matas Parra, Carmen

Servicio de Publicaciones

Universidad de Murcia

1997

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Emilio Martínez García y Juan María Vázquez Rojas, por su inestimable ayuda y entusiasmo, ya que sin ellos este trabajo no se hubiera realizado

Al profesor Jorge Roca Aleu, porque siempre tuvo las palabras mas adecuadas para dar ánimo en todo momento. Sus aportaciones han sido de gran valor.

A Inmaculada Campos Ramírez, Silvia Martínez Miró, Xiomara Lucas Arjona, Olga María Blanco Palau, Joaquín Gadea Mateos y a Ramón Montaña, porque durante la realización de este trabajo me prestaron su colaboración, ayuda y su amistad.

A D^a Antonia Bernabéu Escáplez y D. José Muñoz Ramos miembros del Servicio de Cultivos Celulares del SACE de la Universidad de Murcia, por sus inestimables consejos y porque sin ellos hubiese sido imposible realizar los análisis en el citómetro de flujo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de mi Beca de Formación de Personal Investigador.

A D. Alfonso Montesinos Rodríguez por haber depositado su confianza en mi para realizar una colaboración de investigación entre la U.D. de Reproducción y Obstetricia y Dalland Hybrid España S.A..

A Dalland Hybrid España S.A. por darme la oportunidad de formarme en tareas investigadoras y permitirme la realización de este trabajo.

A la Dirección de la Explotación Porcina Agropor y en especial a su Director Técnico Veterinario D. Francisco Grao López, por su inestimable cooperación y ayuda.

A Industrias Fuertes S.L. por proporcionarnos el material biológico utilizado en este trabajo.

Por último agradecer a los alumnos internos de la U.D. de Reproducción y Obstetricia por el entusiasmo demostrado durante la realización del trabajo.

*A mi marido,
a mi hija.*

*A mis padres,
y a mis
hermanas.*

.- RESUMEN

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) Estudiar la aplicación de la citometría de flujo en espermatozoides de verraco teñidos con una técnica dual con yoduro de propidio e isotiocianato de fluoresceína; 2) Evaluar mediante esta técnica los cambios que experimentan los espermatozoides, lavados en percoll y los no lavados, en un sistema de incubación in vitro determinando, al tiempo, el efecto que la progesterona y los ovocitos adicionados al medio de incubación pueden tener sobre las modificaciones espermáticas y 3) verificar la relación existente entre los cambios que experimentan los espermatozoides lavados a través de percoll y los espermatozoides sin lavar y las tasas de penetración en ovocitos homólogos madurados in vitro.

En la primera experiencia se compararon los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia utilizando poblaciones espermáticas con proporciones conocidas de espermatozoides vivos y muertos (100/0; 75/25; 50/50; 25/75 y 0/100) y teñidos con yoduro de propidio. La experiencia se realizó por cuadruplicado evaluándose 2000 espermatozoides por muestra mediante citometría de flujo y 300 espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia. En este experimento no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos procedimientos. Sin embargo, la rapidez en el análisis fue mayor mediante citometría de flujo. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides observados y esperados cuando se analizó la exactitud del método por lo que, bajo nuestras condiciones experimentales, la citometría de flujo se mostró como un método rápido y objetivo en la medición de poblaciones de espermatozoides vivos y muertos cuando estas se tiñen con yoduro de propidio.

En segundo lugar se compararon los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia al evaluar verdaderas reacciones acrosómicas mediante una técnica dual con fluorocromos. Para ello se tiñeron los espermatozoides con yoduro de propidio para, posteriormente, incubarlos con la lectina PNA unida a isotiocianato de fluoresceína. La experiencia se realizó por cuadruplicado evaluándose 2000 espermatozoides por muestra mediante citometría de flujo y 300 espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia. No se

observaron diferencias significativas entre ambos métodos aunque la lectura mediante citometría de flujo fue muy rápida con lo posibilidad, por consiguiente, de poder realizar un muestreo seriado de un modo mas efectivo que en el caso del análisis mediante microscopía de fluorescencia.

Tras la evaluación del método a utilizar, se estudió el potencial efecto tóxico que tenían las lectinas que fueron utilizadas en el experimento posterior (PNA, SJA y ECA) en muestras de espermatozoides incubados durante diferentes periodos de tiempo. El tiempo de contacto ensayado en el experimento fue de 10 minutos, no observando ninguna diferencia respecto a los controles realizados únicamente con yoduro de propidio en lo que respecta a la viabilidad celular.

Tras la evaluación de los componentes experimentales, se analizó mediante citometría de flujo los cambios que experimentaban los espermatozoides de verraco lavados y no lavados incubados en M199 suplementado de diferente modo. Para ello, se dividió un pool heterospérmico en dos alicuotas, una de las cuales fue lavada a través de un doble gradiente de percoll mientras que la otra permaneció en su estado original. Se prepararon tres medios de incubación. El primero fue el M199 suplementado como tradicionalmente se hace para fecundación in vitro; el segundo fue el mismo medio mas 3µg/ml de progesterona y el tercero fue similar al primero mas 15 ovocitos. Los espermatozoides fueron coincubados en 2 ml de estos medios con una concentración final de 500.000 células/ml. A los tiempos de 1, 5, 15, 45, 90, 180 y 240 minutos fueron extraídos los espermatozoides y teñidos con yoduro de propidio. Posteriormente se dividió la muestra en cuatro alicuotas de 0'5 ml, procediéndose a su incubación durante 1 minuto con PNA-FITC, ECA-FITC y SJA-FITC mas un control que quedó sin unir, como control de vitalidad. Finalmente, para comprobar que el sistema de incubación era efectivo, tanto los espermatozoides lavados con percoll como los no lavados fueron coincubados durante 16-18 horas en M199 con ovocitos madurados in vitro durante 46-48 horas. La experiencia se realizó por cuadruplicado analizándose 2000 espermatozoides de cada una de las muestras y tiempos empleados. De los resultados obtenidos se desprende que, en primer lugar, aunque existe una mortalidad espermática muy elevada en los primeros 30 minutos, la progesterona tiene un efecto protector sobre la vitalidad de los espermatozoides. Además se obtuvieron los porcentajes de reacción acrosómica verdadera mas altos entre los 45 y los 90 minutos de incubación con las tres lectinas utilizadas. Los espermatozoides incubados en el medio que contenía a los ovocitos

presentaron unos valores comprendidos entre los otros dos medios. Los resultados obtenidos con los espermatozoides lavados en percoll y los no lavados no difirieron ni en el porcentaje de reacciones acrosómicas ni en las tasas de penetración. Solamente se observó, utilizando ECA, un cambio en la reactividad a esta lectina en los espermatozoides tras su lavado en percoll, transformándose en negativos cuando se incubaron en cualquiera de los tres medios utilizados.

- SUMMARY

The objective of this work is: 1) To study the application of flow cytometry to boar spermatozoa stained with propidium iodide and FICT. 2) To evaluate with this technique the changes that sperm washed in percoll and unwashed undergo in an in vitro incubation system, over time, we studied the effects progesterone and oocytes in an incubation medium have on sperm changes. 3) To assess relationships between the changes of spermatozoa washed in percoll and unwashed and the penetration rate in homologous oocytes matured in vitro.

In the first experiment the data obtained were compared with the results from the flow cytometry and fluorescent microscopy by using sperm populations known to be of live and dead sperm (100/0; 75/25; 50/50; 25/75 Y 0/100) stained with propidium iodide. Four replicates were made and 2000 spermatozoa per sample were evaluated by flow cytometry and 300 spermatozoa per sample by fluorescent microscopy. No significant differences were found, neither differences between the percentage of sperm observed and predicted were seen. Flow cytometry, under our experimental conditions, provides a rapid and objective method to evaluate live and dead sperm populations when stained with propidium iodide.

In the second experiment, the results with both flow cytometry and fluorescent microscopy were compared to evaluate the true acrosome reaction by using dual fluorescent staining. Sperm were stained with propidium iodide and incubated in FITC-PNA lectin. Four replicates were made, and 2000 spermatozoa per sample were evaluated by flow cytometry and 300 spermatozoa per sample by fluorescent microscopy. No significant differences were found between the two methods, and so flow cytometry offers a means for

rapid and systematic quantification of the spermatozoal populations differentially stained with FITC-lectin and propidium iodide combination.

The potential problem of lectins (PNA, SJA y ECA) toxicity on sperm incubated at different intervals was also studied. The sperm were incubated in FITC-lectin for 10 minutes and no differences in vitality of the sperm were observed in comparison with the experiment carried out with only propidium iodide.

The changes in washed and unwashed sperm incubated in M199 with different supplements were also analyzed by flow cytometry. The sperm was divided in two aliquots, and one of them was washed in percoll. Three incubation mediums were prepared: the first was M199 supplemented for in vitro fertilization, the second was the same medium with 3µg/ml progesterone and the third was as the first one but with 15 oocytes. The sperm was coincubated in 2 ml of this medium to make a final concentration of 500.000 cells/ml. The sperm was coincubated at intervals of 1, 5, 15, 45, 90, 180 and 240 minutes. After that, the sperm were stained with propidium iodide. Lately, the sample was divided in four aliquots of 0.5ml, three of them were incubated for 1 minute in PNA-FITC, SJA-FITC and ECA-FITC, and the other one was used as a control.

Finally, to check that the incubation systems were effective, washed and unwashed sperm were coincubated for 16-18 hours in M199 with oocytes matured in vitro. Four replicates were carried out, and 2000 spermatozoa were studied of all the above permeatations. Although the results showed a high sperm mortality in the first 30 minutes, the progesterone had a protective effect on sperm vitality. The highest percentages of true acrosome reactions were obtained between 45 and 90 minutes of incubation with the three lectins used.

The sperm incubated in M199 with oocytes showed a mean value of acrosome reaction between the values obtained with the other two mediums. The results obtained with washed in percoll and unwashed sperm were as similar in acrosome reaction as in penetration rate. When ECA was used, a change in the reactivity of this lectin in washed sperm was observed; the spermatozoa became negative in whichever medium were incubated.

INDICE	<u>Pag.</u>
1.- INTRODUCCION	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1.- Concepto de capacitación espermática y reacción acrosómica	4
2.2.- Capacitación espermática y reacción acrosómica in vivo	5
2.3.- Capacitación in vitro de los espermatozoides	6
2.4.- Cambios que experimentan los espermatozoides durante la capacitación espermática y la reacción acrosómica	7
2.4.1.- Capacitación	7
2.4.1.1.- Pérdida de factores decapacitantes	8
2.4.1.2.- Modificación de la composición lipídica de la membrana	8
2.4.1.3.- Modificación de las proteínas de membrana	8
2.4.1.4.- Incremento del flujo de calcio	9
2.4.1.5.- Aumento de la síntesis de AMP cíclico	9
2.4.1.6.- Fosforilación y defosforilación de proteínas	9
2.4.2.- Reacción acrosómica	10
2.5.- Importancia de los agonistas naturales sobre los procesos de capacitación y reacción acrosómica	11
2.6.- Métodos de evaluación de la capacitación espermática	13
2.7.- La citometría de flujo como sistema de análisis espermático	16
2.7.1.- Instrumentación	16
2.7.2.- Compuestos fluorescentes más utilizados	18
2.7.3.- Preparación de las muestras	19
2.7.4.- Aplicaciones de la citometría de flujo en espermatozoides	20
2.7.4.1.- Evaluación de la viabilidad espermática	20
2.7.4.2.- Evaluación de la capacitación y la reacción acrosómica	21
2.7.4.3.- Otras aplicaciones	23

3.- MATERIAL Y METODOS	24
3.1.- Animales	24
3.2.- Reactivos químicos y suplementos	24
3.3.- Medios de cultivo	25
3.3.1.- Transporte de ovarios y lavado de ovocitos	25
3.3.2.- Maduración in vitro	25
3.3.3.- Dilución del semen y resuspensiones espermáticas	26
3.3.4.- Incubación de los espermatozoides	26
3.3.4.1.- Incubación en medio de fecundación (MF)	26
3.3.4.2.- Incubación en MF con ovocitos (MF-O)	26
3.3.4.3.- Incubación en MF con progesterona (MF-P)	27
3.4.- Preparación de suspensiones y reactivos	27
3.4.1.- Preparación de las soluciones de Percoll	27
3.4.2.- Preparación del yoduro de propidio (YP)	28
3.4.3.- Preparación de lectinas	28
3.5.- Experimento 1: Validación de la citometría de flujo para la evaluación de espermatozoides de verraco	28
3.5.1.- Características del citómetro de flujo	28
3.5.2.- Validación de la técnica de YP, utilizando citometría de flujo, mediante el empleo de muestras con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos	29
3.5.3.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la evaluación de espermatozoides vivos/muertos utilizando la técnica del YP	29
3.5.4.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la identificación de subpoblaciones espermáticas	30
3.5.5.- Toxicidad de las lectinas sobre los espermatozoides incubados in vitro	30
3.6.- Experimento 2: Estudio citométrico de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco, sometidos a distintos tratamientos de capacitación, bajo diferentes condiciones de incubación	31
3.6.1.- Obtención y preparación de los gametos	31

3.6.1.1.- <i>Obtención y transporte de ovarios</i>	31
3.6.1.2.- <i>Obtención de ovocitos inmaduros</i>	31
3.6.1.3.- <i>Maduración in vitro de los ovocitos</i>	31
3.6.1.4.- <i>Obtención y contrastación de las muestras espermáticas</i>	33
3.6.1.5.- <i>Preparación e incubación de los espermatozoides</i>	33
3.6.2.- <i>Evaluación de las poblaciones espermáticas por citometría de flujo</i>	34
3.6.3.- <i>Evaluación de la penetrabilidad espermática por FIV</i>	34
3.7.- <i>Diseño experimental</i>	42
3.8.- <i>Análisis estadístico</i>	42
4.- RESULTADOS	44
4.1.- Experimento 1: Estudio de la eficacia de la citometria de flujo en la evaluación de espermatozoides de verraco	44
4.1.1.- <i>Selección de la muestra espermática</i>	44
4.1.2.- <i>Validación de la técnica de YP utilizando la citometría de flujo con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos</i>	46
4.1.3.- <i>Comparación de la citometria de flujo y la microscopía de fluorescencia en la evaluación de espermatoides vivos/muertos utilizando la técnica de YP</i>	48
4.1.4. <i>Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la identificación de subpoblaciones espermáticas</i>	50
4.1.5.- <i>Estudio de la toxicidad de la PNA, ECA y SJA sobre los espermatozoides incubados in vitro</i>	55
4.2.- Experimento 2: Estudio citométrico de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco, sometidos a distintos tratamineto de capacitación, bajo diferentes condiciones de incubación	56
4.2.1.- <i>Estudio de la viabilidad espermática</i>	56
4.2.2.- <i>Estudio de las glicoproteinas espermáticas mediante la utilización de lectinas</i>	58
4.2.2.1.- <i>PNA</i>	58
4.2.2.2.- <i>ECA</i>	62
4.2.2.3.- <i>SJA</i>	65

4.3.- Efecto del tratamiento espermático sobre los resultados de FIV	65
5.- DISCUSION	69
5.1.- Estudio de la eficacia de la citometría de flujo en la evaluación de espermatozoides de verraco	69
5.2.- Detección mediante citometría de flujo de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco lavados y no lavados en diferentes medios de incubación	75
6.- CONCLUSIONES	85
7.- ABREVIATURAS	86
8.- BIBLIOGRAFIA	88

1.- INTRODUCCION

La incorporación de nuevas técnicas al campo de la espermatología está provocando una nueva dimensión al conocimiento, manipulación y utilización del gameto masculino. Sin embargo, siguen sin conocerse en su totalidad los mecanismos intrínsecos del funcionamiento del espermatozoide. El análisis de estas células mediante las técnicas de las que dispone actualmente la andrología sigue sin discriminar espermatozoides con diferente capacidad fecundante. No cabe duda de que la biología molecular, nuevas técnicas de análisis y la incorporación de nuevos equipos van a ayudar a profundizar en estos aspectos.

Entre estas nuevas técnicas, la utilización de la citometría de flujo adaptada al estudio del gameto masculino está adquiriendo gran interés en los últimos años. Desde su aparición, la citometría de flujo ha experimentado un importante desarrollo debido, en gran medida, a que por su carácter multidisciplinario se ha beneficiado de los avances ocurridos en campos tan diversos como la inmunología, la biología molecular, la química de los fluorocromos, la informática, etc.

La aplicación de la citometría de flujo al estudio de los espermatozoides se fundamenta en que, en relación con otras metodologías, aporta una gran sensibilidad, objetividad, rapidez y versatilidad analítica al estudio de la célula.

Desde hace años, se han realizado clasificaciones de los espermatozoides en función de la vitalidad, del estado del acrosoma, etc. Sin embargo, existe una tendencia actual a utilizar métodos de evaluación que analicen, de un modo individual, el estado de las células en un momento concreto en vez de analizar medias de la población. Recientemente, el desarrollo de marcadores fluorescentes indicativos de una determinada función espermática y la capacidad de utilizar cuantificadores de células como los citómetros de flujo han facilitado este tipo de estudio (Harrison et al., 1993). Estos sistemas podrían identificar subpoblaciones concretas y de este modo poder analizar grupos homogéneos.

Está establecido que los espermatozoides maduros eyaculados deben experimentar una serie de modificaciones denominadas colectivamente como capacitación (Yanagimachi, 1988). Sin embargo, éste es un proceso bastante complicado de estudiar debido a la heterogeneidad de los espermatozoides con respecto a los diferentes cambios que ocurren durante la capacitación y reacción

acrosómica. Además, los estudios de capacitación conllevan periodos de incubación durante los cuales, como es evidente, se producen muertes celulares, por lo que al problema anterior hay que añadir la necesidad de diferenciar entre espermatozoides vivos y espermatozoides muertos. Por tanto, se hace imprescindible el combinar dos marcadores que identifiquen, en primer lugar, la viabilidad espermática y en segundo lugar, la propiedad que se sospecha relacionada con un proceso de capacitación y/o reacción acrosómica. Aunque se han desarrollado varias técnicas que emplean colorantes (Didion et al., 1990; Vázquez et al., 1992) y lectinas (Berger, 1990; Ahluwalia et al., 1990; Vázquez et al., 1996), son metodologías lentas en las cuales se pueden introducir artefactos que alteran los resultados obtenidos. Además hay que tener en cuenta la necesidad de que sean métodos inmediatos debido a la heterogeneidad de la respuesta espermática y a la rapidez con la que a veces se produce la capacitación y la reacción acrosómica en los espermatozoides. Aunque la evaluación de estas poblaciones espermáticas puede realizarse mediante microscopía, uno de los métodos analíticos que pueden mejorar la metodología de estudio es, sin duda alguna, la citometría de flujo.

Desde hace pocos años, la citometría de flujo está siendo usada para estudiar junto a la viabilidad espermática otras características celulares, tanto estructurales como funcionales, en un periodo corto de tiempo con un número elevado de células. Uno de los aspectos relacionados con la capacitación es la modificación de las glicoproteínas de superficie. Por tanto la utilización de lectinas o de anticuerpos puede detectar estas modificaciones sobre la población de espermatozoides vivos. La principal ventaja que presenta la utilización del citómetro de flujo es la posibilidad de analizar células espermáticas vivas en suspensión, ya que el periodo de tiempo del análisis es muy corto y las lectinas se fijan, de forma óptima a las células, en unos 2 minutos. Sin embargo, uno de los problemas que podrían aparecer en el estudio de las modificaciones con las lectinas en suspensiones de espermatozoides vivos, es el derivado de la toxicidad de éstas sobre el gameto masculino.

La reacción acrosómica puede ocurrir espontáneamente durante la capacitación espermática. Sin embargo, solamente la exocitosis inducida por factores del ovocito parece ser fisiológicamente relevante (Yanagimachi, 1988). Hasta hace poco, una glicoproteína de la zona pelúcida, denominada ZP3, era definida como el único factor del ovocito capaz de inducir la exocitosis del acrosoma en espermatozoides de mamíferos (Wassarman, 1987). Esta situación cambió cuando el componente activo

de una fracción del fluido folicular humano, que incrementaba la motilidad y la pérdida del acrosoma fue identificado como un complejo de proteínas y hormonas esteroideas (Osman et al., 1989). Entre los diferentes componentes esteroideos presentes en el fluido folicular, es la progesterona la hormona que parece tener la acción más importante sobre los espermatozoides. Además, la progesterona también se encuentra presente en la matriz de las células del cumulus que rodean al ovocito maduro, bien porque proceda del folículo bien porque se genere en estas células (Meizel et al. 1990). Sin embargo, aun no se ha aclarado totalmente el efecto de la progesterona sobre el proceso de capacitación y reacción acrosómica, ya que se han realizado experimentos con resultados diferentes en cuanto a la inducción de la reacción acrosómica (Melendrez et al., 1994; Yogev et al., 1995).

Otro de los aspectos importantes que recoge la bibliografía en el proceso de capacitación es el sistema mediante el cual son preparados los espermatozoides. Existen autores que defienden que el lavado espermático a través de percoll es el mejor sistema de lavado (Berger y Horton, 1988; Grant et al., 1994), mientras que otros, por el contrario, no encuentran diferencias en cuanto a las tasas de penetración in vitro (Siegel y Haynie, 1994; Seidel et al., 1995). Se hace necesario, por tanto, un análisis de las modificaciones que experimentan los espermatozoides de verraco lavados en percoll durante la incubación in vitro con el fin de intentar detectar algún cambio que justifique la aparición de diferencias entre ambos métodos.

Por todo lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo son 1) estudiar la aplicación de la citometría de flujo en espermatozoides de verraco teñidos con una técnica dual con yoduro de propidio e isotiocianato de fluoresceína; 2) evaluar mediante esta técnica los cambios que experimentan los espermatozoides lavados en percoll y los no lavados en un sistema de incubación in vitro, determinando, al mismo tiempo, el efecto que la progesterona y los ovocitos adicionados al medio de incubación pueden tener sobre las modificaciones espermáticas y 3) verificar la relación existente entre los cambios que experimentan los espermatozoides lavados a través de percoll y los espermatozoides sin lavar y las tasas de penetración en ovocitos homólogos madurados in vitro.

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1.- Concepto de capacitación espermática y reacción acrosómica

Los espermatozoides de mamíferos deben experimentar un proceso de exocitosis, denominado reacción acrosómica, antes de que sean capaces de fecundar a los ovocitos. El desarrollo de la capacidad de los espermatozoides eyaculados para experimentar la reacción acrosómica necesita una serie de cambios previos, denominados capacitación, que ocurren in vivo durante el paso de los espermatozoides por el aparato genital femenino o in vitro durante la incubación de estas células en medios de cultivo apropiados (Yanagimachi, 1988). El proceso de capacitación espermática posibilita a la célula unirse a la zona pelúcida, experimentar la reacción acrosómica en respuesta a los agonistas naturales y expresar la hipermotilidad, un movimiento especial que permite a los espermatozoides desplazarse en el fluido viscoso del oviducto y penetrar a través de la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988). La reacción acrosómica se define como el proceso que experimentan los espermatozoides capacitados como consecuencia de la acción de determinados inductores adecuados. Este proceso fue observado por primera vez por Austin y Bishop (1958). Durante la reacción acrosómica se produce la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en varios sitios, formando una serie de vesículas que se desprenden de la cabeza del espermatozoide, liberándose el contenido del acrosoma (Langlais y Roberts, 1985) y permitiendo la entrada en el interior de los ovocitos. Los estudios in vitro han demostrado que la reacción acrosómica puede iniciarse en espermatozoides capacitados bien de forma espontánea bien bajo la acción de inductores específicos (Yanagimachi, 1988). Por tanto, la reacción acrosómica espontánea tiene poca importancia ya que para que ésta reacción sea efectiva debe ocurrir en, o cerca de, la zona pelúcida para que el espermatozoide sea capaz de penetrar dentro del ovocito. Una reacción acrosómica efectiva dependerá tanto de la presencia de inductores activos asociados a la superficie del ovocito como de la capacidad de los espermatozoides a responder a estos estímulos.

Por último, es muy importante la diferenciación entre la reacción acrosómica fisiológica y la reacción acrosómica degenerativa. Bedford (1970)

propone el termino de verdadera reacción acrosómica a la experimentada por aquellos espermatozoides vivos tras la capacitación y el de falsa reacción acrosómica a la que se produce como consecuencia de la autodigestión enzimática que aparece por activación del contenido acrosomal en espermatozoides muertos o moribundos.

2.2.- Capacitación espermática y reacción acrosómica in vivo

La porción caudal del istmo, la cual actúa como reservorio espermático en muchas especies, parece controlar, en parte, el fenómeno de la capacitación espermática. Hunter (1987) propuso un modelo en el cual los folículos de Graff podrían enviar señales para programar, próximo a la ovulación, al epitelio del oviducto. La regulación endocrina podría también afectar la temperatura en las diferentes partes del oviducto.

El tiempo de capacitación es dependiente del intervalo cubrición fecundación y éste es específico de especie. Realizando inseminaciones en la ampolla del oviducto, Polge (1978) observó como el tiempo requerido para la capacitación antes de la ovulación era de 5-6 horas en espermatozoides de verraco. Sin embargo cuando la deposición se realiza después de la ovulación, la penetración se produce en las 2 horas siguientes (Hunter y Dziuk, 1968), por lo que el proceso de la capacitación espermática tiene que producirse durante este intervalo de tiempo.

Se han descrito agonistas naturales capaces de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados de mamíferos, entre los que se encuentran la zona pelúcida de ovocitos homólogos, la progesterona, catecolaminas, el factor de desarrollo epidérmico etc. Sin embargo, con la excepción de la zona pelúcida y de la progesterona no se han detectado concentraciones activas de los restantes agonistas naturales en el sitio de fecundación. En base a estos conocimientos y a los trabajos descritos por Jones et al. (1988) en los que detecta que la unión del espermatozoide de cerdo al ovocito homólogo se realiza a través de la membrana plasmática, en la actualidad es aceptado por todos los autores que la reacción acrosómica se produce o bien

durante el paso del espermatozoide por las células del cumulus ooforus o una vez unido a la zona pelúcida.

2.3.- Capacitación in vitro de los espermatozoides

De la bibliografía sobre los sistemas de capacitación de los espermatozoides de mamíferos se desprende que los espermatozoides de cada una de las especies necesitan unas condiciones especiales de incubación, para que se capaciten en situación extracorpórea. En el caso de los espermatozoides de verraco, se han descrito varios sistemas de capacitación in vitro (revisado por Niwa, 1993). En estos sistemas, existen dos componentes comunes que son los lavados y la incubación de los espermatozoides durante un determinado tiempo antes de ser coincubados con los ovocitos.

Los lavados de los espermatozoides se utilizan para eliminar todas las partículas contaminantes que puedan afectar al cocultivo posterior y para eliminar el plasma seminal que puede disminuir el potencial fertilizador. Asimismo, se ha descrito que se pueden eliminar las glicoproteínas que cubren la superficie del espermatozoide y que imposibilitan el inicio del proceso de capacitación (Cheng, 1985). El método más utilizado ha sido el triple lavado por centrifugación de los espermatozoides con una solución salina adicionada con albúmina sérica bovina. También se ha utilizado los lavados a través de columnas de percoll dispuestas desde 2 a 5 gradientes del tal forma que este procedimiento permite la eliminación del plasma seminal y la purificación de la muestra espermática en cuanto a que es capaz de seleccionar espermatozoides móviles morfológicamente normales (Mattioli et al., 1988).

Asimismo, se ha aceptado como norma que la preincubación durante un tiempo determinado de los espermatozoides antes del cocultivo, es una variable importante en el procedimiento in vitro. En 1985, Cheng publicó el primer éxito de fecundación in vitro en porcino utilizando espermatozoides eyaculados que habían sido lavados tres veces y preincubados durante 4 ó 5 horas a 37°C o almacenados a 20°C durante 16 horas, lavados y entonces preincubados 40 minutos. Estos métodos han sido descritos por numerosos laboratorios desde entonces obteniéndose buenas tasas de penetración en ovocitos madurados in

vivo (Coy et al., 1993), madurados in vitro (Mattioli et al., 1989), inmaduros (Martínez et al., 1993), descendencia viva (Yoshida, 1987 y Nagai et al., 1988) y buen desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto (Mattioli et al., 1989; Yoshida et al., 1990). Sin embargo, también se han obtenido altas tasas de penetración sin preincubación utilizando espermatozoides diluidos en diluyente comercial y lavados en Percoll (Mattioli et al., 1989), o espermatozoides congelados (Wang et al., 1991) o eyaculados (Yoshida et al., 1992) lavados en solución salina. Asimismo, se ha observado recientemente que cuando se realiza la fecundación in vitro tanto con ovocitos inmaduros como maduros pueden utilizarse espermatozoides eyaculados sin lavar y sin preincubar si se emplean elevadas concentraciones de Ca^{2+} en el medio (Martínez et al., 1996).

2.4.- Cambios que experimentan los espermatozoides durante la capacitación espermática y la reacción acrosómica

2.4.1.- Capacitación

Aunque los mecanismos que conducen a la capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides permanecen sin identificar en su totalidad, en la actualidad existen dos tendencias para describir el proceso de capacitación espermática. Determinados autores consideran la capacitación espermática como un proceso lento, heterogéneo y con una duración específica de especie (Yanagimachi, 1988; Fraser, 1993), mientras que otros han descrito que este proceso es homogéneo y sincrónico con la liberación de los ovocitos (Hunter, 1988). Independientemente del tiempo de capacitación y de la sincronía del proceso, se sabe que durante la capacitación se producen modificaciones lipoproteicas que permiten la exteriorización de receptores, de canales iónicos que intervienen en la activación de los mecanismos de transducción (flujo de calcio, síntesis de AMPc, fosforilación-desfosforilación de proteínas, etc.) y la modificación del metabolismo energético que conducen a la desestabilización de la membrana plasmática a nivel de la región acrosómica y a la hiperactivación del movimiento flagelar. Estos cambios permiten al espermatozoide responder a inductores específicos y experimentar la reacción acrosómica.

2.4.1.1.- Pérdida de los factores de capacitantes

La cara externa de la membrana plasmática de los espermatozoides es rica en hidratos de carbono cargados eléctricamente, denominándose glicocaliz. En esta cara externa se encuentran los carbohidratos adsorbidos o polisacáridos unidos a la membrana por uniones superficiales no covalentes. Los factores denominados decapacitantes (Sidhu y Guraya, 1988) son susceptibles de enmascarar los sitios de unión de receptores iónicos o de activación celular. Estos factores se originan en los líquidos testiculares, epididimarios o seminales y protegen a los espermatozoides provocando la estabilización del acrosoma o inhibiendo la unión a la zona pelúcida. La acrostatina, aislada desde el líquido epididimario y seminal, inhibe la acrosina que participa en la unión y penetración de la zona pelúcida. La caltrina es un inhibidor del transporte del calcio y ha sido aislada del plasma seminal (Langlais et al., 1988). Esta variedad de factores puede ser liberada fácilmente por agentes físicos o químicos (lavados por centrifugación, aumento de la fuerza iónica, albúmina, proteasas, hidrolasas, glicosaminoglicanos, etc.) (Oliphant et al., 1985).

2.4.1.2.- Modificación de la composición lipídica de la membrana

La composición lipídica de la membrana experimenta una modificación por intercambio con los líquidos biológicos, produciéndose cambios sobre el colesterol y los fosfolípidos que aumentan la fragilidad y la fluidez de la membrana disminuyendo la cantidad de colesterol y aumentando la de fosfolípidos fusigénicos de modo que se desestabilizan paulatinamente favoreciendo la aparición de la reacción acrosómica. Este aumento en la fluidez se acompaña de movimientos laterales de componentes que conducen a la modificación de la conformación, la afinidad y la función de estas partículas (receptores, activadores y canales iónicos) (Parks y Ehrenwald, 1990).

2.4.1.3.- Modificación de las proteínas de membrana

Las proteínas intrínsecas y no adsorbidas pueden ser modificadas por su extremo glicosilado, enmascarando o exteriorizándose, o desplazarse lateralmente como se ha observado con anticuerpos monoclonales o lectinas las

cuales denotan que la reactividad depende del grado de capacitación (Villaroya y Scholler, 1987; Harrison et al., 1993).

2.4.1.4.- Incremento del flujo de calcio

Es conocido desde hace años que el calcio es indispensable para que pueda ocurrir la reacción acrosómica. Fraser (1989) ha mostrado que el calcio extracelular es igualmente indispensable para la capacitación aunque a concentraciones menores. Se sabe que el calcio intracitoplasmático se eleva progresiva y lentamente durante la capacitación y que estas variaciones son sensibles a los antagonistas de los canales de calcio (Fraser, 1989). El potasio está también posiblemente implicado ya que la concentración es cinco veces superior que en el líquido tubárico.

2.4.1.5.- Aumento de la síntesis de AMP cíclico

Durante el proceso de capacitación se produce un aumento en la síntesis del AMP cíclico estimulada por la actividad adenilciclase y la inhibición de la actividad fosfodiesterásica (White y Aitken, 1989). Esta actividad enzimática conduce a una elevación del calcio intracitoplasmático (Coronel y Lardy, 1987). Es posible que el AMP cíclico participe en la transducción de señal regulando las proteinquinasas.

2.4.1.6.- Fosforilación y desfosforilación de proteínas

Una actividad proteinquinasa ha sido puesta de manifiesto en la participación de movimiento en el flagelo (Coronel y Lardy, 1987). Asimismo se ha observado, en el caso del verraco, que el tránsito del espermatozoide por el epidídimo se acompaña de la fosforilación de la tirosina de la mayoría de las proteínas de membrana. En el caso del ratón, Duncan y Fraser (1981) han demostrado una disminución en la incorporación del P^{32} a una proteína que migra a 51kDa después de la capacitación en presencia de 1mM de calcio, en tanto que esta modificación no se produce sin calcio.

2.4.2.- Reacción acrosómica

La reacción acrosómica es el resultado de la fusión progresiva de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide. El contenido del acrosoma (principalmente en cuanto a los enzimas hidrolíticos) va a ser liberado al exterior quedando la membrana acrosomal interna como nueva membrana de superficie. La vesículas formadas por la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa se libera a medida que el espermatozoide penetra a través de la zona pelúcida.

A partir del modelo de reacción acrosómica propuesto por Langlais y Roberts (1985), han sido numerosos los equipos de investigación que han trabajado en este aspecto. Sin embargo, no se conoce en la actualidad la cascada de eventos que ocurre antes de la fusión de las membranas. Existen evidencias que indican que la reacción acrosómica in vivo comienza mediante la estimulación de un agonista natural como es la progesterona y/o la zona pelúcida. Este estímulo provocaría una entrada de Ca^{2+} en el interior del espermatozoide. Se puede inducir artificialmente la reacción acrosómica en los espermatozoides mediante la acción del ionóforo A23187 que provoca una entrada Ca^{2+} intracelular.

Yanagimachi (1988) propone un modelo en el que intervienen ATPasas de membrana cuya función sería la de mantener bajos niveles de Na^+ y Ca^{2+} y altos niveles de K^+ . La entrada de Ca^{2+} provocaría un desactivación de estas ATPasas que iría acompañada de un aumento del Na^+ intracelular. El aumento de Na^+ intracelular se acompañaría de una salida de H^+ con un aumento del pH intraacrosómico. Esta elevación del pH induciría a la activación de enzimas como la acrosina.

Además, se ha observado como el incremento de Ca^{2+} intracelular también conduce a una serie de modificaciones en los lípidos como son la formación de segundos mensajeros que a su vez se incorporan a una cascada de acontecimientos que ocurren durante la reacción acrosómica y la activación de determinadas enzimas como una fosfolipasa A_2 , específica de fosfatidilcolina, que genera lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico, sustancias conocidas por sus

propiedades fusigénicas durante el proceso de reacción acrosómica (Roldan y Fragio, 1993).

2.5.- Importancia de los agonistas naturales sobre los procesos de capacitación y reacción acrosómica

Como se ha mencionado en la introducción, en la actualidad se encuentran identificados la zona pelúcida y la progesterona como agonistas naturales de la reacción acrosómica de espermatozoides de mamíferos. La progesterona se encuentra en concentraciones de 3-7 μM (1-2 $\mu\text{g/ml}$) en el lugar de fecundación aunque la concentración en el interior de la matriz de las células del cumulus podría ser mayor (Osman et al., 1989).

La progesterona induce la reacción acrosómica en espermatozoides de hámster (Meizel et al., 1990), verracos (Melendrez et al., 1994), caballo (Meyers et al., 1995), ratón (Roldan et al. 1995) y humanos (Brucker et al., 1994). Sin embargo, también existen experimentos en los que no se ha obtenido una inducción de la reacción acrosómica (Yogev et al., 1995). Además de la acción sobre la reacción acrosómica, se han observado otros efectos sobre los espermatozoides como el incremento de la motilidad (Uhler et al., 1992) y la preservación de la viabilidad espermática (Parinaud et al., 1992).

Cuando se valora el efecto de la progesterona sobre los espermatozoides es importante la concentración en la que se encuentre presente en el medio. Una concentración de 3 μM de progesterona se ha considerado como óptima cuando se añade a medios de incubación en espermatozoides de verraco (Melendrez et al., 1994) y humanos (Brucker et al., 1994). Yogev et al. (1994) observan en espermatozoides de ratón que la máxima estimulación de la reacción acrosómica se obtiene en espermatozoides preincubados durante 120 minutos y posteriormente tratados con 15 μM de progesterona.

En relación con los mecanismos moleculares de acción de la progesterona, en la mayoría de los sistemas celulares estudiados, esta hormona actúa sobre los receptores nucleares de las células modulando la actividad transcripcional, un mecanismo común a una variedad de hormonas esteroideas. Sin embargo, cuando se estudió por primera vez el efecto de la progesterona sobre los

espermatozoides humanos, se observó que esta hormona inducía la reacción acrosómica por un incremento rápido de iones de calcio, ocurriendo este fenómeno inmediatamente después de la adición de la hormona (Thomas y Meizel, 1989). Esta acción tan rápida y el hecho de que la actividad de transcripción genómica esté inactivada en espermatozoides maduros sugirieron que la progesterona podría activar la reacción acrosómica sobre la superficie de los espermatozoides mediante un mecanismo no genómico, a diferencia del esquema clásico de acción de las hormonas esteroideas (Osman et al., 1989). Además, se ha observado como un conjugado progesterona-proteína, que no puede entrar de forma rápida en el interior de la célula, es igualmente efectivo durante la inducción de la reacción acrosómica de espermatozoides (Meizel y Turner, 1991). Esta hipótesis se reafirmó por Tesarik et al. (1992) al observar receptores de progesterona sobre la cabeza de los espermatozoides, utilizando progesterona unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Tanto el tiempo de incubación como el medio podría influir sobre la respuesta de ciertas subpoblaciones espermáticas a la progesterona. Mendoza y Tesarik (1993) han observado como, aunque exista una población de espermatozoides que se unen rápidamente a los receptores progesterona, existen otros espermatozoides que presentan los receptores de progesterona de forma inactiva. La activación de estos receptores parece ser asincrónica. Además, la centrifugación de los espermatozoides podría causar la ruptura y liberación de las proteasas acrosómicas, las cuales pueden interferir directa o indirectamente sobre los receptores de membrana. Barboni et al. (1995) han observado en espermatozoides de ratón que solamente los espermatozoides capacitados (determinado por clortetraciclina) pueden experimentar la exocitosis en respuesta a la progesterona. En este sentido, Crozet (1994) observó, en espermatozoides humanos, que la inducción de la reacción acrosómica por parte de la progesterona es dependiente del tiempo de capacitación y no ocurre en células no capacitadas. En sus estudios observó que se necesitaban al menos 6 horas de capacitación para que el estímulo inductor de la progesterona fuera efectivo, aunque de modo subóptimo. Encontraron un porcentaje óptimo de reacción a partir de 8 horas de capacitación con una estimulación del 40% de los espermatozoides.

Roldan et al. (1995) observan que cuando los espermatozoides de ratón son expuestos primero a la progesterona y después a la zona pelúcida, la exocitosis aumenta más que si se exponen a los dos agonistas de modo simultáneo. Melendrez et al (1994) han demostrado que bajo las condiciones experimentales que ellos plantean, la adición de la progesterona y extractos de zona pelúcida como iniciadores de la reacción acrosómica actúan con efectos aditivos más que de modo sinérgico, al menos en los espermatozoides de verraco. Estos autores observan que solamente una pequeña subpoblación espermática (15-20%) es capaz de reaccionar cuando se exponen a ZP o progesterona. Aunque en función de estos resultados se pueda pensar que ZP y progesterona se unan a un mismo receptor espermático, Tesarik et al., (1993) demostraron que los receptores son independientes. Por esto podría argumentarse que los espermatozoides presentan receptores de zona y receptores de progesterona, pero hay una conversión asincrónica de receptores de una forma inactiva a una forma activa capaz de reconocer y unirse a los ligandos. Melendrez et al. (1994) asumen que según los datos que se desprenden de su estudio, pueden existir, en un mismo tiempo, cuatro poblaciones diferentes de espermatozoides: espermatozoides solamente con receptores de progesterona o espermatozoides solamente con receptores de zona expuestos o activados; espermatozoides con ninguno de estos receptores expuestos o activados y espermatozoides con ambos tipos de receptores expuestos o activados.

2.6.- Métodos de evaluación de la capacitación espermática

Determinados autores han intentado encontrar evidencias del fenómeno de la capacitación mediante la utilización de marcadores de la membrana plasmática (lectinas, anticuerpos, neoglucoconjugados, sondas de merocianina), clortetraciclina, o bien mediante eventos posteriores que necesitan que se produzca la capacitación previa como son la reacción acrosómica y la propia fecundación.

Entre los marcadores de membrana, los más utilizados han sido las lectinas. Las lectinas son moléculas, principalmente de origen vegetal, que presentan una gran afinidad específica por residuos glicídicos. Kashiwabara et al. (1965) fueron

los primeros autores en introducir las lectinas en el estudio de la superficie espermática. Para visualizar la localización de las lectinas, éstas pueden ser marcadas con FITC (Nicolson et al., 1977), peroxidasa (Gordon et al., 1974), ferritina (Nicolson et al., 1977), homocianina (Kinsey y Koehler, 1976) y en técnicas ultraestructurales con oro coloidal (Sinowatz y Friess, 1981).

La lectinas permiten localizar cambios en la distribución de los azúcares sobre la membrana de los espermatozoides. Schwartz et al. (1979) encontraron modificaciones de los sitios de fijación de las lectinas durante el proceso de capacitación espermática. Recientemente, mediante el marcaje a determinadas lectinas y el posterior análisis por citometría de flujo, se ha establecido un método capaz de analizar a las células, de forma individual, durante un período de tiempo determinado (Harrison et al., 1993). Estas sustancias se han utilizado, principalmente, en espermatozoides de roedores (Ahuja, 1982; Baccetti et al., 1978; Huang et al., 1982), conejo (Ahuja, 1982), toro (Ahluwalia et al., 1990) y cerdo (Töpfer-Petersen et al., 1984; Rusell et al., 1984; Peterson y Rusell, 1985; Berger, 1990; Ahluwalia et al., 1990; Vázquez et al., 1993; Harrison et al., 1993).

Los neoglucoconjugados son carbohidratos específicos capaces de reconocer proteínas receptoras en las membranas espermáticas. Generalmente los neoglucoconjugados más utilizados son los marcados con fluoresceína y biotina. Estos carbohidratos marcados son capaces de detectar la evolución que experimentan las proteínas específicas de la membrana del espermatozoide en un proceso de capacitación espermática. Así, Sinowatz et al., (1988) han determinado la distribución topográfica de las proteínas presentes en la superficie del espermatozoide de toro y Friess et al. (1987) han estudiado los cambios que experimenta una proteína con afinidad a la fucosa durante la reacción acrosómica en el espermatozoide de verraco.

La clortetraciclina es un quelato fluorescente de cationes divalentes que se fija a las proteínas de la membrana y emite, en presencia de Ca^{2+} , una fluorescencia de intensidad variable. Este marcador permite analizar las variaciones del estado de la membrana por lo que ha sido utilizado como marcador de la capacitación por varios autores, incluyendo a los espermatozoides de verraco (Mattioli et al., 1996). De un modo diferente pero con el mismo

objetivo pueden ser utilizadas las sondas de calcio como el fluo-3 o el fura-2 (Harrison et al., 1993).

La merocianina ha sido utilizada (Harrison et al., 1994) como prueba capaz de detectar alteraciones de la estructura lipídica externa de la membrana plasmática de los espermatozoides. Esta prueba fluorescente puede ser analizada en un citómetro de flujo.

Debido a que la capacitación espermática es sucedida por la reacción acrosómica, estudios de reacción acrosómica podrían ser utilizados como técnicas de evaluación de la propia capacitación. Si se considera que la capacitación espermática es un proceso que permite que la célula reaccione ante un agonista natural (progesterona o zona pelúcida), podemos evaluar el éxito de la capacitación analizando el porcentaje que de verdaderas reacciones acrosómicas se produce en una población tras el estímulo por dicho agonista. Existen técnicas de tinción en las cuales las muestras deben ser fijadas para determinar la vitalidad y el estado acrosómico del espermatozoide con el fin de analizar las verdaderas reacciones acrosómicas. En 1980, Talbot y Chacon publican una técnica de triple tinción, desarrollada para espermatozoides humanos, que permite distinguir entre ambas reacciones acrosómicas mediante el empleo de azul Tripán, marrón Bismark y rosa Bengala. Esta técnica ha sido utilizada bajo distintas condiciones en espermatozoides humanos (Talbot y Chacon, 1980), de roedores (Dudenhausen y Talbot, 1982), de équidos (Varner et al., 1987), de bóvidos (Didion y Graves, 1986), de cápridos (Kusunoki et al., 1984) y de suidos (Vázquez et al., 1992).

Por último, hay que destacar que es la propia fecundación in vitro (FIV) un inmejorable indicador del proceso de capacitación espermática. Para que un espermatozoide sea capaz de penetrar a un ovocito, es necesario que previamente se haya capacitado de forma correcta. Por tanto sólo las poblaciones de espermatozoides capacitados podrán penetrar a los ovocitos, por lo que todo sistema de FIV que presente resultados óptimos será indicativo de que el proceso de capacitación espermática habrá sido también óptimo.

2.7.- La citometría de flujo como sistema de análisis espermático

La citometría de flujo, como su propio nombre indica, es la medida de las células en un sistema de flujo. De este modo, la mayoría de los citómetros pueden recoger la luz que se dispersa al pasar por la célula y la luz que emiten los espermatozoides cuando son unidos, de forma específica, a receptores fluorescentes. Además, en ocasiones también puede medirse la luz absorbida y el volumen celular.

La principal ventaja que presenta la citometría de flujo frente a otras técnicas de análisis se encuentra en la capacidad que tiene este instrumento para medir varios parámetros de miles de células individuales en pocos minutos, lo que conduce a la posibilidad de medir subpoblaciones cambiantes.

Esta tecnología en un principio sofisticada y restringida a laboratorios de investigación básica ha pasado a estar presente en los últimos años en la rutina de muchos laboratorios clínicos. Los primeros modelos del citómetro de flujo fueron desarrollados por Moldovan Kielland en la década de los 30 con el único objetivo de contar partículas. Fue en los 40-50 cuando se incorporó a los citómetros la capacidad de medir la célula. En los años 60 se produjo la verdadera revolución cuando se incorporó la posibilidad de medir varios parámetros de la célula al mismo tiempo. A partir de aquí se empiezan a incorporar a los citómetros todos aquellos equipos de medición que en la actualidad presentan. En los años 80 y 90 los equipos no han sufrido grandes transformaciones sino que el desarrollo ha ido encaminado a encontrar nuevas aplicaciones a estos equipos como ha sido en concreto en el caso de la espermatología (Orfao y González de Buitrago, 1995).

2.7.1.- Instrumentación

El citómetro de flujo consiste, básicamente, en una fuente de luz, un sistema de flujo celular, unos componentes ópticos para diferenciar y seleccionar las modificaciones de la luz, los elementos electrónicos para amplificar y procesar la señal resultante y un ordenador (Figura 1).

Las propiedades celulares medidas en el citómetro se basan en dos principios: dispersión de la luz y fluorescencia.

La dispersión de la luz se basa en el principio físico que expone que cuando un haz de luz choca contra una célula cambia la dirección de la luz no su longitud de onda. Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño celular, el núcleo, la membrana celular y el material granular del interior. También la forma de la célula y si la superficie es lisa o rugosa. La luz no se dispersa igual en todas direcciones y la mayoría se proyecta hacia adelante. La luz dispersada hacia adelante ("forward scatter", FSC) es una medición del tamaño celular, mientras que la luz dispersada en ángulo recto ("side scatter", SSC) depende de la densidad celular y la granulosidad y no del tamaño (Orfao y González de Buitrago, 1995).

La fluorescencia se caracteriza porque los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa de longitud de onda característica para cada compuesto. Esta absorción hace que suba un electrón a un nivel energético superior. El electrón excitado cae rápidamente al estado normal emitiendo un fotón y desprendiendo energía. Como fuente de luz son utilizados los rayos láseres, generalmente de argón. La ventaja de los láseres es, por un lado que se trata de una luz monocromática con un diámetro de haz relativamente pequeño. El rayo láser de argón se halla ajustado a una longitud de onda de 488 nm (luz azul). Sin embargo, también se utilizan láseres con luz verde a longitudes de onda de 515 y 535 nm.

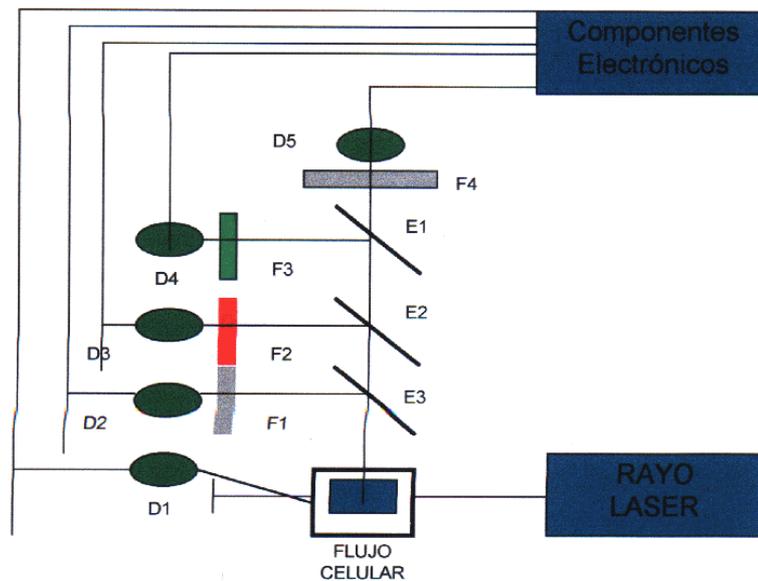


Figura 1. Esquema de un citómetro de flujo. F1-F4: Filtros; E1-E4: Espejos; D1-D5: Detectores.

Normalmente los citómetros poseen cinco sistemas ópticos de medidas: dos de dispersión, uno hacia adelante y otro en ángulo recto, y tres de fluorescencia. El sistema de dispersión hacia adelante determina el tamaño de las células. La luz correspondiente a las diferentes emisiones fluorescentes se recoge en ángulos cercanos a los 90° junto con la luz dispersada lateralmente. Por ello se hace necesario un sistema óptico que permita separar la luz que, aunque recogida lateralmente, aporta información diferente sobre las características de cada célula: la complejidad de la célula y cada una de las emisiones fluorescentes correspondientes a cada uno de los fluorocromos presentes en la célula y excitados del mismo modo. Esta propiedad, quizás una de las más importantes del citómetro de flujo, permite utilizar de forma simultánea diferentes fluorocromos.

2.7.2.- Compuestos fluorescentes más utilizados

El uso de compuestos fluorescentes, denominados fluorocromos, en citometría de flujo ha sido fundamental en el desarrollo de esta técnica. Se debe tener en cuenta que cuando se utilizan varios fluorocromos los espectros de emisión deben tener un solapamiento mínimo con objeto de que puedan cuantificarse de forma separada (Harrison y Vickers, 1990).

El primer fluorocromo que se utilizó para el marcaje fue el FITC. Es una molécula pequeña, con una importante afinidad a las proteínas. Además, el FITC se excita con el azul (488 nm). Presenta algunos inconvenientes relacionados con la cuantificación y expresión de agentes de baja afinidad por la célula. Hay que tener en cuenta que una molécula de FITC no solamente es excitable por la luz del láser sino también por la luz que desprenda la molécula de fluorocromo que se encuentre muy próxima.

Para los estudios de ácidos nucleicos, los fluorocromos más empleados son el yoduro de propidio (YP), el bromuro de etidio, el naranja de acridina, el Hoechst 33342, el naranja de tiazol, la mitramicina y la cromomicina A3. Los dos primeros son los más utilizados en citometría de flujo. Ambos se excitan a longitudes de onda de 488 nm y se unen de forma estequiométrica al ADN de doble cadena, donde se intercalan entre la doble hélice. El naranja de acridina presenta el inconveniente de unirse al material plástico creando interferencias en medidas posteriores. El Hoechst y la cromomicina A3 se unen de forma específica a los pares de bases adenina/timina y citosina/guanina, respectivamente.

2.7.3.- Preparación de las muestras

El principal requerimiento de una muestra para su análisis es que sea una suspensión monodispersa. Para ello las suspensiones celulares que provienen de diferentes tejidos, deben obtenerse por medios como tratamientos enzimáticos, sonicación y cortes finos y filtración. Sin embargo, el semen es recogido como una suspensión de estructuras celulares simples por lo que los espermatozoides son ideales para el análisis mediante citometría de flujo. Hay que tener en cuenta que la temperatura y el almacenamiento pueden influir sobre la viabilidad celular y la expresión del antígeno, alterando de esta manera las poblaciones celulares (Orfao y González de Buitrago, 1995).

2.7.4.- Aplicaciones de la citometría de flujo en espermatozoides

Si bien la bibliografía describe aplicaciones de la citometría de flujo tanto en células masculinas como femeninas, no cabe la menor duda que la proporción se encuentra totalmente favorable hacia el gameto masculino. Básicamente se debe a que, aunque se ha utilizado con células somáticas relacionadas con el aparato reproductor, el sistema presenta altos rendimientos en el estudio del gameto masculino, ya que son millones de espermatozoides los que se expulsan en el eyaculado dispuestos, además, de forma individualizada.

2.7.4.1.- Evaluación de la viabilidad espermática

Existe una relación lineal entre el número de espermatozoides viables en una dosis de inseminación y la capacidad de fecundar a los ovocitos in vivo (Ericsson et al., 1989). Sin embargo, los test convencionales de identificación de la integridad de la membrana de los espermatozoides están débilmente correlacionados con la fertilidad (Graham et al., 1990). El uso de diferentes fluorocromos parece que es un método más óptimo en el análisis de la viabilidad espermática.

Keeler et al (1983), utilizando el colorante H33342 y activándolo con luz ultravioleta, observaron dos picos de fluorescencia que correspondían a espermatozoides vivos (poco fluorescentes) y espermatozoides muertos (muy fluorescentes). Además, utilizando concentraciones óptimas de este colorante, se ha obtenido un tercer pico en el citómetro de flujo, que corresponde a espermatozoide subviables, los cuales podrían ser móviles pero tener disminuida su capacidad de supervivencia. Por tanto, una de las vías de estudio con el citómetro de flujo podría consistir en analizar la relación existente entre el tamaño de esta tercera subpoblación y la capacidad fecundante de los espermatozoides, o de la capacidad de ser congelados, etc.

Se ha descrito otra técnica dual, propuesta por Garner et al. (1986), utilizando YP, el cual tiñe el núcleo de las células muertas como consecuencia de la unión a la doble hélice y el diacetato de carboxifluoresceína, el cual es capaz de penetrar las membranas celulares y ser convertido en un componente

fluorescente impermeable. Estos autores concluyen que los espermatozoides totalmente viables son los verdes en los que no aparece ningún rastro de rojo. En estos estudios vuelve a aparecer una subpoblación de espermatozoides que si bien son verdes, también son rojos. Es decir, una subpoblación de espermatozoides que puede tener comprometida su supervivencia.

Ericsson et al (1989) evaluaron, utilizando colorantes similares a los anteriores, la relación que existía en el ganado vacuno entre el número de espermatozoides muertos o moribundos y el potencial fertilizador del toro. La citometría de flujo detectó cinco poblaciones en estos animales, observando como en algunos casos existía relación directa entre estos dos parámetros.

2.7.4.2.- Evaluación de la capacitación y la reacción acrosómica

Desde hace pocos años, la citometría de flujo está siendo usada, no solamente para evaluar la viabilidad celular como en los anteriores casos, sino también para estudiar junto a la viabilidad otras características celulares tanto estructurales como funcionales en un periodo corto de tiempo con un número alto de células. Está establecido que los espermatozoides maduros eyaculados, deben experimentar una serie de modificaciones, denominadas colectivamente como capacitación.

Uno de los aspectos relacionados con la capacitación es la modificación de las glicoproteínas de superficie. Por tanto la utilización de lectinas o de anticuerpos pueden detectar estas modificaciones sobre la población de espermatozoides vivos. Cuando estudiamos estos aspectos, podemos dividirlos o bien en estudios de células permeabilizadas en las que previamente se hayan diferenciado espermatozoides vivos y muertos o células sin permeabilizar. El problema de las células permeabilizadas es que el acrosoma de los espermatozoides es rico en glicoproteínas por lo que, más que diferenciar cambios iniciales del proceso de capacitación, van a detectar cuando los acrosomas están presentes (existirá una positividad a la lectina) o cuando los acrosomas están ausentes y por tanto la unión de la lectina sea negativa. Por tanto sería una técnica doble similar a las descritas para microscopio de campo claro pero de realización más rápida y permitiría el análisis de un mayor número de células (Graham et al., 1990). Uno de los problemas que aparece cuando

utilizamos esta técnica es el tipo de permeabilización celular que presentan los espermatozoides. Tradicionalmente, ha sido el etanol el agente utilizado para permeabilizar las células. Sin embargo, este agente produce precipitaciones que aglutinan a los espermatozoides, lo cual se hace incompatible con la citometría de flujo (Tao et al., 1993). Los fijadores de naturaleza aldehídica y los detergentes como el triton también producen alteraciones que son incompatibles con una buena lectura en el citómetro de flujo. Es por esta razón por lo que en la actualidad, las permeabilizaciones de las células se realizan mediante la adición de digitonina. En este sentido, Tao et al (1993) observaron que la lectina PNA presentaba una gran sensibilidad en la detección de acrosomas presentes o ausentes en espermatozoides de ratón. Vázquez et al. (1993) demostraron, del mismo modo, que la lectina PNA puede ser un buen indicador para detectar reacciones acrosómicas en los espermatozoides de verraco.

Otro de los objetivos que puede ser estudiado en el proceso de la capacitación, es el cambio que acontece sobre la superficie de la membrana plasmática que cubre la región del acrosoma. Un proceso que podría estar relacionado con la desestabilización del acrosoma sería la alteración del material que cubre la superficie de los espermatozoides. Esta vía de estudio ha sido utilizada para analizar las diferencias de espermatozoides maduros y de origen epididimario y la capacitación de espermatozoides de toro (Mahmoud y Parrish, 1992) y verracos (Asworth et al., 1995).

Finalmente, la implicación que tienen los niveles de Ca^{2+} en el proceso de capacitación es algo que se conoce desde hace tiempo. Estudios recientes han empleado el uso de sondas de Ca^{2+} intracitoplasmático para el estudio del incremento de estos niveles, utilizando cubetas de espectrofotometría. Sin embargo, parece más interesante buscar modificaciones individuales que no cambios en la masa total de espermatozoides estudiados. Entre los compuestos utilizados el fluo-3 es el más aceptado porque produce un incremento de fluorescencia 30 veces superior cuando es excitado que la célula que no contiene en su interior esta sustancia. Además cuando es combinado con el YP, las poblaciones también pueden ser analizadas en función de la vitalidad que presentan (Harrison et al., 1993).

2.7.4.3.- Otras aplicaciones

La citometría de flujo también está siendo utilizada para analizar otros aspectos de los espermatozoides. De este modo se han descrito análisis sobre la estructura de la cromatina espermática (Evenson et al., 1980; Evenson, 1989 y Darzynkiewicz et al., 1975) , la actividad mitocondrial y su relación con la motilidad (Auger et al., 1993) y en la separación de espermatozoides X e Y como método previo para la obtención de embriones de sexo deseado (para revisión Johnson, 1995).

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Animales

Como donantes de semen se seleccionaron dos verracos híbridos, pertenecientes a la Empresa Dalland Hybrid España, de 2 años de edad y con similar experiencia sexual. Sus características seminales fueron satisfactorias durante las 20 semanas precedentes al inicio de los experimentos (Tabla 1). Los eyaculados de ambos verracos presentaron elevadas tasas de penetración in vitro, utilizando ovocitos inmaduros, en 9 ensayos previos.

Tabla 1. Características seminales de los eyaculados de los verracos durante las 20 semanas anteriores al inicio de la experiencia.

Número total de espermatozoides por eyaculado	$\geq 2 \times 10^{10}$
Integridad de la membrana espermática	$\geq 80\%$
Motilidad progresiva	≥ 3
Integridad acrosómica	$\geq 85\%$
Anormalidades morfológicas	$\leq 15\%$

Los animales estuvieron alojados en habitaciones con temperatura controlada (25°C) bajo condiciones naturales de luz y humedad. Los programas sanitario y nutricional fueron los mismos que los utilizados para el resto de los verracos del centro de inseminación artificial.

3.2. Reactivos químicos y suplementos

Todos los medios, suplementos, lectinas y hormonas utilizados en este trabajo fueron de la marca Sigma Chemical Co., St Louis, Mo (USA), excepto la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) que fueron adquiridas a Intervet International B.V., Booxmeer (Holanda). El fluido folicular porcino (FFp) fue obtenido en nuestro laboratorio como se indica posteriormente.

3.3.- Medios de cultivo

3.3.1.- Transporte de ovarios y lavado de ovocitos

Para el transporte de ovarios, obtención de ovocitos inmaduros y lavado de ovocitos se ha utilizado la solución salina fosfatada de Dulbecco (PBS) suplementada con 0'4% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA: Fracción V), 0'34 mM de piruvato sódico, 5'5 mM de glucosa y 70 µg/ml de kanamicina (DPBSm; Mattioli et al., 1988).

3.3.2.- Maduración *in vitro*

El medio de maduración *in vitro* (MW) fue el medio Waymouth MB suplementado tal y como se indica en la tabla 2.

Se prepararon soluciones stock de 17 β-estradiol disolviendo 5 mg de esta hormona en 1 ml de etanol absoluto; posteriormente, se rediluyeron hasta 500 ml de medio Waymouth MB para alcanzar una concentración final de 10 µg de 17 β-estradiol en 1 ml de solución stock. La solución stock se distribuyó en alícuotas de 5 ml, las cuales se almacenaron a - 20°C hasta el momento de su uso.

El FFp se obtuvo por aspiración de folículos antrales (2-5 mm de diámetro) de ovarios procedentes del sacrificio de hembras prepuberales; el contenido folicular aspirado se centrifugó a 1.500 g durante 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 5 ml para proceder a su almacenamiento a -20°C hasta su utilización.

Tabla 2. Suplementación utilizada para el medio de maduración.

eCG	10 UI/ml
hCG	10 UI/ml
17 β-estradiol	1 µg/ml
Sulfato de kanamicina	100 µg/ml
Suero fetal de ternero (FCS)	10% (v/v)
Fluido folicular porcino (FFp)	10% (v/v)

3.3.3.- Dilución del semen y resuspensiones espermáticas

El medio utilizado para la resuspensión espermática fue el BTS descrito por Johnson et al.,1988 (Tabla 3).

Tabla 3. Diluyente BTS para espermatozoides de verraco.

Glucosa	0'2 M
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	3'36 mM
CO ₃ HNa	15 mM
Citrato-Na ₃ .2H ₂ O	20 mM
ClK	5 mM

3.3.4.- Incubación de los espermatozoides

3.3.4.1.- Incubación en medio de fecundación (MF)

Se utilizó el medio TCM 199 con sales de Earle a pH 7'4, suplementado como se indica en la tabla 4 (Cheng, 1985). La suplementación se efectuó en todos los casos inmediatamente antes de la utilización del medio.

Tabla 4. Suplementación del medio de fecundación (MF).

Suero de ternera fetal	12%
Piruvato sódico	0'91 mM
Glucosa	3'05 mM
Lactato cálcico	2'92 mM
Penicilina G	50'0 UI/ml
Sulfato de estreptomicina	30'0 µg/ml
Cafeína	2'00 mM

3.3.4.2.- Incubación en MF con ovocitos (MF-O)

Se utilizó el mismo medio que en el caso anterior pero suplementado con 15 ovocitos madurados in vitro por placa de incubación.

3.3.4.3.- Incubación en MF con progesterona (MF-P)

Se preparó una solución stock de progesterona en DMSO a una concentración de 1'8 mg/ml, conservándose a temperatura ambiente en ausencia de luz. En el momento del ensayo, se diluyó una alícuota de la solución stock de progesterona en MF hasta alcanzar una concentración final de progesterona de 3 µg/ml.

3.4.- Preparación de suspensiones y reactivos

3.4.1.- Preparación de las soluciones de Percoll

Se prepararon dos soluciones isoosmóticas al 35% y al 70% de percoll en PBS, siguiendo el procedimiento descrito por Vincent y Nadeau (1984). El protocolo de preparación de ambas soluciones isoosmóticas es el que sigue:

En primer lugar, se preparó una solución stock 10x de medio salino-HEPES (Tabla 5) y se congeló en alícuotas a -20°C. A 10 ml de la solución 10x se le añadieron 90 ml de agua purificada, suplementándose con 10 mg/ml de sulfato de kanamicina (solución M). A 5 ml de la solución 10x se le añadieron 45 ml de la solución de percoll (Solución 1+9P).

Tabla 5. Medio salino-HEPES en 100 ml de agua purificada (solución 10x).

CINa	8 g
Hepes	4'77 g
Glucosa	1'8 g
KOH-M	2'5 ml

Se determinó la osmolaridad de la solución de percoll (p) (≈ 20 mOsmol/kg), la osmolaridad de la solución M (m) (≈ 300 mOsmol/kg) y la osmolaridad de la solución 1+9P (dp) (≈ 360 mOsmol/kg).

A continuación se calculó el volumen de la solución de percoll (Vp) que hay que añadir a un volumen de la solución 10x para que la mezcla resultante tuviera una osmolaridad de 300 mOsmol/kg siguiendo la siguiente fórmula:

$$V_p = 10m - 300/R \times (300 - p)$$

$$\text{Donde } R = 0'1 \times (10m + 9p) - (0'1 \times dp) / 0'9 \times dp$$

A 50 ml de la solución 1 + 9P se le añadió la cantidad obtenida de la siguiente fórmula $((V_p - 9) \times 1'130 \times 5)$ g de la solución de percoll. Esta solución se consideró la solución del 100% de percoll-salina (≈ 300 mOsmol/Kg).

A 25 ml de la solución 100% de percoll se le añadió un volumen de la solución M de tal forma que el volumen final fuese $25 \times 100/70$ ml. Así, se obtuvo la solución isoosmótica del 70% de percoll-salina. A 25 ml de la solución 100% de percoll se le añadió un volumen de la solución M de tal forma que el volumen final fuese $25 \times 100/35$ ml. Así se obtuvo la solución isoosmótica del 35% de percoll-salina. Estas soluciones del 35 y 70% de percoll se conservaron a 4°C durante un máximo de 15 días.

3.4.2.- Preparación del yoduro de propidio (YP)

Se preparó una solución stock de YP en PBS que contenía una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$. Alicuotas de 20 μl de la solución stock se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

3.4.3.- Preparación de lectinas

En el presente trabajo se utilizaron las lectinas *Arachis Hypogaea* (PNA), *Erythrina Cristagalli* (ECA) y *Sophora Japonica* (SJA) marcadas con FITC. El contenido de FITC en cada una de las lectinas fue de 6, 5 y 4'7 moles por cada mol de PNA, ECA y SJA, respectivamente.

Las tres lectinas se diluyeron en PBS hasta alcanzar una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, procediéndose a continuación a su almacenamiento a -20°C en alicuotas de 250 μl hasta el momento de su utilización.

3.5.- Experimento 1: Estudio de la eficacia de la citometría de flujo en la evaluación de espermatozoides de verraco

3.5.1.- Características del citómetro de flujo

Se ha utilizado un citómetro de flujo (BECTON DICKINSON Immunocytometry Systems, San José, CA) con laser de argón (480 nm) a 15 mW refrigerado por aire. La intensidad de la 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. Para las muestras teñidas con FITC, el registro de la fluorescencia verde (FL1) fue recogido a través de un filtro de 525 nm, mientras que el registro de la fluorescencia roja (YP) (FL2) se realizó a través de un filtro de 575 nm.

3.5.2.- Validación de la técnica de YP, utilizando citometría de flujo, mediante el empleo de muestras con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos

Para validar la técnica de YP, utilizando la citometría de flujo, se procedió a preparar suspensiones espermáticas con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos. Para ello, se depositó una alícuota de una muestra de espermatozoides frescos diluidos 1:10 (v/v) en BTS en un tubo de 5 ml. Posteriormente se efectuaron tres congelaciones/descongelaciones rápidas en nitrógeno líquido, tras lo cual la muestra fue centrifugada a 1200 g durante 5 minutos. El pellet resultante (espermatozoides muertos) fue resuspendido en BTS hasta alcanzar una concentración de 500.000 espermatozoides/ml. Una vez obtenida esta muestra, se mezclaron espermatozoides frescos procedentes de la muestra espermática original y espermatozoides congelados/descongelados en una proporción de 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100, respectivamente. Inmediatamente antes de realizar dichas mezclas, se ajustó la concentración de espermatozoides de la muestra de semen fresco con BTS hasta obtener una concentración de 500.000 espermatozoides/ml.

3.5.3.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la evaluación de espermatozoides vivos/muertos utilizando la técnica de YP

Para realizar este experimento, se utilizaron muestras de semen con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos preparadas como se indica en el apartado anterior con una concentración de 500.000 ó 3×10^7 espermatozoides/ml dependiendo de que la muestra fuese evaluada por citometría de flujo o por microscopía de fluorescencia, respectivamente. Para citometría de flujo se utilizaron 2 ml de la suspensión espermática a los que se les adicionó 20 μ l de la solución stock de YP. Para microscopía de fluorescencia, se diluyeron 2 ml de la suspensión espermática en 20 μ l de la solución stock de YP, 10 μ l de una solución stock de formaldehído (12'5 μ l de formaldehído al 37% en 1 ml de agua) y 20 μ l de una

solución stock de BSA en agua (100 mg/ml). Tras un periodo de incubación a temperatura ambiente de 5 minutos, se depositó una microgota de 5 μ l y se evaluó a 400 aumentos en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Optiphot), con un filtro G-2A y excitación a 580 nm, contándose el número de espermatozoides con la cabeza teñida de rojo.

3.5.4.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la identificación de subpoblaciones espermáticas

Para la evaluación de la muestra espermática mediante citometría de flujo, se siguió el mismo protocolo que el descrito en el apartado anterior. A 500 μ l de la suspensión tratada con YP se le adicionaron 2'5 μ l de la solución stock de PNA-FITC para dar una concentración final de lectina de 1 μ g de lectina/ml, procediéndose a continuación al análisis citométrico. La muestra para la evaluación mediante microscopía de fluorescencia se preparó de forma idéntica a la especificada en el apartado anterior. A 500 μ l de la suspensión tratada con YP se le añadieron 5 μ l de PNA-FITC para dar una concentración final de 2 μ g de lectina/ml, contándose a continuación, a 400 aumentos, los espermatozoides bajo microscopía de fluorescencia con un filtro B-2A con una excitación a 510 nm.

3.5.5.- Toxicidad de las lectinas sobre los espermatozoides incubados in vitro

Para estudiar el posible efecto tóxico de las lectinas sobre los espermatozoides, el semen fue preparado como se describe en el apartado 3.5.3. en lo referente a citometría de flujo. Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides con YP, una alícuota de 500 μ l se pasaron directamente por el citómetro para obtener el porcentaje de espermatozoides vivos. Las tres alícuotas restantes de 500 μ l cada una se diluyeron con 2'5 μ l de las soluciones stock de PNA, ECA y SJA, valorándose a continuación el porcentaje de espermatozoides vivos en presencia de cada una de las lectinas a los 0, 45 y 240 minutos de incubación en MF.

3.6. Experimento 2: Estudio citométrico de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco, sometidos a distintos tratamientos de capacitación, bajo diferentes condiciones de incubación

3.6.1.- Obtención y preparación de los gametos

3.6.1.1.- Obtención y transporte de ovarios

Se utilizaron ovarios de cerdas prepuberales de 90-100 Kg de peso sacrificadas en el matadero. Los ovarios se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio y se depositaron en termos herméticos que contenían DPBSm a 37°C. El traslado al laboratorio se realizó bajo estas condiciones y el tiempo transcurrido desde el sacrificio de las hembras hasta la llegada de los ovarios al laboratorio no fue superior a 1 hora.

3.6.1.2.- Obtención de ovocitos inmaduros

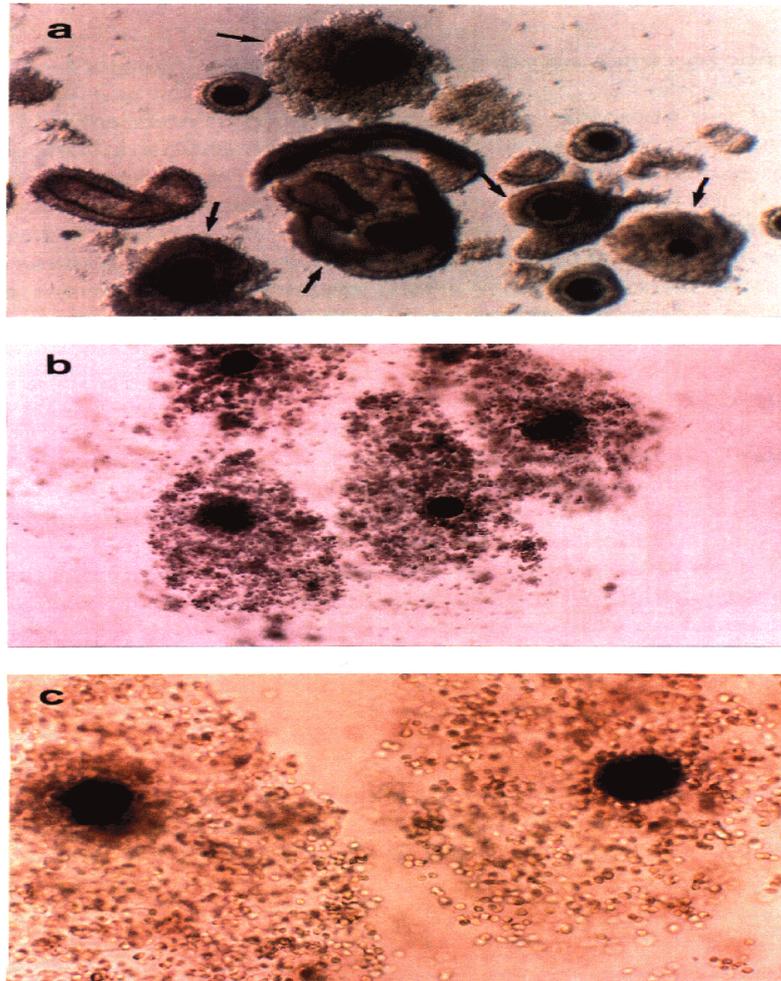
Los ovocitos fueron obtenidos, en DPBSm a 37°C, por sección del ovario mediante una hoja de bisturí estéril. El diámetro máximo de los folículos seccionados fue de 6 mm. Mediante la ayuda de un estereomicroscopio (15x) se seleccionaron aquellos ovocitos con el citoplasma granulado y que estaban rodeados por varias capas compactas de células del cúmulus (Fotografía 1). Los complejos cumulus-ovocito fueron aspirados desde las placas de recolección mediante la utilización de pipetas pasteur adelgazadas y lavados dos veces en DPBSm a 37°C. Inmediatamente antes de proceder a su maduración in vitro, los complejos cumulus-ovocito se lavaron una vez más en MW a 39°C.

3.6.1.3.- Maduración in vitro de los ovocitos

Los complejos cumulus-ovocito fueron transferidos a microgotas (100 µl) de MW bajo aceite de parafina en placas de poliestireno de 40 mm de diámetro (Nuncclon™ Delta Dishes; Nunc Inter Med). El número de ovocitos introducido en cada microgota fue de 15 y el número de microgotas por placa fue de 3. El proceso de maduración in vitro se realizó a 39°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en aire, humedad a saturación y bajo agitación suave (1 rotación/min y 5° de ángulo rotacional; Rotamix, Heto). Después de un periodo de incubación de 46-48 horas, la

maduración de los complejos cumulus-ovocito fue evaluada mediante un estereomicroscopio y aquellos complejos con una masa del cúmulus expandida se seleccionaron para fecundación *in vitro* (Fotografía 1). Estos complejos se lavaron 2 veces en DPBSm y 1 vez en MF antes de introducirlos en las placas de cocultivo. La preparación de los cultivos se completó en todos los casos en un tiempo máximo de 1 hora.

Fotografía 1.- (a) Ovocitos inmaduros obtenidos de ovarios prepuberales de matadero. Sólo aquellos ovocitos rodeados por varias capas compactas de células de cúmulus (flechas) fueron utilizados para maduración in vitro. (b y c) Ovocitos maduros in vitro donde se aprecia claramente la expansión de las células del cumulus.



3.6.1.4.- Obtención y contrastación de las muestras espermáticas

La fracción rica de los eyaculados, obtenida por el método manual, se transportó inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente (22°C). Una vez determinado el número total de espermatozoides por eyaculado, una alícuota de la fracción rica se diluyó en BTS hasta alcanzar una concentración de 7.5×10^6 células/ml y se procedió a determinar las anomalías morfológicas (AM), la motilidad progresiva (MP), la integridad de la membrana plasmática (IMP) y la integridad acrosomal (NAR). Para determinar la MP, tres submuestras de cada muestra espermática se situaron sobre portaobjetos precalentados a 39°C y se evaluaron usando un microscopio de campo claro a 200 aumentos. La proporción de espermatozoides con MP se determinó utilizando una escala arbitraria de 0 a 5 (0, 1, 2, 3, 4 y 5 = 0-10%, 10-25%, 25-50%, 50-70%, 70-90% ó 90-100%, respectivamente, de los espermatozoides móviles mostraban movimiento progresivo). La IMP fue examinada mediante la utilización de YP tal y como describieron Harrison y Vickers (1990) y se indica en el apartado 3.5.3, en lo referente a microscopía de fluorescencia. Las proporciones de espermatozoides con NAR se determinaron a partir de muestras espermáticas fijadas en una solución tamponada de glutaraldehído al 2% (Pursel y Johnson, 1974) bajo microscopía de contraste de fases a 1000 aumentos. El número de espermatozoides contados en cada muestra fue de 300. El resto de las características seminales (número total de espermatozoides por eyaculado y AM) fueron determinadas mediante técnicas estándar de laboratorio.

Para verificar la penetrabilidad in vitro de los eyaculados, antes del inicio de los experimentos, se utilizaron ovocitos inmaduros en 9 ensayos de penetración in vitro siguiendo el protocolo descrito por Martínez et al. (1993).

3.6.1.5.- Preparación e incubación de los espermatozoides

Cada fracción rica se dividió en dos alícuotas de 10 ml. Una alícuota se utilizó sin ningún tipo de manipulación (espermatozoides no lavados) mientras que la otra fue diluida 1:5 (v/v) en BTS y sometida a un gradiente discontinuo de percoll (espermatozoides lavados), antes de que los espermatozoides fueran incubados. Para ello, alícuotas de aproximadamente 5×10^8 espermatozoides (3 ml de la fracción diluida) se depositaron sobre una columna de percoll de doble banda, constituida por 4 ml de la solución isoosmótica del 35% de percoll-salina sobre 2 ml de la solución del 70% de percoll-salina y fueron entonces centrifugadas a temperatura

ambiente a 200 g durante los 5 primeros minutos y a 900 g durante los 15 minutos siguientes. Después de la centrifugación, las capas superiores fueron eliminadas dejando en cada tubo aproximadamente 1 ml de la banda del 70% de percoll, en donde se encontraba el pellet de espermatozoides.

Una vez preparados, los espermatozoides, lavados y no lavados, se incubaron en los tres medios descritos anteriormente MF, MF-O o MF-P. Para ello, alícuotas de espermatozoides lavados y no lavados se añadieron a 2 ml de cada uno de los medios para dar una concentración final de 500.000 espermatozoides/ml.

3.6.2.- Evaluación de las poblaciones espermáticas por citometría de flujo

A los 0, 1, 5, 15, 45, 90, 180 y 240 minutos de incubación se procedió a evaluar el estado de las poblaciones de espermatozoides por citometría de flujo.

Los 2 ml contenidos en cada una de las placas de incubación se diluyeron, previa agitación repetida (10 veces) con una micropipeta de 1 ml, en 20 μ l de la solución stock de YP (500 μ g/ml), obteniéndose una concentración final de YP de 5 μ g/ml. Una alícuota de 500 μ l se introdujo directamente en el citómetro de flujo para valorar la viabilidad espermática y las tres alícuotas restantes se diluyeron en 2'5 μ l de las soluciones stock de cada una de las lectinas para alcanzar una concentración final de 1 μ g de lectina/ml, antes de efectuar el análisis citométrico.

Se efectuaron controles tanto del semen no lavado como del lavado una vez concluido el periodo máximo de incubación espermática (240 minutos). Estos controles se realizaron a partir de las muestras originales (no lavadas y lavadas) utilizadas en cada replicado.

3.6.3.- Evaluación de la penetrabilidad espermática por FIV

Paralelamente a las incubaciones espermáticas, alícuotas de espermatozoides no lavados y lavados se utilizaron para inseminar a ovocitos madurados in vitro y evaluar, así, los resultados de penetrabilidad con cada tipo de espermatozoide. Para ello, se prepararon placas de cocultivo con 2 ml de MF, 15 ovocitos por placa y una concentración final de espermatozoides de 500.000 células/ml. Los ovocitos y los espermatozoides se mantuvieron en un sistema

estático durante 16-18 horas a 39°C en una atmósfera de un 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación.

Al final del período de coincubación, los ovocitos se lavaron en DPBSm a 37°C, extrayendo mecánicamente el exceso de espermatozoides adheridos y las células del cúmulus. Posteriormente, los ovocitos se montaron sobre portaobjetos y se fijaron, durante 24-48 horas, 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).

Para verificar la penetración espermática, cada ovocito se observó a microscopía de contraste de fases (400x).

Los ovocitos en estadio de vesícula germinal o de anafase I - metafase I (Fotografía 2) fueron considerados inmaduros y desechados del estudio; los ovocitos no fecundados en estadio de metafase II fueron clasificados como maduros (Fotografía 3).

Se consideró que un ovocito maduro estaba penetrado cuando se observó en su interior las cabezas espermáticas (descondensadas o no) o los pronúcleos masculinos, con sus correspondientes flagelos espermáticos, y femenino y los dos corpúsculos polares (Fotografías 4 y 5).

Un ovocito se consideró degenerado cuando su citoplasma ofrecía un aspecto granuloso y no se visualizaba material cromosómico en su interior (Fotografía 6).

Se valoró el número de ovocitos degenerados, el número de ovocitos maduros, el número de ovocitos maduros penetrados, el número de ovocitos polispérmicos y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

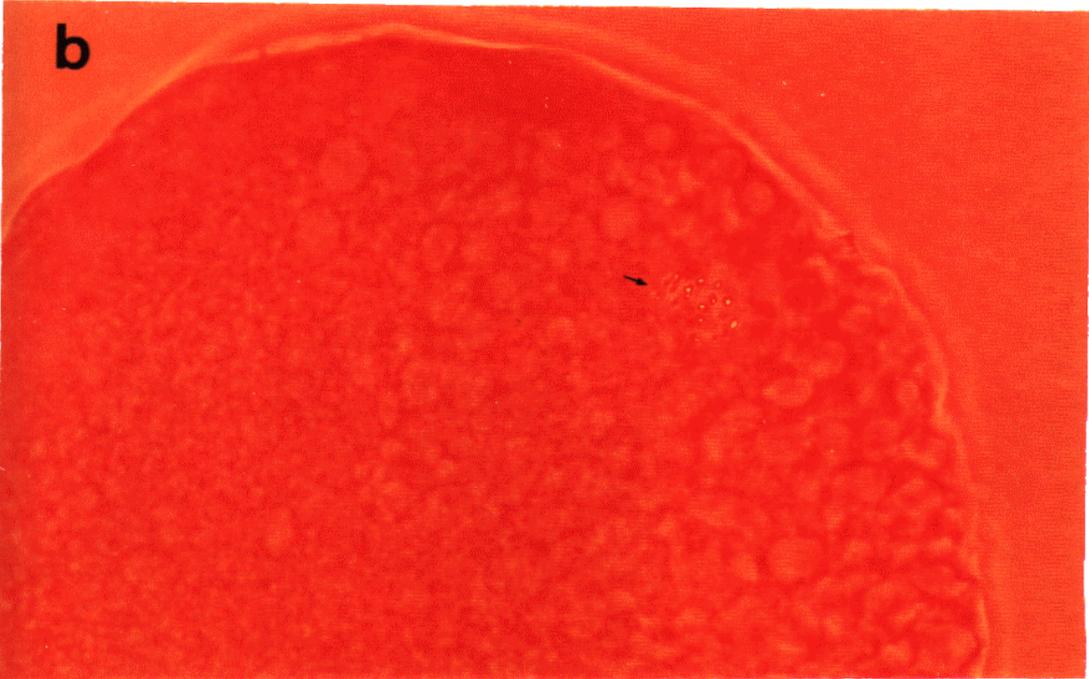
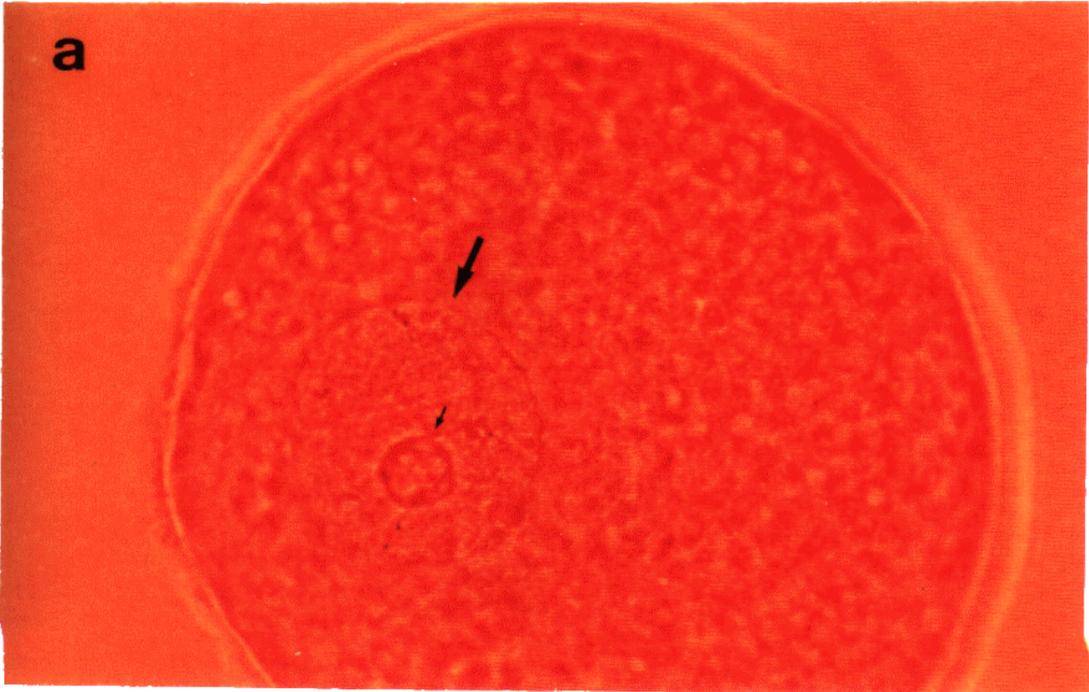
Fotografía 2.- (a) ovocito inmaduro fijado y teñido donde se puede apreciar la vesícula germinal (flecha grande) y el nucleolo (flecha pequeña). (b) Ovocito sometido a maduración in vitro que únicamente progresó hasta el estadio de metafase I (flecha). Nótese la ausencia del primer corpúsculo polar.

Fotografía 3.- Ovocito madurado in vitro en estadio de metafase II donde se observa el primer corpúsculo polar (a; flecha) y el plato de cromosomas (b; flecha), ambos en distintos planos ópticos.

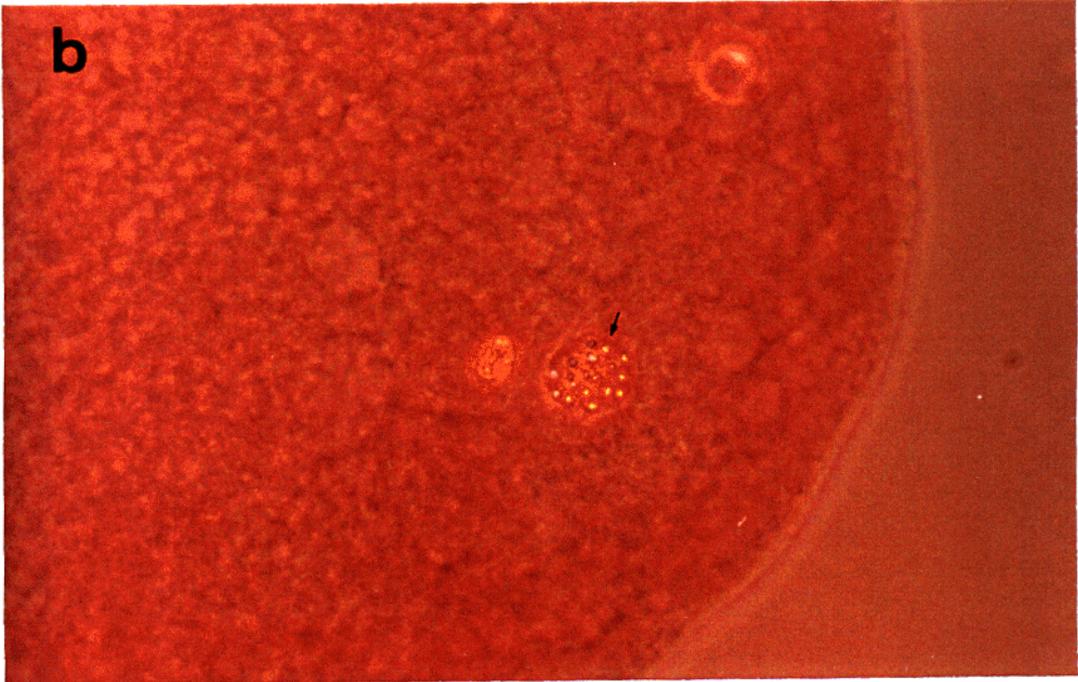
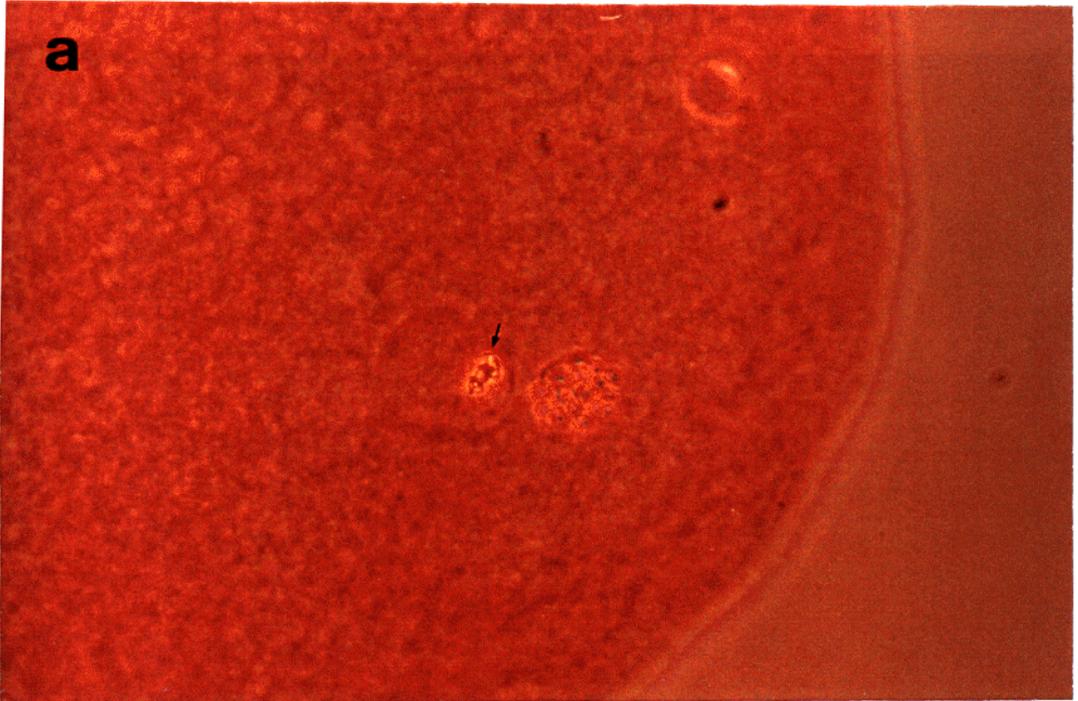
Fotografía 4.- En la parte superior se aprecia un ovocito madurado in vitro en el que se observan los dos corpúsculos polares (flechas paralelas), dos pronúcleos (asteriscos) y el flagelo espermático (flecha). En la parte inferior, en un mismo plano óptico se observan las estructuras anteriormente señaladas (flechas pequeñas: corpúsculos polares; flechas grandes: pronúcleos; punta de flecha: flagelo espermático).

Fotografía 5.- Ovocito madurado in vitro polispérmico. (a) obsérvese un pronúcleo (flecha grande) con el flagelo espermático (punta de flecha hueca), tres espermatozoides descondensados (flechas pequeñas) y tres espermatozoides compactos en distinto campo (puntas de flecha negras). (b) el mismo ovocito donde se aprecia otro pronúcleo (flecha grande) un flagelo espermático (punta de flecha hueca), los tres espermatozoides descondensados fuera del plano (flechas pequeñas) y los tres espermatozoides compactos (puntas de flecha negras).

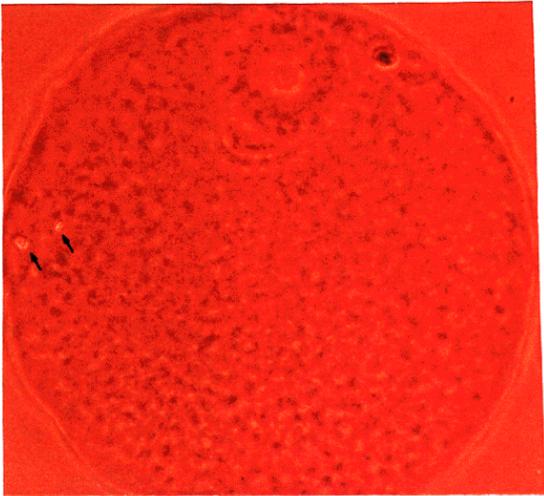
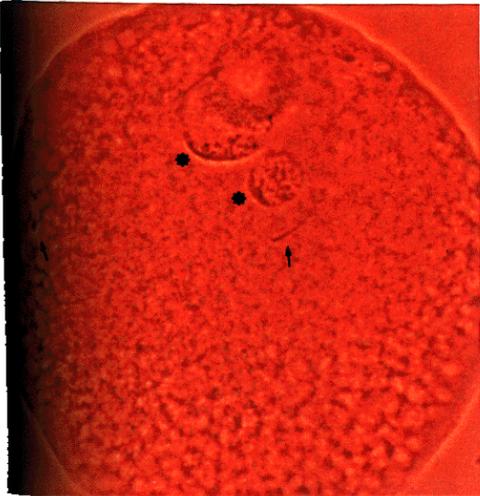
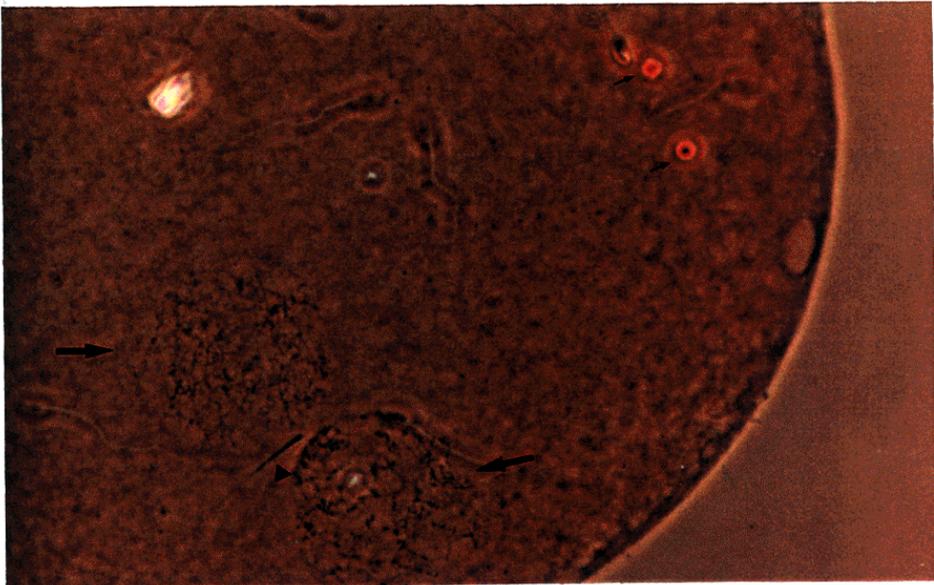
Fotografía 6.- Ovocito degenerado. Nótese la ausencia de material cromosómico y aspecto granuloso del citoplasma.



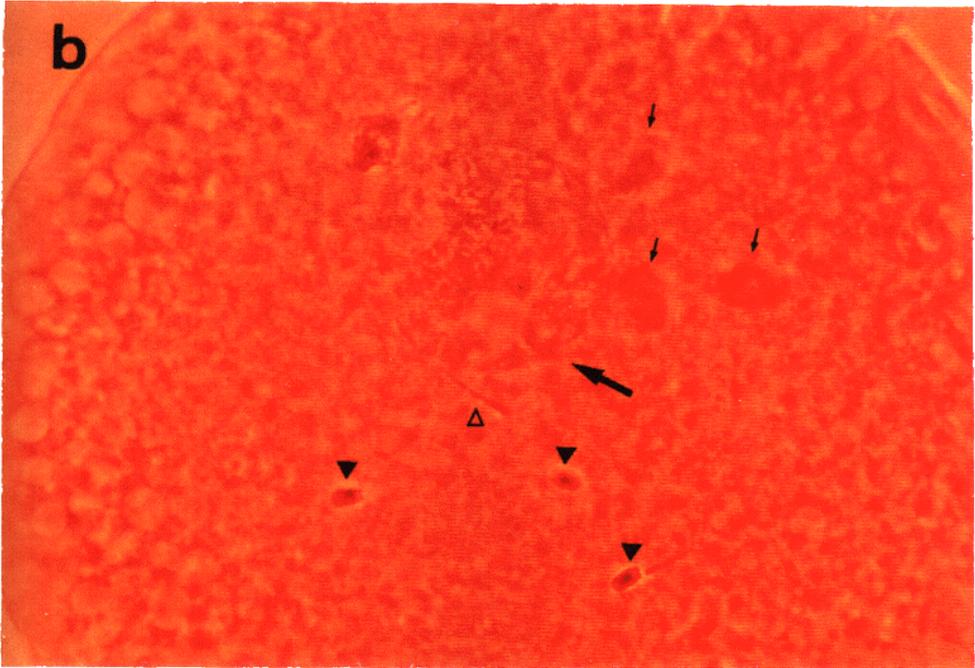
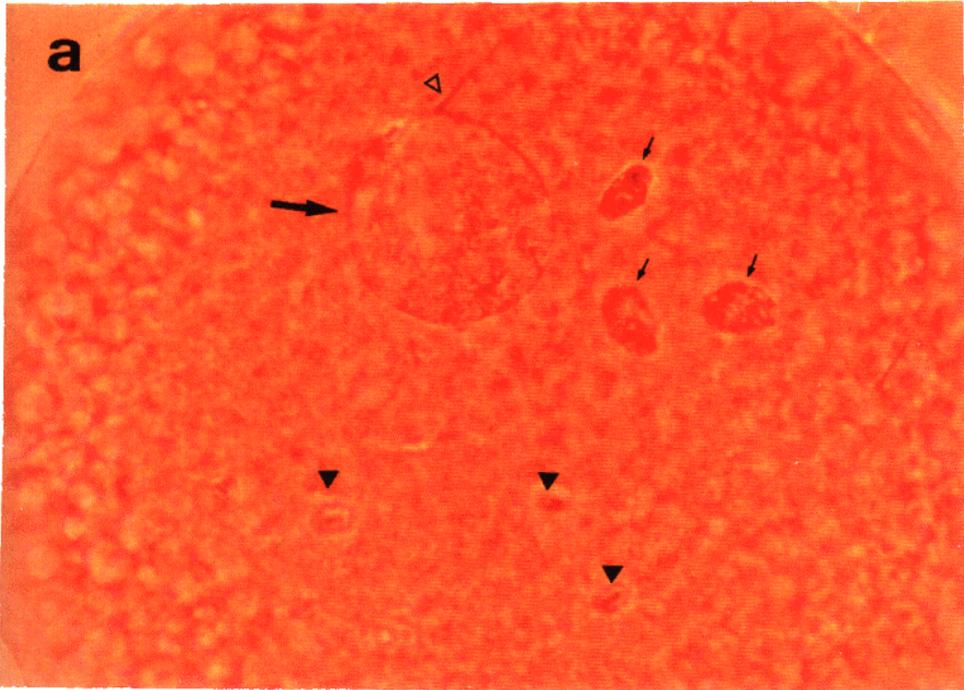
Fotografía 2



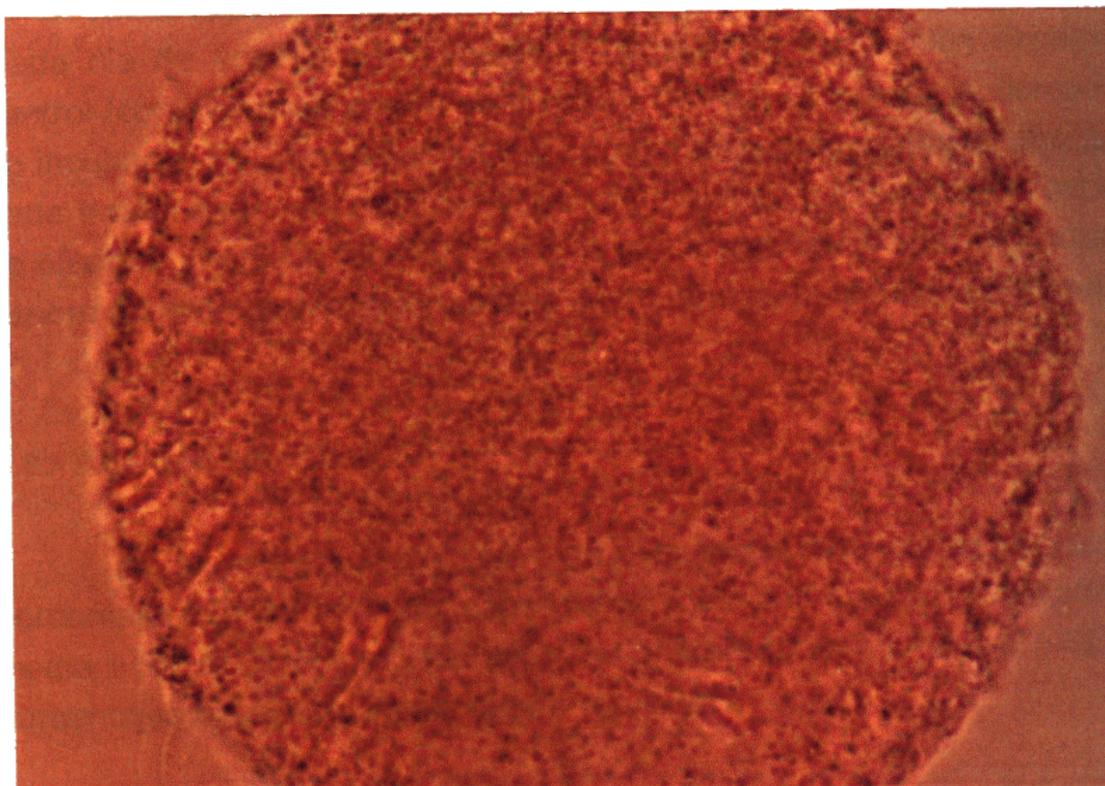
Fotografía 3



Fotografía 4



Fotografía 5



Fotografía 6

3.7.- Diseño experimental

Todos los experimentos se han repetido 4 veces, utilizando siempre semen heterospérmico procedente de dos verracos. El número de espermatozoides contados mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia fue en todos los casos de 2000 y 300, respectivamente.

En el experimento 2 se utilizaron un total de 854 ovocitos inmaduros. Cada día de ensayo se utilizaron 8 tiempos de incubación espermática, 1 control (con el semen inicial, no lavado y lavado, al finalizar el tiempo máximo de incubación) y 2 procesos de FIV con ovocitos madurados in vitro (uno para cada tratamiento espermático). Para cada tiempo de incubación espermática se efectuó un diseño factorial 3 x 2 (3 medios de incubación y 2 tratamientos espermáticos), utilizándose un total de 48 placas de incubación (Figura 2).

3.8.- Análisis estadístico

Las tasas de penetración y de ovocitos polispérmicos se expresan en porcentajes. El número de espermatozoides por ovocito se expresa como media \pm SEM. El resto de los datos se presentan como medias \pm SEM de los porcentajes obtenidos en los cuatro replicados.

Cuando la comparación afectaba únicamente a dos medias, el grado de significación se obtuvo mediante el test de *t de Student* para muestras pareadas. Cuando la comparación afectaba a más de dos medias se realizó un ANOVA de una vía (toxicidad de lectinas) o de dos vías (en el resto de los casos), utilizando el General Linear Models del SYSTAT (Wilkinsosn y Howe, 1992). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Tukey. Se consideraron diferencias significativas a un nivel de $p < 0.01$.

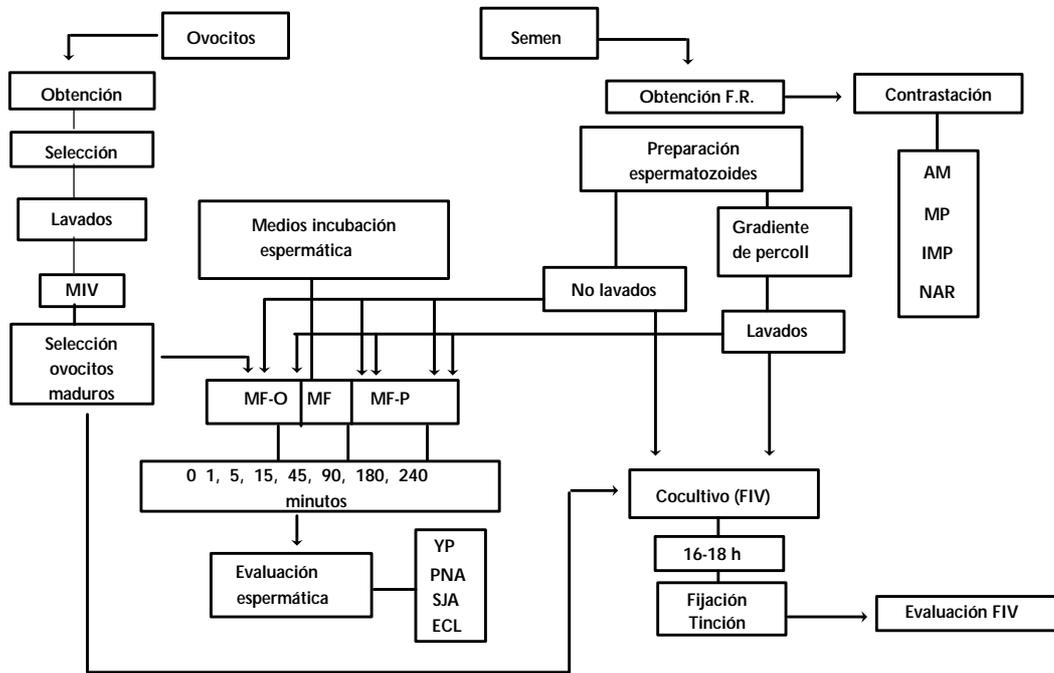


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental seguido en el experimento 2.

4.- RESULTADOS

4.1.- Experimento 1: Estudio de la eficacia de la citometría de flujo en la evaluación de espermatozoides de verraco

4.1.1.- Selección de la muestra espermática

La selección de la muestra se realizó en base al tamaño y la complejidad celular. La población inicial obtenida en el citómetro de flujo queda reflejada en la figura 3a, donde el eje X mide el tamaño celular y corresponde a la luz dispersada hacia adelante al paso de la célula (FSC), mientras que en el eje Y se representa la luz dispersada en ángulo recto (SSC), dependiente de la densidad y la granulosidad celular y no del tamaño de la célula. La velocidad de las células espermáticas durante su trayecto a través de la cámara de flujo osciló entre 200 y 400 células/segundo. De esta población se eliminaron aquellas partículas pequeñas que correspondían a restos celulares, gotas citoplasmáticas, etc., así como partículas de tamaño superior al de las propias células espermáticas, tales como aglutinaciones celulares, restos de secreciones procedentes de las glándulas de Cowper, etc. (Figura 3b). La población espermática quedó concentrada en dos subpoblaciones que variaron en función de la orientación del espermatozoide en el momento de la lectura (Figura 3c). Así, la población de la izquierda corresponde a aquellos espermatozoides que en el momento de la lectura estaban orientados lateralmente al rayo laser mientras que la población de la derecha se encuentra formada por aquellos espermatozoides orientados perpendicularmente a dicho rayo. En esta última subpoblación es posible discriminar la complejidad celular debido a que la difracción del rayo luminoso es más sensible (Figura 3c).

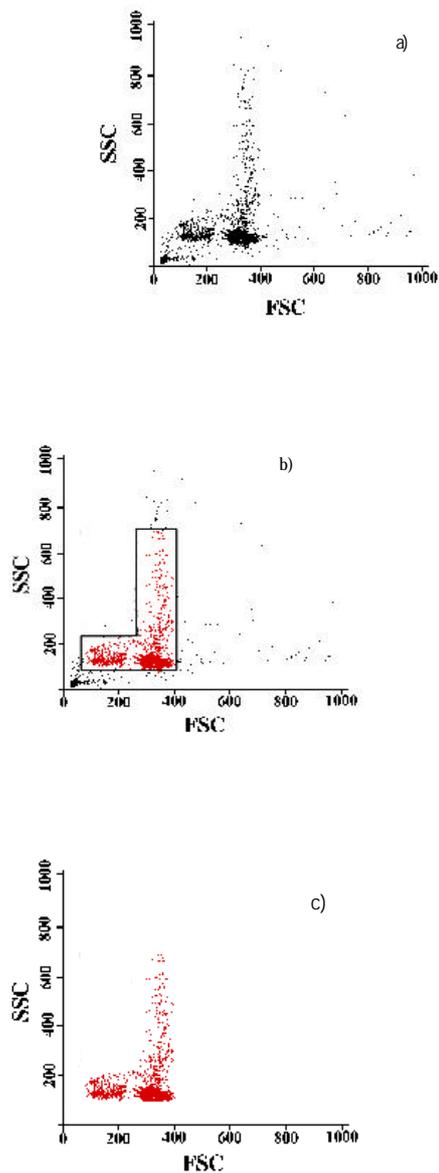


Figura 3.- Selección de los espermatozoides desde los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. a) Población total; b) Población seleccionada (en rojo); c) Población espermática.

Para verificar que la población seleccionada correspondía exclusivamente a células espermáticas, se realizó una comprobación tridimensional de los resultados obtenidos en el análisis de células espermáticas teñidas con YP (Figura 4), observándose que la población de espermatozoides no teñidos disminuía a medida

que se incrementaba la proporción de espermatozoides muertos (teñidos), sin desplazarse dichas poblaciones del eje representante del tamaño celular.

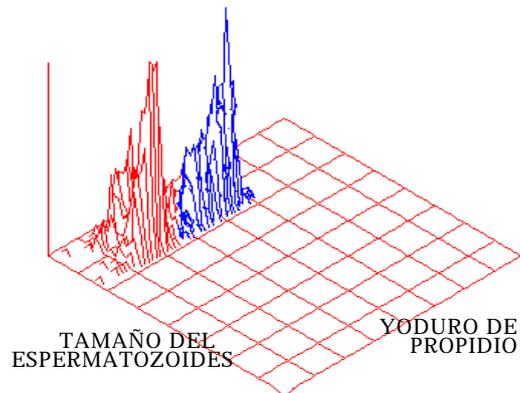


Figura 4.- Evolución de las células, seleccionadas según su tamaño, en presencia de yoduro de propidio.

4.1.2.- Validación de la técnica de YP, utilizando citometría de flujo, mediante el empleo de muestras con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos

Como puede observarse en la figura 5, los espermatozoides unidos a YP presentaron una fluorescencia roja unas 250 veces más intensa que los no unidos.

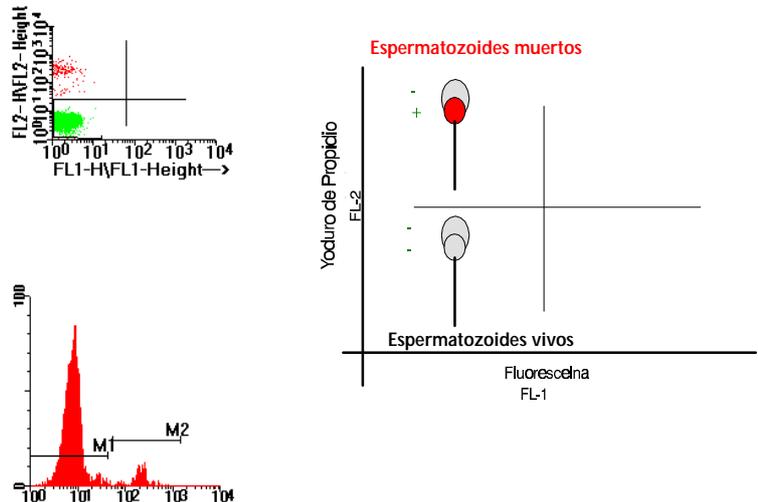


Figura 5.- Análisis mediante citometría de flujo de una muestra de espermatozoides teñidos con yoduro de propidio.

La validación de esta prueba se detalla en la figura 6. Como puede apreciarse, los valores medios correspondientes para las muestras 75/25, 50/50 y 25/75 de espermatozoides vivos/muertos fueron 67'5 y 66'75, 45'5 y 44'5, y 24'0 y 22'25 para espermatozoides observados y esperados, respectivamente, no existiendo en ningún caso diferencias significativas.

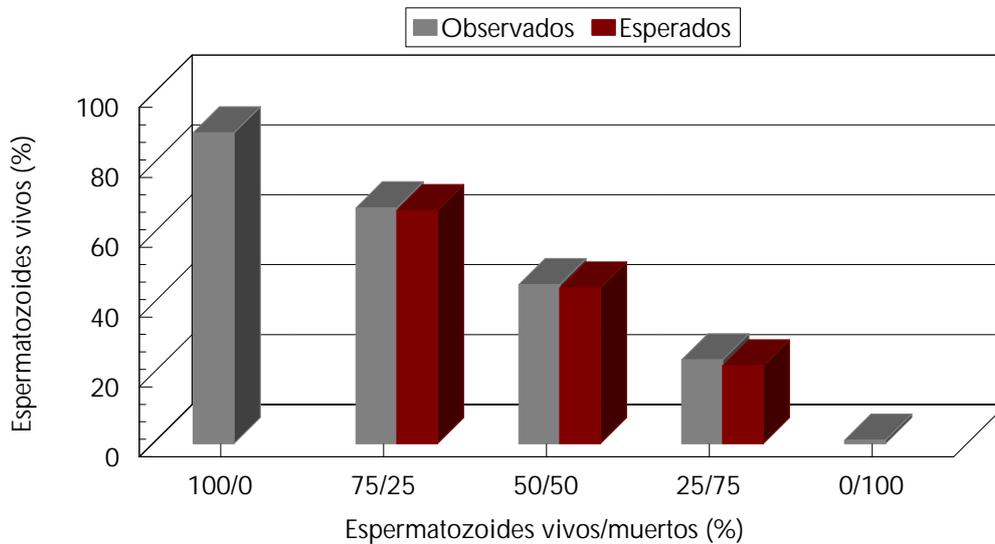


Figura 6.- Validación de la técnica del yoduro de propidio como técnica de vivos y muertos utilizando el citómetro de flujo con concentraciones conocidas de espermatozoides vivos.

El valor medio de espermatozoides observados para las muestras 0/100 fue próximo a 0, por lo que no fue necesario ajustar los porcentajes de espermatozoides esperados.

4.1.3.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la evaluación de espermatozoides vivos/muertos utilizando la técnica de YP

El porcentaje de YP unido a los espermatozoides determinado por citometría de flujo fue muy próximo al observado por microscopía de fluorescencia (Figura 7, Fotografía 7). La máxima diferencia entre ambos procedimientos se situó en torno al 5%, como puede observarse en el histograma.

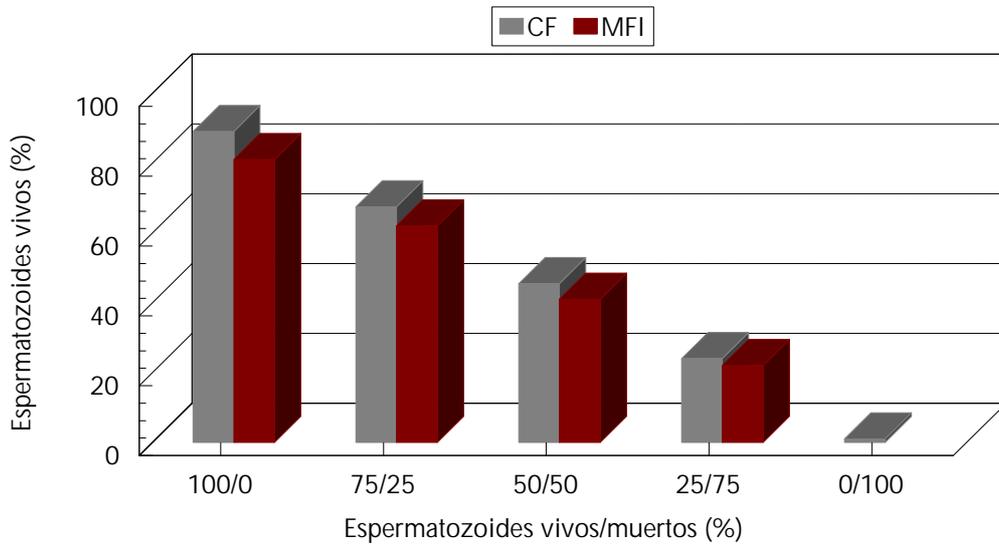


Figura 7.- Comparación de la técnica del yoduro de propidio evaluada mediante el citómetro de flujo y el microscopio de fluorescencia para evaluar espermatozoides vivos y muertos. CF: citometría de flujo; MFI: microscopía de fluorescencia.

4.1.4.- Comparación de la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia en la identificación de subpoblaciones espermáticas

Como puede observarse en las fotografías 7 y 8, la incubación de los espermatozoides en un medio con YP y PNA-FITC permitió visualizar mediante microscopía de fluorescencia cuatro subpoblaciones espermáticas: espermatozoides teñidos de rojo (muertos) y verde (acrosoma reaccionante), espermatozoides teñidos únicamente de rojo (muertos, no reaccionantes), espermatozoides teñidos únicamente de verde (vivos, reaccionantes) y espermatozoides sin teñir (vivos, no reaccionantes). Del mismo modo, también se identificaron cuatro subpoblaciones por citometría de flujo, tal y como se representa en la figura 8.

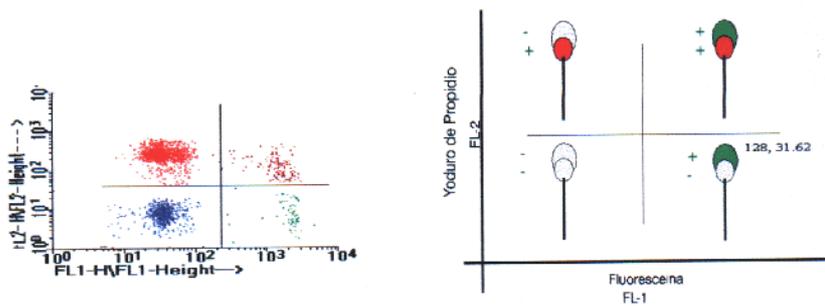
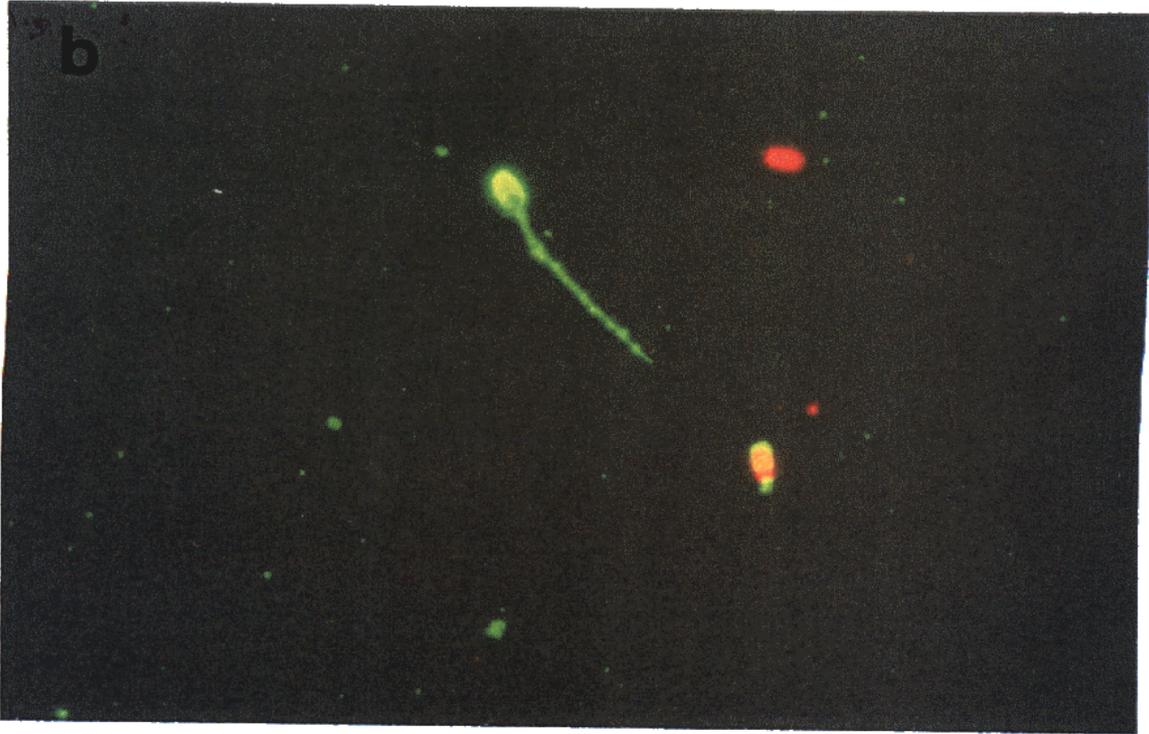


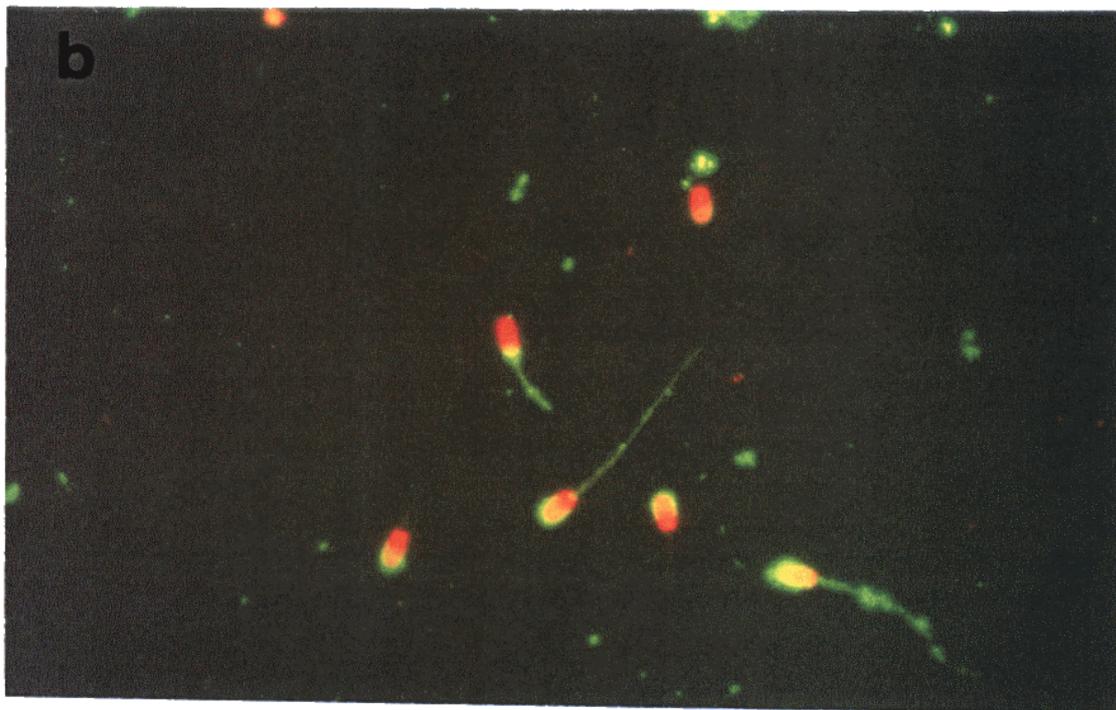
Figura 8.- Resultados obtenidos mediante citometría de flujo y su correspondencia con las diferentes subpoblaciones espermáticas.

Fotografía 7.- Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio y PNA-FITC observados con microscopía de contraste de fases (a) y microscopía de fluorescencia (b). En la imagen (b) se observa un espermatozoide teñido de rojo y verde (muerto reaccionante), un espermatozoide teñido de rojo (muerto no reaccionante) y un espermatozoide teñido de verde (vivo reaccionante); Los espermatozoides restantes que aparecen en la imagen (a) son células sin teñir (vivos no reaccionantes), no visibles mediante microscopía de fluorescencia.

Fotografía 8.- Espermatozoides teñidos con yoduro de propidio y PNA-FITC observados con microscopía de contraste de fases (a) y microscopía de fluorescencia (b). Los espermatozoides señalados con puntas de flechas corresponden con espermatozoides muertos en diferente estadio de reacción acrosómica (primeros estadios: puntas de flecha negras y último estadio: punta de flecha hueca), mientras que el espermatozoide señalado con asterisco corresponde a un espermatozoide muerto no reaccionante.



Fotografía 7



Fotografía 8

Estas subpoblaciones se distribuyeron en cuatro cuadrantes cuyos límites se encontraron próximos al valor 200, considerándose como espermatozoides positivos a los fluorocromos aquellos que presentaron una reactividad superior a 200, tanto para el YP como para la FITC.

En la figura 9 se representan los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, utilizando YP y PNA-FITC, de cada una de las subpoblaciones, existiendo entre ambas metodologías una diferencia, en ningún caso significativa, del 5, 2, 1 y 4% para las subpoblaciones vivos-no reaccionantes, vivos-reaccionantes, muertos-reaccionantes y muertos-no reaccionantes, respectivamente.

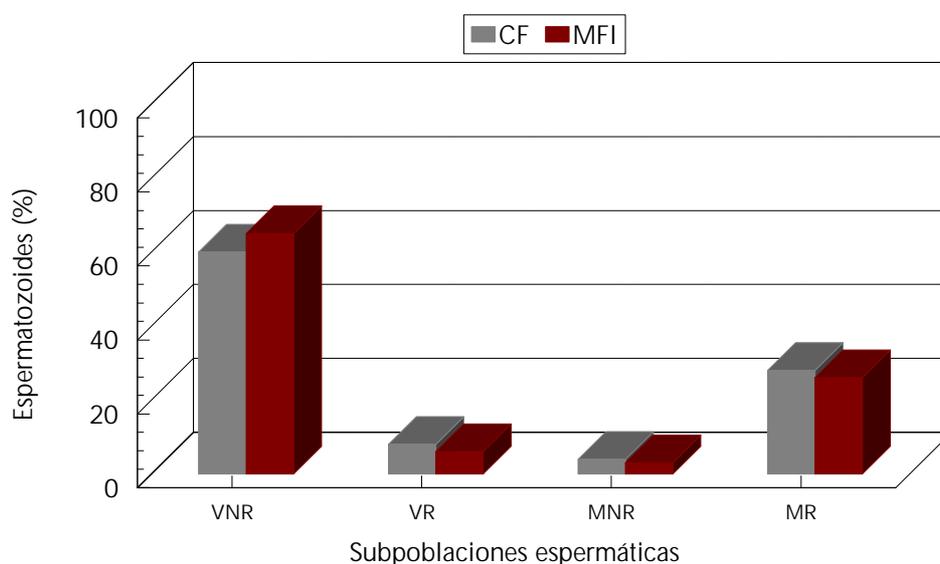


Figura 9. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, utilizando yoduro de propidio y PNA-FITC. VNR: espermatozoides vivos no reaccionantes; VR: espermatozoides vivos reaccionantes; MNR: espermatozoides muertos no reaccionantes; MR: espermatozoides muertos reaccionantes. CF: citometría de flujo; MFI: microscopía de fluorescencia.

4.1.5.- Estudio de la toxicidad de la PNA, ECA y SJA sobre los espermatozoides incubados *in vitro*

En la figura 10 se representa el porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos mediante la utilización de YP y mediante el empleo de YP conjuntamente con PNA, ECA o SJA. Ninguna de las lectinas utilizadas presentó un efecto tóxico sobre la viabilidad espermática, independientemente del tiempo incubación empleado.

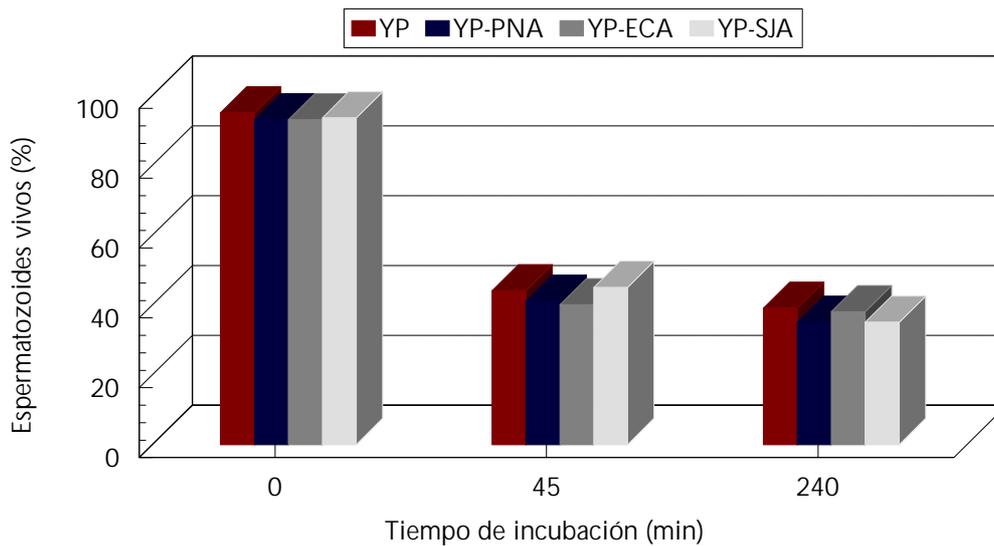


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos mediante la utilización de yoduro de propidio sólo o combinado con PNA, ECA o SJA.

4.2.- Experimento 2: Estudio citométrico de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco, sometidos a distintos tratamientos de capacitación, bajo diferentes condiciones de incubación

4.2.1. Estudio de la viabilidad espermática

En la figura 11 se representa la evolución de la viabilidad de los espermatozoides lavados y no lavados durante la incubación en MF, MF-P y MF-O.

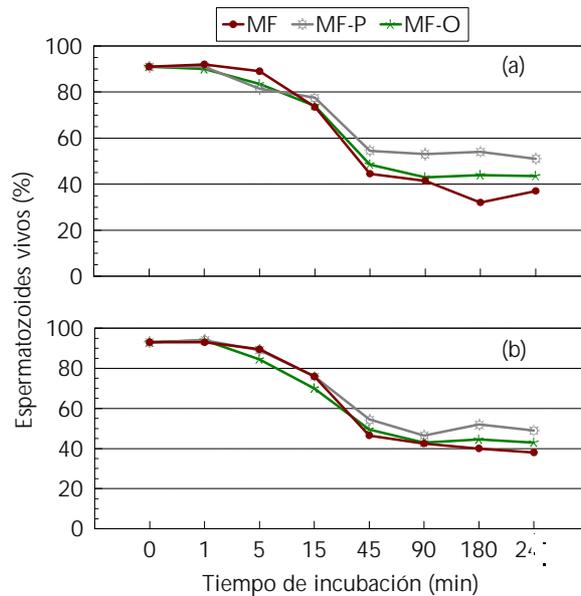


Figura 11. Viabilidad de los espermatozoides lavados (a) y no lavados (b) durante la incubación en medio de fecundación (MF), medio de fecundación con progesterona (MF-P) y medio de fecundación con ovocitos (MF-O).

Los resultados obtenidos en los cuatro replicados se indican en las tablas 6 y 7.

Tabla 6.- Vitalidad obtenida durante la incubación de los espermatozoides no lavados incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	93'0 \pm 1'9 ^a	93'0 \pm 1'9 ^a	93'0 \pm 1'9 ^a
1	93'0 \pm 1'5 ^a	94'0 \pm 1'9 ^a	94'0 \pm 1'9 ^a
5	89'5 \pm 2'7 ^{ac}	89'0 \pm 2'2 ^{ac}	84'5 \pm 2'9 ^{ac}
15	76'0 \pm 2'7 ^c	76'0 \pm 2'9 ^c	70'0 \pm 2'1 ^c
45	46'5 \pm 3'2 ^b	54'5 \pm 2'4 ^b	49'5 \pm 2'2 ^b
90	42'5 \pm 2'4 ^b	46'5 \pm 3'3 ^b	43'0 \pm 3'5 ^b
180	40'0 \pm 2'2 ^b	52'0 \pm 2'6 ^b	44'5 \pm 2'4 ^b
240	38'0 \pm 1'3 ^b	49'0 \pm 2'7 ^b	43'0 \pm 2'8 ^b

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0'01$).

Tabla 7.- Vitalidad obtenida durante la incubación de los espermatozoides lavados (percoll) incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	91'0 \pm 1'9 ^a	91'0 \pm 1'9 ^a	91'0 \pm 1'9 ^a
1	92'0 \pm 2'8 ^a	91'0 \pm 2'1 ^a	90'0 \pm 1'9 ^a
5	89'0 \pm 2'6 ^{ac}	81'5 \pm 2'5 ^{ac}	83'5 \pm 3'5 ^{ac}
15	73'5 \pm 2'6 ^c	77'5 \pm 2'5 ^c	74'0 \pm 2'3 ^c
45	44'5 \pm 2'1 ^b	54'5 \pm 2'1 ^b	48'5 \pm 3'5 ^b
90	41'5 \pm 4'1 ^b	53'0 \pm 2'1 ^b	43'0 \pm 3'6 ^b
180	32'0 \pm 2'1 ^{b*}	54'0 \pm 2'3 ^{b*}	44'0 \pm 2'7 ^b
240	37'0 \pm 1'1 ^{b*}	51'0 \pm 2'0 ^{b*}	43'5 \pm 2'4 ^b

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0'01$).

Los valores dentro de una misma fila con * difieren significativamente ($p < 0'01$).

De forma genérica, la evolución de la viabilidad se caracterizó por presentar un modelo trifásico en el cual existió una primera fase, comprendida entre los 0 y los 15 minutos, con un ligero descenso, una segunda fase, entre los 15 y los 45 minutos, con una brusca disminución y una tercera fase, entre los 45 y los 240 minutos donde la viabilidad espermática permaneció estable. Este modelo trifásico fue más acusado en los espermatozoides lavados que en los no lavados, quedando comprendida la segunda fase, en estos últimos, entre los 5 y 45 minutos.

Cuando se analizan los resultados de viabilidad celular en función del medio de incubación utilizado, se observa que aunque existen diferencias entre los tres medios de incubación para tiempos superiores a 45 minutos, éstas son estadísticamente significativas sólo en espermatozoides lavados e incubados en MF y MF-P tanto a los 180 como a los 240 minutos (Tablas 6 y 7). Con el medio MF-P se produce el menor número de pérdidas espermáticas tanto en el semen lavado como en el no lavado.

4.2.2.- Estudio de las glicoproteínas espermáticas mediante la utilización de lectinas

Aunque a continuación se describen de forma genérica los patrones de evolución de cada una de las subpoblaciones espermáticas obtenidas, el estudio se centra principalmente en la subpoblación de espermatozoides vivos positivos a la lectina, ya que esta subpoblación podría corresponder realmente con aquellos espermatozoides que sufren modificaciones relacionadas con los procesos de capacitación y reacción acrosómica verdadera.

4.2.2.1.- PNA

En la figura 12 se representan, mediante un histograma de frecuencias acumuladas, los resultados de las diferentes subpoblaciones espermáticas estudiadas mediante la utilización simultánea de YP y PNA-FITC en espermatozoides no lavados (Figura 12a) y lavados (Figura 12b).

Los porcentajes de espermatozoides vivos a lo largo del periodo de incubación y en función del medio de incubación fueron similares a los descritos en el apartado anterior, tanto en espermatozoides no lavados como en los lavados. Los porcentajes de espermatozoides muertos se incrementaron durante la incubación en los tres medios utilizados, tanto en la subpoblación de espermatozoides muertos positivos como en la de muertos negativos a la lectina.

El estudio realizado sobre espermatozoides no lavados muestra que la evolución seguida por los espermatozoides vivos positivos a la PNA se caracteriza por la existencia de un pico máximo, estadísticamente significativo, a los 45 minutos de incubación en los tres medios utilizados (Figura 13). El valor máximo se presenta en el medio MF-P, aunque no existen diferencias significativas con respecto a los otros dos medios de incubación (Tabla 8). El análisis de los espermatozoides lavados indica una evolución similar a la obtenida con espermatozoides no lavados (Figura 13). En este caso nuevamente se observa que los valores máximos de espermatozoides vivos positivos a la PNA se presentan a los 45 minutos, independientemente del medio de incubación utilizado, aunque el pico máximo es más acusado que en el caso de los espermatozoides no lavados. Se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) en los valores obtenidos a los 45 y 90 minutos entre los tres medios de incubación, siendo el MF-P el que presenta valores más elevados (Tabla 9).

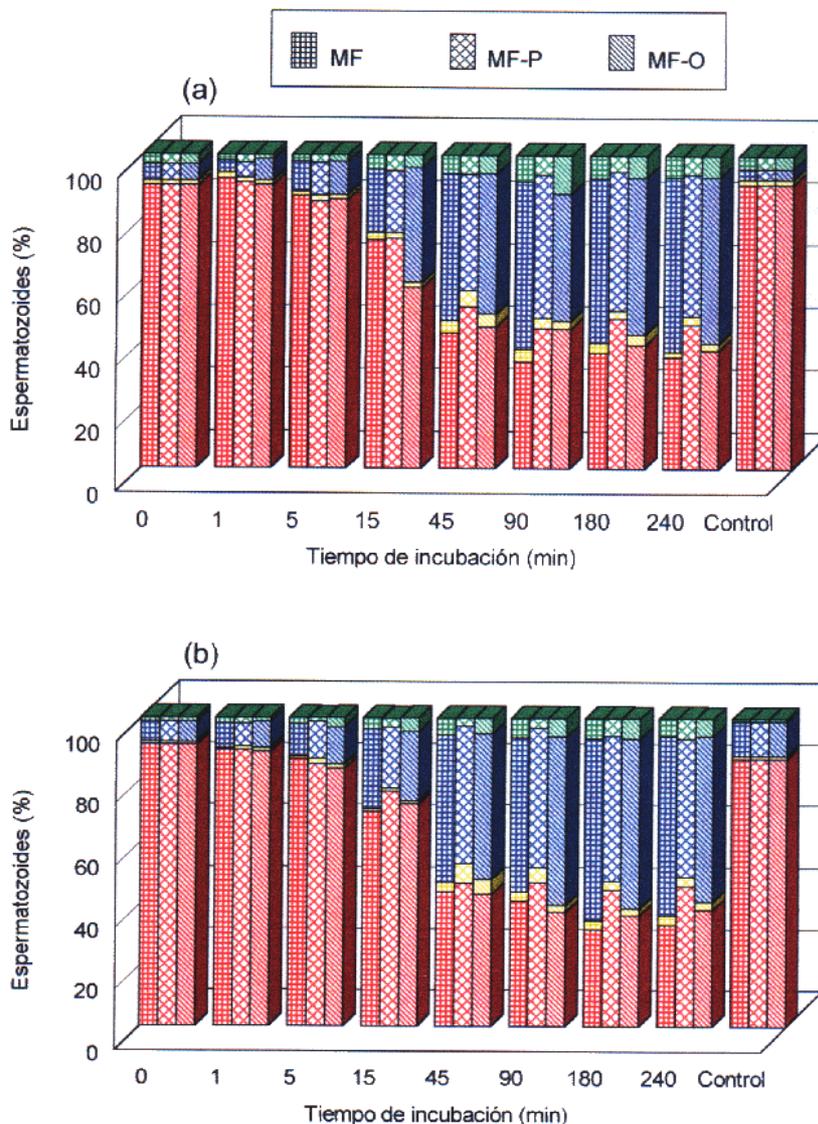


Figura 12. Evolución de las cuatro subpoblaciones espermáticas en medio de fecundación (MF), medio de fecundación con progesterona (MF-P) y en medio de fecundación con ovocitos (MF-O) en espermatozoides no lavados (a) y lavados (b), mediante la utilización de yoduro de propidio y PNA-FICT. Espermatozoides vivos negativos (■), Espermatozoides vivos positivos (■), Espermatozoides muertos negativos (■) y Espermatozoides muertos positivos (■).

Tabla 8. Valores obtenidos de espermatozoides no lavados vivos positivos a la PNA incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	1'65±0'16 ^a	1'65±0'16 ^a	1'65±0'16 ^a
1	1'95±0'18 ^a	1'40±0'23 ^a	1'50±0'20 ^a
5	1'65±0'13 ^a	1'72±0'41 ^a	1'45±0'32 ^a
15	2'25±0'27 ^{ab}	2'02±0'10 ^a	1'75±0'18 ^a
45	3'87±0'44 ^c	5'20±0'48 ^{bc}	4'32±0'28 ^{bc}
90	3'92±0'39 ^c	3'42±0'40 ^{ac}	2'60±0'31 ^{ac}
180	3'10±0'32 ^{bc}	2'45±0'21 ^a	3'27±0'17 ^{ac}
240	1'60±0'17 ^a	2'70±0'29 ^a	2'27±0'16 ^a
Control	1'61±0'10 ^a	1'61±0'10 ^a	1'61±0'10 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0'01$).

Tabla 9. Valores obtenidos de espermatozoides lavados (percoll) vivos positivos a la PNA incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	0'90±0'13 ^a	0'90±0'13 ^a	0'90±0'13 ^a
1	0'45±0'08 ^a	1'05±0'16 ^a	1'25±0'20 ^a
5	0'70±0'19 ^a	1'60±0'17 ^a	1'45±0'30 ^a
15	0'87±0'16 ^a	1'12±0'22 ^a	0'90±0'24 ^a
45	2'97±0'19 ^{b*}	6'41±0'82 ^{b*}	4'77±0'40 ^{b*}
90	2'82±0'22 ^b	4'82±0'47 ^{b*}	2'20±0'54 ^a
180	2'85±0'36 ^b	2'85±0'31 ^a	2'32±0'47 ^a
240	3'17±0'28 ^b	2'95±0'27 ^a	2'72±0'49 ^a
Control	1'01±0'12 ^a	1'01±0'12 ^a	1'01±0'12 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0'01$).

Los valores dentro de una misma fila con * difieren significativamente ($p < 0'01$).

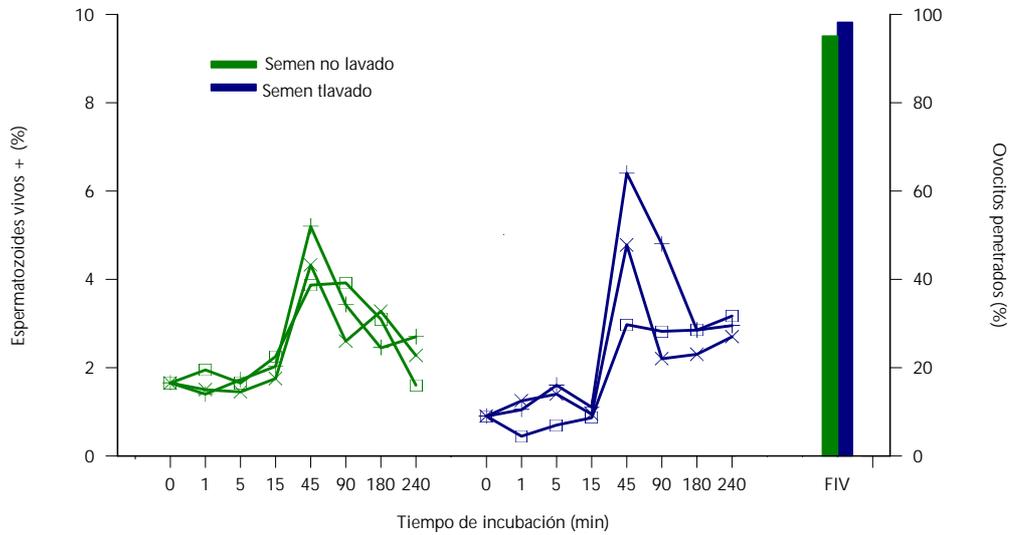


Figura 13.- Relación entre los porcentajes de espermatozoides vivos + al yoduro de propidio y PNA en los diferentes medios de incubación y las tasas de penetración in vitro. (□) MF; (+) MF-P; (X) MF-O.

4.2.2.2.- ECA

La variación de la respuesta de los espermatozoides a la ECA se representa en la figura 14.

Del análisis de los resultados, se puede observar que los espermatozoides experimentan un cambio sustancial en cuanto a la reactividad a la ECA cuando se lavan con percoll, pasando del 1'12% al 91'25% de espermatozoides vivos positivos. En el grupo de espermatozoides lavados, el contacto con M-199, independientemente de la suplementación añadida, transforma a la población de positiva a negativa.

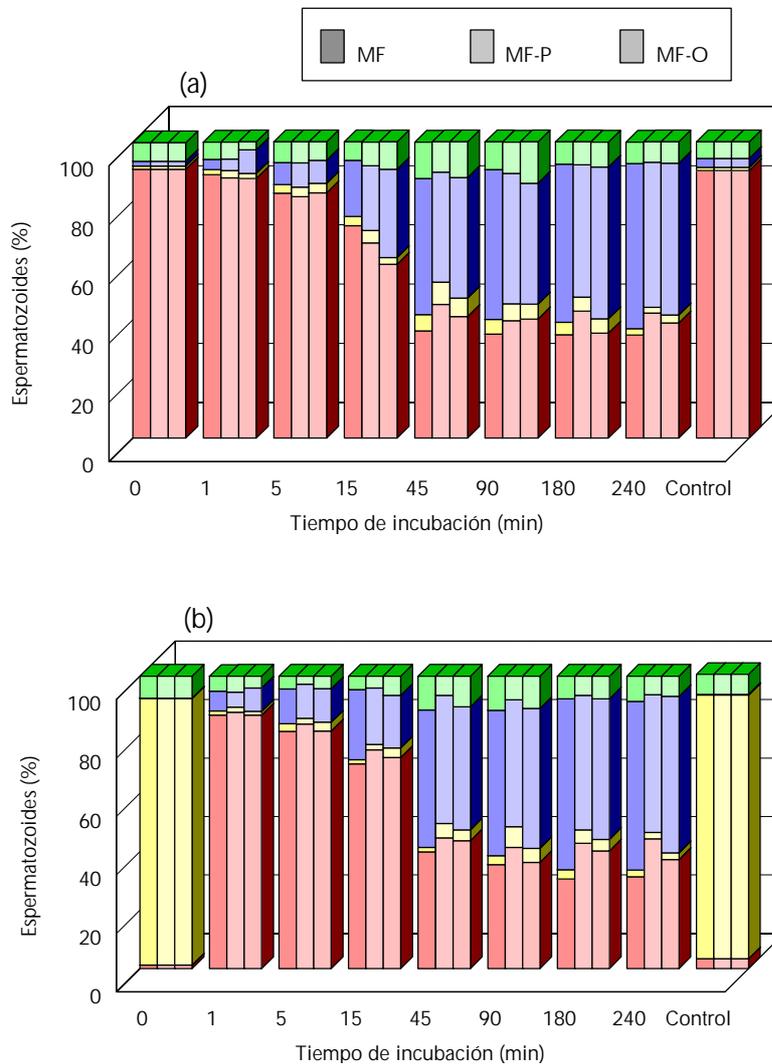


Figura 14. Evolución de las cuatro subpoblaciones espermáticas en medio de fecundación (MF), medio de fecundación con progesterona (MF-P) y en medio de fecundación con ovocitos (MF-O) en espermatozoides no lavados (a) y lavados (b), mediante la utilización de yoduro de propidio y ECA-FICT. Espermatozoides vivos negativos (↓), Espermatozoides vivos positivos (↓), Espermatozoides muertos negativos (↓) y espermatozoides muertos positivos (↓).

Además, hay que tener en cuenta que la positividad que se encuentra en los espermatozoides inmediatamente después del lavado en percoll, es menos acusada que la positividad que presentan los espermatozoides cuando se incuban en los distintos medios. Durante el periodo de incubación, los espermatozoides, lavados o no lavados, experimentan una evolución similar a la observada con la lectina PNA,

apareciendo de nuevo los valores más elevados de positividad a los 45 y 90 minutos de incubación en el medio MF-P (Figura 15; Tablas 10 y 11).

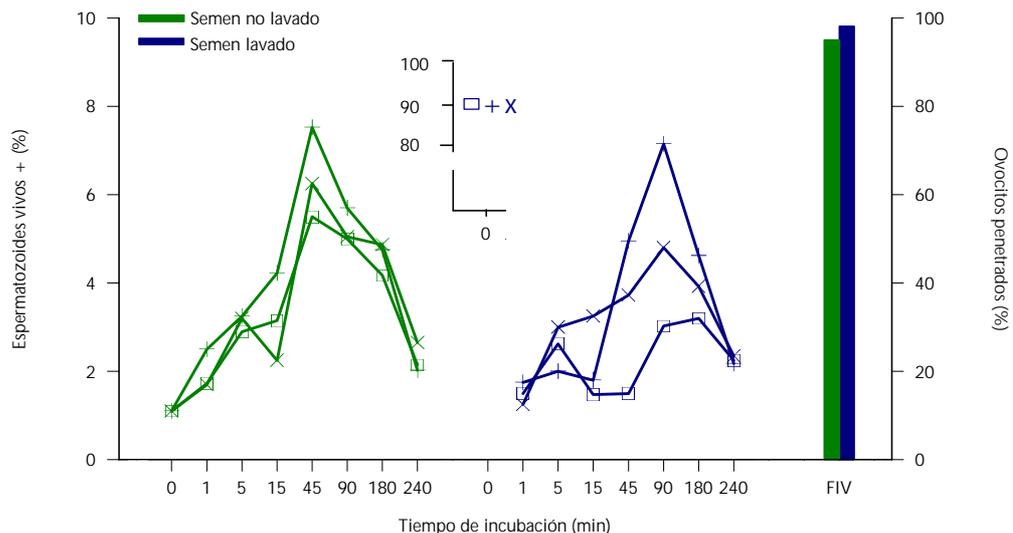


Figura 15.- Relación entre los porcentajes de espermatozoides vivos + al yoduro de propidio y ECA en los diferentes medios de incubación y las tasas de penetración in vitro. (□) MF; (+) MF-P; (X) MF-O.

Tabla 10. Valores obtenidos de espermatozoides no lavados, vivos positivos a la ECA, incubados en diferentes medios (X±SEM).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	1'12±0'20 ^a	1'12±0'20 ^a	1'12±0'20 ^a
1	1'72±0'21 ^{ab}	2'53±0'22 ^{ab}	1'72±0'21 ^{ab}
5	2'90±0'40 ^{abc}	3'22±0'44 ^{abc}	3'28±0'46 ^{bc}
15	3'15±0'25 ^{abc}	4'22±0'29 ^{bd}	2'25±0'23 ^{ab}
45	5'51±0'34 ^d	7'52±0'29 ^{ef}	6'25±0'44 ^d
90	5'00±0'53 ^d	5'75±0'31 ^{df}	5'05±0'17 ^{cd}
180	4'17±0'42 ^{cd}	4'75±0'18 ^{cd}	4'87±0'46 ^{cd}
240	2'15±0'30 ^{ab}	2'02±0'34 ^a	2'65±0'26 ^{ab}
Control	1'10±0'18 ^a	1'10±0'18 ^a	1'10±0'18 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (p<0'01).

Tabla 11 Valores obtenidos de espermatozoides lavados (percoll) vivos positivos a la ECA incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	91'25±0'62 ^a	91'25±0'62 ^a	91'25±0'62 ^a
1	1'52±0'20 ^b	1'75±0'23 ^b	1'25±0'33 ^b
5	2'62±0'24 ^b	2'00±0'16 ^b	3'00±0'18 ^{bc}
15	1'47±0'33 ^b	1'80±0'16 ^b	3'25±0'33 ^{bcd}
45	1'50±0'12 ^{b*}	4'95±0'68 ^{cd}	3'72±0'24 ^{cd}
90	3'02±0'30 ^b	7'15±0'63 ^{cd*}	4'89±0'44 ^c
180	3'21±0'32 ^b	4'62±0'38 ^c	3'92±0'45 ^{cd}
240	2'25±0'33 ^b	2'17±0'21 ^b	2'35±0'39 ^{bd}
Control	90'21±0'58 ^a	90'21±0'58 ^a	90'21±0'58 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0'01$).

Los valores dentro de una misma fila con * difieren significativamente ($p < 0'01$).

4.2.2.3.- SJA

Los resultados obtenidos para esta lectina se representan gráficamente en la figura 16. En la figura 17 se indica la evolución del porcentaje de espermatozoides vivos positivos a la lectina durante el periodo de incubación en los tres medios empleados. En las tablas 12 y 13 se pueden observar las diferencias significativas existentes entre los diferentes porcentajes de espermatozoides vivos positivos, en espermatozoides no lavados y lavados.

4.3.- Efecto del tratamiento espermático sobre los resultados de FIV

Un total de 404 ovocitos inmaduros fueron sometidos a maduración in vitro durante 46-48 horas. La tasa de ovocitos degenerados fue del 3'46% y los índices de maduración se situaron en 85'14% (Figura 18). No existieron diferencias significativas en el porcentaje de penetración obtenido tras la coincubación de dichos ovocitos maduros con espermatozoides no lavados o lavados (95'03 vs. 98'13, respectivamente). Los porcentajes de ovocitos polispermicos se situaron en torno al 96% en ambos tipos de espermatozoides y el número de espermatozoides

por ovocito penetrado fue de $10'59 \pm 0'5$ y $10'70 \pm 0'5$ utilizando espermatozoides no lavados y lavados, respectivamente.

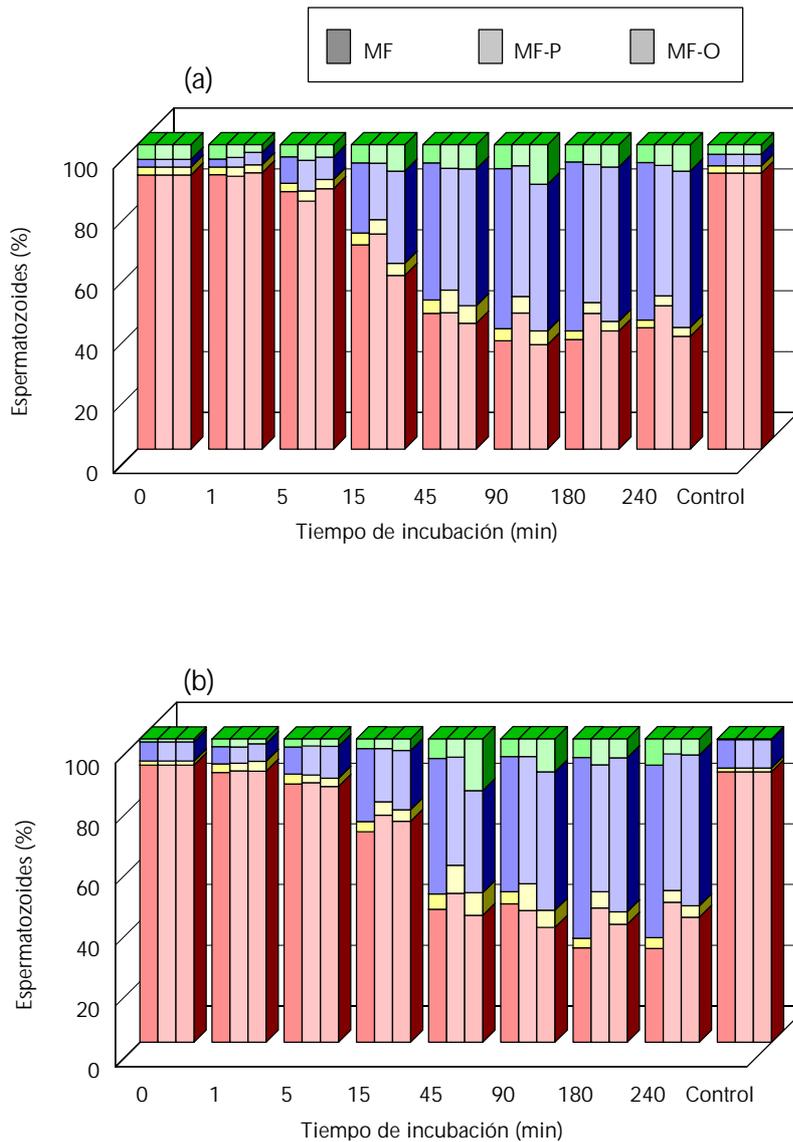


Figura 16. Evolución de las cuatro subpoblaciones espermáticas en medio de fecundación (MF), medio de fecundación con progesterona (MF-P) y en medio de fecundación con ovocitos (MF-O) en espermatozoides no lavados (a) y lavados (b), mediante la utilización de yoduro de propidio y SJA-FICT. Espermatozoides vivos negativos (↓), Espermatozoides vivos positivos (↓), Espermatozoides muertos negativos (↓) y espermatozoides muertos positivos (↓).

Tabla 12. Valores obtenidos de espermatozoides no lavados vivos positivos a la SJA incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	2'60±0'21 ^a	2'60±0'21 ^a	2'60±0'21 ^a
1	2'52±0'23 ^a	3'00±0'37 ^a	2'65±0'36 ^a
5	2'73±0'26 ^a	3'45±0'30 ^a	3'02±0'41 ^a
15	3'92±0'32 ^a	4'65±0'46 ^{ab}	4'00±0'50 ^{ab}
45	4'43±0'29 ^a	7'50±0'75 ^{bc*}	5'75±0'90 ^b
90	4'00±0'40 ^a	5'55±0'50 ^{ab}	4'50±0'44 ^{ab}
180	2'75±0'35 ^a	3'47±0'31 ^a	3'17±0'45 ^a
240	2'50±0'46 ^a	3'25±0'53 ^a	3'00±0'33 ^a
Control	2'38±0'38 ^a	2'38±0'38 ^a	2'38±0'38 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0'01$). Los valores dentro de una misma fila con * difieren significativamente ($p < 0'01$).

Tabla 13. Valores obtenidos de espermatozoides lavados (percoll) vivos positivos a la SJA incubados en diferentes medios ($X \pm SEM$).

Incubación (min)	Medio de incubación		
	MF	MF-P	MF-O
0	1'35±0'20 ^a	1'35±0'20 ^a	1'35±0'20 ^a
1	2'75±0'34 ^{ab}	2'52±0'24 ^{ab}	3'25±0'22 ^{ab}
5	3'25±0'25 ^{ac}	2'55±0'33 ^{ab}	2'75±0'21 ^{acd}
15	3'33±0'38 ^{ac}	4'42±0'70 ^{ab}	3'85±0'29 ^{ade}
45	5'10±0'55 ^{cde*}	9'25±1'01 ^c	7'50±0'36 ^f
90	3'95±0'39 ^{bcde}	8'82±0'78 ^{c*}	5'71±0'39 ^{bfg}
180	3'15±0'49 ^{ae}	5'37±0'63 ^b	4'07±0'39 ^{bcg}
240	3'55±0'42 ^{ae}	3'92±0'38 ^{ab}	3'75±0'42 ^{ae}
Control	1'28±0'29 ^a	1'28±0'29 ^a	1'28±0'29 ^a

MF: Medio de fecundación; MF-P: Medio de fecundación con progesterona; MF-O: Medio de fecundación con ovocitos.

Los valores dentro de una misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0'01$). Los valores dentro de una misma fila con * difieren significativamente ($p < 0'01$).

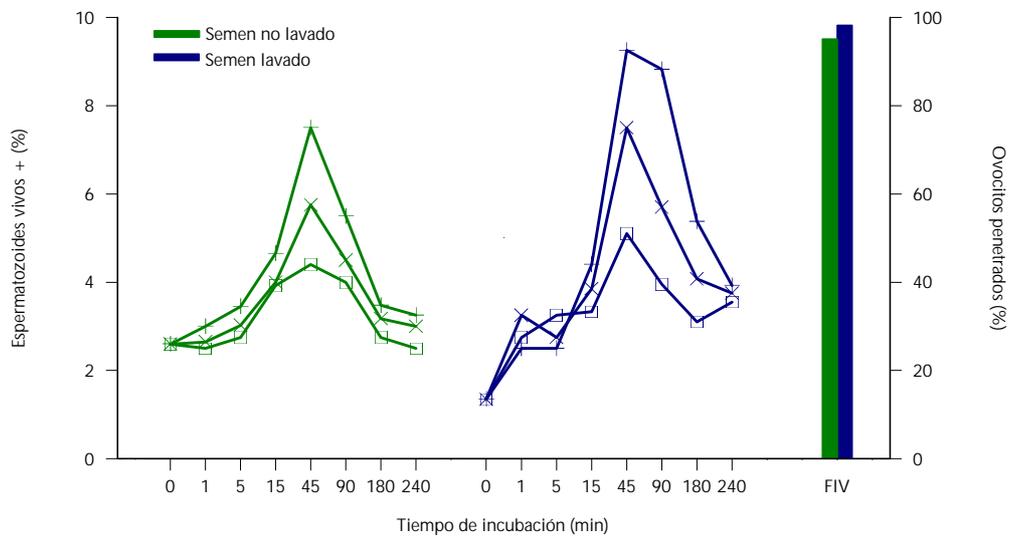


Figura 17.- Relación entre los porcentajes de espermatozoides vivos + al yoduro de propidio y SJA en los diferentes medios de incubación y las tasas de penetración in vitro. (□) MF; (+) MF-P; (X) MF-O.

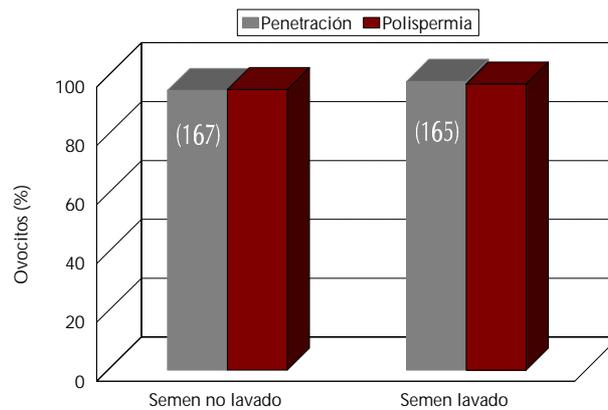


Figura 18.- Resultados obtenidos en la fecundación in vitro de ovocitos madurados in vitro con semen no lavado y semen lavado. Entre paréntesis figura el número de ovocitos maduros utilizados.

5.- DISCUSION

5.1. Estudio de la eficacia de la citometría de flujo en la evaluación de espermatozoides de verraco

La citometría de flujo es un instrumento que aporta nuevos datos al estudio de los espermatozoides ya que proporciona una medida rápida, multiparamétrica y objetiva de determinadas características de los espermatozoides que podrían estar relacionadas con el poder fecundante de los mismos (Shapiro, 1989). Además presenta la ventaja de estudiar miles de células en menos de 1 minuto cuando el sistema está calibrado correctamente. Graham et al. (1990) opinan en este sentido que el citómetro de flujo es un sistema que por primera vez permite estudiar espermatozoides sin fijar de un modo objetivo.

Debido a que el análisis de varianza realizado por Evenson y Thompson (1993) demostró que cuando los espermatozoides de verraco eran analizados mediante citometría de flujo, el animal era una fuente de variación significativa, compusimos para nuestro estudio un pool a partir de dos verracos que habían sido clasificados previamente como buenos mediante técnicas de fecundación in vitro con ovocitos inmaduros. Este pool está justificado cuando el análisis que se realiza tiene como objeto de estudio las propiedades generales de los espermatozoides, estudios del gameto femenino o la realización de un análisis del sistema de trabajo.

Sin embargo, aun cuando introducimos un pool de espermatozoides en el citómetro de flujo, la población que se genera en el monitor es heterogénea. Esto es debido a que, junto a los espermatozoide individualizados, otras partículas como restos celulares, espermatozoides aglutinados e incluso espermatozoides mal orientados aparecen en la pantalla. Por este motivo, y como generalmente se recomienda (Zuker et al., 1992 y Harrison et al., 1993) es necesario el realizar un primera selección de la población en función del tamaño celular (FSC).

A diferencia de lo que ocurre posteriormente al teñir los espermatozoides con fluorocromos, el tamaño y la densidad celular ofrece unos resultados asimétricos y demasiados extensos al representarlos en un histograma como también observan Molina et al. (1995). La generación de una ventana en la que se incluye la población celular principal, es decir, los espermatozoides, permite la disminución de esta heterogeneidad celular. Esta selección podría no utilizarse en el caso de estudios duales de vitalidad como es el caso de los trabajos de Garner y Jhonson (1995). Si se utiliza un fluorocromo verde para identificar los espermatozoides vivos y uno rojo para identificar los espermatozoides muertos, en principio, aquellas partículas que queden sin teñir corresponderán a restos del plasma seminal, principal contaminante de la muestra. Sin embargo, este sistema impide la utilización del FITC para determinar otras propiedades del espermatozoide.

El análisis de la vitalidad espermática mediante microscopía de fluorescencia, al igual que otro sistema óptico, es un método donde es necesario emplear tiempo en el conteo individualizado de los espermatozoides. Por este motivo, normalmente los análisis que se realizan son de pocas células. La citometría de flujo es capaz de medir, como hemos descrito anteriormente, miles de espermatozoides teñidos en un minuto y con un mínimo de manipulación. El fluorocromo utilizado para diferenciar entre vivos y muertos debía elegirse en base a dos razones. En primer lugar a que fuera un fluorocromo capaz de diferenciar de forma nítida entre espermatozoides de verraco vivos y muertos y en segundo lugar por la fluorescencia que desprendiera ya que una fluorescencia roja permitiría realizar incubaciones simultáneas con FITC de modo que se podrían detectar dos propiedades espermáticas al mismo tiempo.

El YP es un fluorocromo que no es capaz de pasar a través de las membranas intactas debido a su tamaño molecular pero por el contrario es capaz de fijarse a los núcleos de las células degeneradas (Garner et al., 1986; Harrison y Vicker, 1988). Además, hemos observado que, a diferencia de otros tipos de células, el yoduro de propidio tiñe de forma casi inmediata a los espermatozoides de verraco al igual que sucede en espermatozoides de otras especies (Myazaky et al., 1990).

De este modo, el resultado que se obtiene mediante citometría de flujo ofrece dos picos claramente definidos. El primero que corresponde a los espermatozoides vivos, es decir a aquellos espermatozoides que no están teñidos por el YP y el segundo, más desplazado en el eje FL-2 que corresponde a aquella población de espermatozoides muertos, es decir, aquellos espermatozoides que se han teñido con el YP.

Keeler et al (1983) observaron un tercer pico de muy poca fluorescencia que, según estos autores, correspondía a partículas contaminantes. Sin embargo, otros autores (Morrell, 1991) atribuyen este tercer pico, localizado entre la población positiva y la población negativa, a una población de espermatozoides subviables que podría estar relacionada con la fertilidad del eyaculado. En nuestro estudio con espermatozoides sin incubar, el número de células en zonas intermedias fue prácticamente nulo. Sin embargo, a medida que la incubación se realizaba, la aparición de una fase de transición entre los dos picos fue más manifiesta, hecho que lo atribuimos a la muerte del espermatozoide y la incorporación de YP de forma proporcional a la lesión que presenta en la membrana nuclear.

Cuando se analizan los resultados obtenidos mediante citometría de flujo con muestras conocidas de espermatozoides vivos y muertos observamos que las diferencias entre espermatozoides observados y esperados no presentaron, en ningún caso, significación estadística. Resultados similares son también obtenidos por Graham et al. (1990) y Garner et al (1994) cuando utilizan espermatozoides de diferentes especies.

Cuando comparamos los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia observamos que, aunque los resultados están próximos y no existen diferencias detectadas mediante métodos estadísticos, los resultados no son exactamente los mismos. Esto es debido posiblemente a factores como la diferente capacidad del ojo humano y el sensor del citómetro de flujo de detectar una célula teñida, del tiempo que están los espermatozoides sobre el

portaobjetos en el caso del microscopio y el tiempo que pasan en el tubo del citómetro (siempre menor) y por último del número de células contadas que aunque en este estudio el número de espermatozoides analizados mediante microscopía de fluorescencia fue alto (300 espermatozoides), el número de células contadas en el citómetro de flujo fue siempre, al menos, de 2000. En este sentido, Centola et al (1990) afirman que cuando se realizan pruebas entre diferentes observadores en el análisis de espermatozoides muertos, el grado de sensibilidad de detectar el YP varía entre analistas. Ya Corsetti et al., (1987) afirmaban que era necesario utilizar sistemas de análisis automáticos de vitalidad para aumentar la precisión y la exactitud inter e intraensayo.

En cuanto a espermatozoides incubados en los cuales la permeabilización que se produce durante la reacción acrosómica pudiera interactuar mostrando espermatozoides muertos con YP cuando en realidad están vivos, Graham et al (1990) observaron que la proporción de espermatozoides reaccionados no estaba sobrestimada cuando este método se compara con otros de viabilidad celular. Esto se debe a que el YP parece entrar al compartimento nuclear a través de poros que se localizan en la membrana nuclear y que se sitúan en el divertículo o pliegues de la membrana en la parte posterior de la cabeza cerca de la fosa de implantación (Oko et al., 1976).

La reacción acrosómica es una característica fundamental en la evaluación de la función espermática como ha quedado descrito en la revisión bibliográfica. Aunque existen técnicas que permiten determinar esta reacción en espermatozoides de verraco (Vázquez et al., 1992) se hace necesario el obtener otras técnicas que sobre todo, sean más rápidas en su ejecución que las existentes al tiempo que sea posible utilizarlas en espermatozoides sin fijar, es decir, en espermatozoides vivos. Al igual que podemos identificar mediante citometría de flujo los espermatozoides vivos y muertos teñidos con YP, la identificación del acrosoma se basa en el marcaje del mismo mediante alguna partícula a la que se une específicamente esta estructura (lectina, anticuerpo, neoglucoconjugado) al que a su vez se encuentre

unidas diversas moléculas de isotiocianato de fluoresceína que permita ser detectada con otro canal del citómetro de flujo.

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 se encontrara reaccionando, bien como consecuencia de una verdadera reacción acrosómica, bien como consecuencia de una reacción acrosómica degenerativa, debido a la muerte celular (Bedford, 1970). Por este motivo, se hace necesario combinar los resultados que se obtienen para PNA con los resultados que se obtienen para vitalidad que, en nuestro estudio, es analizada mediante el marcaje al YP. La ventaja que presentan estos dos fluorocromos se debe a que con una excitación realizada por un único rayo láser de argón (con la misma longitud de onda) eliminan una fluorescencia de diferente color (roja para el YP y verde para el FITC). Tras el análisis mediante citometría de flujo se pueden catalogar 4 subpoblaciones en función de la posición espacial que ocupaban debido a su fluorescencia: 1) espermatozoides vivos negativos a FITC que se disponen en el cuadrante inferior izquierdo; 2) espermatozoides vivos positivos a FITC dispuestos en el cuadrante inferior derecho; 3) espermatozoides muertos negativos a FITC dispuestos en el cuadrante superior izquierdo y 4) espermatozoides muertos positivos a FITC dispuestos en el cuadrante superior derecho. Esta disposición espacial permite analizar de un modo rápido y eficaz los espermatozoides reaccionantes, de tanta importancia en el análisis de los procesos de capacitación y reacción acrosómica. Miyazaki et al. (1990) observaron en espermatozoides humanos que el análisis de la verdadera reacción acrosómica mediante citometría de flujo era el método más exacto, rápido y simple de evaluar este proceso.

El análisis realizado mediante microscopía de fluorescencia se ha basado en las descripciones previas que hicieron Centola et al. (1990) utilizando espermatozoides humanos. Al igual que sucede en la excitación de los dos

fluorocromos por un mismo láser en el citómetro de flujo, el YP y la FITC pueden ser leídas simultáneamente en un microscopio de fluorescencia utilizando un mismo filtro que excite la luz a una misma longitud de onda que en nuestro caso fue de 510 nm. De este modo se podían analizar cuatro tipos de espermatozoides: espermatozoide vivos con o sin acrosoma; espermatozoides vivos reaccionando; espermatozoides muertos con o sin acrosoma y espermatozoides muertos reaccionando. Estos mismos resultados han sido obtenidos por Renard et al (1995) empleando el anticuerpo GB-24 en sustitución de la lectina.

Cuando comparamos los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia observamos que, aunque no aparecen diferencias estadísticamente significativas, los resultados entre ambos métodos vuelven a no ser exactamente los mismos. En nuestra opinión, el tiempo que pasa el espermatozoide sobre el portaobjetos durante el recuento y el número de células contadas podría llevar, en ocasiones, a encontrar incluso diferencias significativas entre ambos procedimientos.

Además de la PNA, en la bibliografía se recogen otras lectinas que han sido utilizadas en los estudios de capacitación y reacción acrosómica en diferentes especies domésticas (Lee y Ahuja, 1987; Vázquez et al., 1996). Sin embargo, cuando se utilizan lectinas en espermatozoides vivos para su estudio en citometría de flujo, se genera una nueva problemática metodológica sin importancia cuando las lecturas se hacen sobre extensiones en portaobjetos de espermatozoides fijados o sin fijar. Se sabe que algunas lectinas son tóxicas sobre las células (Asworth et al., 1995). De hecho, estos autores demuestran en espermatozoides de verraco que al menos, la mitad de las lectinas que utilizan son tóxicas para las células en los 30 minutos siguientes a la incubación, aumentando de modo significativo el porcentaje de espermatozoides muertos.

Por tanto, para los estudios de citometría de flujo se deben utilizar lectinas que sean buenas marcadoras de las glicoproteínas que sean de interés al tiempo

que no deben ser tóxicas para las células. El tiempo ensayado en nuestro experimento ha sido de 10 minutos, tiempo suficiente para hacer la lectura en el citómetro. Además, hemos observado como la máxima unión de la lectina al espermatozoide se produce antes de los 5 minutos de incubación. No hemos observado que las lectinas PNA, ECA y SJA, elegidas para nuestro estudio, afecten a la vitalidad de los espermatozoides durante los primeros 240 minutos de incubación en M-199. Estos resultados son similares a los obtenidos por Asworth et al. (1995) con tiempos de ensayo más cortos.

Parece recomendable, por tanto, realizar este tipo de ensayo siempre que las condiciones de estudio no sean idénticas a las descritas por otros autores ya que variaciones en la especie, el medio de cultivo, el tiempo de incubación, la concentración y el tipo de lectina pueden afectar a la vitalidad y por tanto modificar el grado de lesión que las lectinas pueden producir sobre los espermatozoides con lo que los resultados se pueden ver alterados.

5.2.- Detección mediante citometría de flujo de los cambios que experimentan los espermatozoides de verraco lavados y no lavados en diferentes medios de incubación

Cuando se analiza la viabilidad espermática durante la incubación en los diferentes medios, se observa que existe un porcentaje elevado de espermatozoides en las placas de incubación que mueren entre los 15 y los 45 minutos. Tras este tiempo, la población de espermatozoides permanece constante produciéndose una muerte celular más atenuada en cuanto al incremento de células muertas.

La dilución que se realiza sobre los espermatozoides podría ser una de las causas de la muerte celular ya que la concentración espermática que pasa en breves segundos de $4-5 \times 10^8$ a 5×10^5 espermatozoides/ml, afecta significativamente al porcentaje de espermatozoides vivos que se encuentran en la población, aun en presencia de componentes previsiblemente protectores como el BSA (Harrison et

al.,1978), lactato, piruvato, fosfatos y Mg^{2+} (Asworth et al., 1994) . Además, en nuestro experimento se observa cómo a los 45 minutos el porcentaje de espermatozoides muertos es bastante superior al obtenido por Vázquez et al. (1993) cuando incuban bajo condiciones similares los espermatozoides de verraco a 2×10^8 células/ml. Además, en una experiencia complementaria, observamos que bajo las mismas condiciones de incubación, mientras que a una concentración de 2×10^8 espermatozoides/ml no se producía apenas muerte espermática, a una concentración de 5×10^5 espermatozoides/ml la muerte era evidente. El problema de cómo afecta la dilución a los espermatozoides es un problema estudiado desde hace años (Mann, 1964). De hecho, como observamos en nuestro trabajo, aunque se detecta un inmediato efecto estimulante del medio sobre los espermatozoides, en general hay un gran grupo de células que muere rápidamente.

Harrison et al. (1982) opinan que, cuando los medios de dilución no contienen proteínas se produce una unión de los espermatozoides vivos a la superficie de la placa donde se encuentren, los resultados en el incremento de los espermatozoides muertos podría ser debido a un problema de la técnica no contándose los espermatozoides unidos a la superficie. En nuestro caso, aunque la concentración de proteínas es lo suficientemente alta para minimizar este proceso (12% de FCS) se realizó la extracción de los espermatozoides desde las placas después haberlas agitado 10 veces con una pipeta de 1 ml. Además, se comprobaron las placas posteriormente para verificar que se producía la desunión de los espermatozoides al fondo de la misma. Ashworth et al (1994) observan con espermatozoides de morueco que la pérdida de vitalidad por dilución es un hecho real y no un artefacto de la técnica. Además estos autores observan que no existe ningún efecto protector cuando se añade BSA o FSC al medio. Incluso cuando se añade plasma seminal de otra especie. Sin embargo, estos autores no han observado una pérdida de viabilidad celular en los espermatozoides de verraco incubados en un medio Tyrode, aunque la concentración de espermatozoides que utilizan para el estudio es de 10^7 espermatozoides/ml, concentración muy superior a la que se ha empleado en este experimento.

Aunque tradicionalmente se ha atribuido este hecho a una pérdida del plasma seminal, se ha observado que la sustitución de algunos componentes por otros, aumenta el porcentaje de espermatozoides vivos durante la incubación (Asworth et al., 1994). Este hecho se atribuye a la fuerza iónica que existe en el medio. Es posible que los constituyentes del medio modulen la arquitectura de la membrana plasmática. De este modo Bredderman y Foote (1971) observan como el Ca^{2+} y el EDTA estabilizan las membranas de los espermatozoides de toro. En este sentido, hemos observado que en el medio que contiene progesterona el porcentaje de espermatozoides vivos es superior al medio que no contiene esta hormona. Es posible que la progesterona, la cual presenta una acción específica sobre la membrana plasmática de los espermatozoides (Tesarik et al., 1993), tenga alguna acción sobre la arquitectura lipídica que prevenga, en algunos espermatozoides, la muerte prematura. Cuando se analizan los resultados obtenidos con medios que contiene ovocitos, los resultados de vitalidad que se obtienen quedan entre los otros dos tipos de medios, posiblemente debido a la progesterona que se localiza en las células del cumulus (Osman et al., 1989) y que, evidentemente, va a quedar diluida en el medio de incubación. En este sentido, Parinaud et al. (1992) observan en espermatozoides humanos que la adición de progesterona al medio donde se encuentren los espermatozoides previene la viabilidad celular.

Es importante también señalar que el medio utilizado contiene una concentración de bicarbonato de 25 mM. Harrison et al. (1993) demuestra que cuando el medio 199 contiene 15 mM de bicarbonato, el porcentaje de espermatozoides vivos a las 6 horas de cocultivo es del 30% frente al 70% de espermatozoides vivos que aparece en el medio 199 con Hepes. Es posible que el bicarbonato estimule a los espermatozoides a un proceso (¿capacitación?) cuyo final sea la muerte del espermatozoide y que por tanto, se produzca más rápidamente en medios que contiene bicarbonato que en medios que no lo contienen. Sin embargo, estos autores no analizan cuando se produce la muerte celular y por qué se produce tan rápidamente en una población constante.

Una de las deducciones que se podría obtener de los resultados es la existencia de dos grandes subpoblaciones espermáticas, la primera que estaría compuesta por espermatozoides capaces de resistir la gran dilución inicial de los espermatozoides en M199 con bicarbonato y una segunda población que, aun estando vivos al comienzo del estudio, mueren rápidamente como consecuencia de la dilución que se les realiza.

Por último, en nuestros experimentos no hemos observado ninguna diferencia entre los resultados de vitalidad obtenidos con espermatozoides sin lavar y aquellos espermatozoides que fueron lavados en percoll. Aunque podríamos asumir que los lavados en Percoll no causan ningún tipo de alteración espermática en la mayoría de las especies (Miyake et al., 1989; Ford et al., 1992; Harrison et al., 1993), Asworth et al (1994) observaron que los lavados en Percoll y posterior dilución tenían un efecto perjudicial sobre la vitalidad de los espermatozoides incubados atribuyendo este hecho a que las partículas de sílice cubiertas de polivinilpirrolidona que constituyen el percoll, podrían competir con partículas de cubierta de los espermatozoides, desnudando a los mismos y desestabilizando rápidamente las membranas plasmáticas. Resultados obtenidos en nuestro experimento con ECA apoyan, en parte, esta hipótesis.

La utilización de las lectinas como marcadores de la membrana en los estudios de capacitación in vitro y reacción acrosómica es algo que se ha venido utilizando desde hace años (Kashiwabara et al., 1965; Töpfer-Petersen et al., 1984; Vázquez et al., 1993; Vázquez et al., 1996). Se han observado modificaciones durante la capacitación en los espermatozoides de ratas (Lewin et al., 1979), de conejos (Gordon et al., 1975), de hámster (Ahuja, 1982), de morueco (Courstens y Fournier-Delpech, 1979), de verracos (Auluwaliae et al., 1990; Asworth et al., 1995) y humanos (Cross y Overtreet, 1987). Sin embargo, uno de los aspectos más importantes que se observa cuando se analiza la bibliografía es la disparidad metodológica entre los diferentes autores. La consecuencia de tener que preparar extensiones sobre portaobjetos, de fijar o permeabilizar a las células, del tipo de

fijador utilizado, de utilizar lectinas unidas a unos marcadores o a otros, ha tenido como consecuencia diferentes resultados con similares lectinas que, evidentemente, confunden más que aportan información sobre el proceso de capacitación. Estas modificaciones se deben a que en ocasiones se marca la membrana plasmática, o el interior del acrosoma, o la membrana acrosomal interna así como por el tipo de fijador utilizado.

Por tanto, la posibilidad de utilizar lectinas que no son tóxicas para los espermatozoides en un medio de cultivo donde la célula permanece viable, ofrece un nuevo sistema para estudiar y revelar, en ocasiones, resultados de capacitación y reacción acrosómica in vitro obtenidos con otros métodos.

Las lectinas estudiadas en este trabajo han sido la ECA, la SJA y la PNA. La ECA es una lectina específica de β -D-gal-(1-4)-D-glcNAc. Los estudios con microscopía de fluorescencia han demostrado que en espermatozoides eyaculados de verraco, se observa una unión muy débil a la lectina mientras que las células permeabilizadas presentan un acrosoma muy fluorescente y otros componentes con fluorescencia media (Asworth et al., 1995). La SJA, específica de β -D-gal-NAc > β -D-gal, es una lectina que se manifiesta sobre el espermatozoide intacto de forma muy débil mientras que en células permeabilizadas presenta una fluorescencia muy importante sobre el acrosoma. También se ha utilizado la PNA, específica de β -D-gal-(1-3)-D-glcNA. Esta lectina es muy débil en células normales y produce una gran fluorescencia sobre los acrosomas permeabilizados.

La elección de estas lectinas se realizó en primer lugar por su inocuidad, ya que ninguna de ellas se manifestaba como tóxica para el espermatozoide en los tiempos utilizados y en segundo lugar por los trabajos previos de Vázquez et al. (1993) y Asworth et al (1995) donde se demostraba que se producían modificaciones de las mismas durante la incubación in vitro de los espermatozoides de verraco.

Del análisis de nuestros resultados se observa, en primer lugar, que la respuesta de los espermatozoides ante los mismos estímulos no es similar. Existe una manifiesta heterogeneidad funcional de los espermatozoides de verraco que puede estar originada en los diferentes estados de maduración y/o activación de los espermatozoides. El tiempo que necesitan los espermatozoides para experimentar la reacción acrosómica bajo las mismas condiciones va a depender de cada una de las células. Este concepto envuelve procesos dependientes del tiempo y es determinante en cuanto al estudio de los cambios que experimentan las subpoblaciones con el tiempo como también describe Watson (1995).

Las tres lectinas muestran cambios de la población de los espermatozoides durante la incubación en los tres medios estudiados. En general el patrón de evolución ha sido similar en las tres lectinas utilizadas y los tres tipos de medios, detectándose durante la incubación un incremento en el grupo de espermatozoides vivos altamente positivos, que se corresponden a espermatozoides vivos reaccionando, es decir, que en el momento del análisis se estaba liberando el contenido del acrosoma. Sin embargo, antes de que ocurrieran estas modificaciones, solamente la ECA detectó un cambio evidente en toda la población de espermatozoides vivos tras el lavado a través de Percoll que consistió en un aumento de la reactividad a la lectina. En ocasiones se ha sugerido que los lavados en percoll podrían estar relacionados con inducciones de la capacitación de los espermatozoides (Berger y Parker, 1989). Asworth et al (1994) apoyan la hipótesis de que los lavados en percoll y posterior dilución espermática pueden tener un efecto perjudicial sobre la vitalidad de los espermatozoides incubados atribuyendo este hecho a que las partículas de sílice cubiertas de polivinilpirrolidona que constituyen el percoll, podrían competir con partículas de cubierta de los espermatozoides. Grant et al. (1994) observan que en los espermatozoides de verraco lavados en percoll se produce una reacción acrosómica más rápida que en los lavados en solución salina, apareciendo un 21% de espermatozoides reaccionados a la hora de incubación mientras que los lavados en salina tenían solamente un 9%. Los resultados confluían a las tres horas, mostrando un 24% y un 22% para percoll y lavados en salina respectivamente. Sin embargo, en nuestro

estudio, no hemos encontrado diferencias entre los espermatozoides lavados y no lavados en cuanto a su vitalidad posterior. Por el contrario, Carver-Ward et al. (1994) demostraron que los espermatozoides humanos separados en percoll presentaban un porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica más bajo que el obtenido por swim-up, concluyendo que el percoll puede eliminar a los espermatozoides que presentaban reacciones acrosómicas muy rápidas y que por tanto no iban a fecundar a los ovocitos.

Esta población de espermatozoides positivos a la ECA se transforma, de nuevo, en negativa en los primeros minutos de incubación en cualquiera de los tres medios estudiados. Esta nueva modificación puede ser consecuencia de algún componente del medio ya que, por ejemplo, Harrison et al (Harrison et al., 1993a) han observado que si se utiliza una sonda de merocianina para estudiar la arquitectura de membrana, ésta se modifica casi en la totalidad de los espermatozoides en un periodo de 200 segundos después de la adición de bicarbonato. Asworth et al (1995) observa una transformación de espermatozoide positivo a espermatozoide negativo mucho más lenta que la que obtenemos nosotros. Sin embargo, estos autores utilizan medio Tyrode con 15 mM de bicarbonato, con lo que los procesos que acontecen en los espermatozoides podrían ocurrir de forma más lenta.

Excepto esta alteración espermática que puede atribuirse a la superficie de la membrana plasmática, el resto de las modificaciones de las lectinas que hemos obtenido en nuestro estudio podrían atribuirse a reacciones acrosómicas en los espermatozoides. Esta deducción se basa en que los porcentajes de espermatozoides reaccionados con la SJA y la ECA son similares a los porcentajes obtenidos con PNA y se sabe que esta lectina se une de modo específico al interior del acrosoma (Mortimer et al., 1987; Vázquez et al., 1993). En general, los máximos porcentajes de espermatozoides reaccionantes se obtienen entre los 45 y los 90 minutos de incubación. Sin embargo, se sabe que las primeras evidencias de que los espermatozoides de verraco hayan penetrado a los ovocitos se produce a las 3

horas de coincubación (Martínez et al., 1996; Yoshida et al., 1993 etc.). Por tanto, es necesario explicar si son los espermatozoides que reaccionan entre los 45 y los 90 minutos los que pueden penetrar a los ovocitos, con lo que el proceso en si desde que se inicia la reacción acrosómica hasta que penetran sería un proceso largo (1'5 horas), o bien si son los espermatozoides que reaccionan más tarde, aunque en menor número, los que penetran a los ovocitos. Didion y Graves (1986) indican que la reacción acrosómica es un proceso rápido en el tiempo (10-12 minutos en el caso del toro) y que la vida media del espermatozoide reaccionado es corta debido, principalmente, a las condiciones fisiológicas a las que está sometido (Kusunoki et al., 1990).

Vázquez et al (1993) observan, utilizando condiciones similares de estudio, que el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica obtenidos mediante la técnica de la triple tinción modificada para espermatozoides de verraco (Vázquez e tal., 1992) es próximo al 15% sobre las 2-4 horas de coincubación. Sin embargo hay que tener en cuenta que este porcentaje corresponde tanto a espermatozoides reaccionantes como reaccionados, a diferencia de nuestro estudio que analiza espermatozoides reaccionantes exclusivamente. Esto significaría que existe una población de espermatozoides reaccionados que permanecería viva durante bastantes minutos, a diferencia de lo observado por Kusunoki et al. (1990) en espermatozoides de macho cabrío. Takashashi et al (1992) también observan que cuando analizan espermatozoides de hombres fértiles, el porcentaje de espermatozoides reaccionados a las 4 horas es aproximadamente del 10-12%. Mattioli et al (1996) observan como a los 90 minutos de incubación se obtiene hasta el 30% de los espermatozoides capacitados mediante la evaluación con clortetraciclina. Sin embargo, el problema que presenta la técnica de la clortetraciclina con espermatozoides de verraco se debe a que los espermatozoides reaccionados y los no capacitados presentan el mismo patrón de fluorescencia con lo que solamente es posible estimar la población de capacitados.

Cuando analizamos los resultados en función del medio utilizado observamos que los niveles más altos de verdadera reacción acrosómica se obtienen en el medio que contiene progesterona. Brucker et al. (1994) observan que el porcentaje de espermatozoides humanos reaccionados con $1\mu\text{M}$ de progesterona y el espontáneo eran similares observando las primeras diferencias a partir de las 6 horas de coincubación. En nuestro estudio observamos las diferencias a los 90 minutos utilizando $3\mu\text{M}$ de progesterona con un 7% de reaccionados frente a un 3% del espontáneo. Melendrez et al (1994) observaron que cuando añaden la progesterona ($3\mu\text{M}$) a espermatozoides capacitados aparecen un 15% de espermatozoides reaccionados frente a un 7% del control sin progesterona. Sin embargo, en este caso no analiza espermatozoides reaccionantes sino reaccionantes y reaccionados. Aun bajo estas condiciones duplica, como en nuestro caso, el valor del reaccionado con progesterona frente al espontáneo.

Por último, los resultados obtenidos en las incubaciones con los ovocitos ofrecen unos resultados de reacción acrosómica superiores a los obtenidos de forma espontánea pero inferiores a los obtenidos con el medio que contenía progesterona. Estos resultados podrían sostenerse mediante una hipótesis que justificara en el medio la presencia de alguna/s sustancia que provocaran una inducción de la reacción acrosómica. Estos resultados también han sido observados por Stock et al (1989) en espermatozoides humanos y podrían ser debidos a la progesterona que se produce desde las células del cumulus de los ovocitos maduros (Tesarik, 1985).

Finalmente, para comprobar que las inducciones de la capacitación in vitro se realizaban de un modo adecuado, dispusimos de un sistema para evaluar las penetraciones, tanto en espermatozoides no lavados como lavados con percoll, utilizando ovocitos homólogos madurados in vitro. Bajo nuestras condiciones experimentales, no apreciamos ninguna diferencia entre ambos tipos de espermatozoides en cuanto a las características de penetración que presentan. En este sentido Siegel y Haynie (1994) observan con espermatozoides humanos que el porcentaje de espermatozoides lavados con percoll y preparados mediante una

técnica de swim-up que penetran en ovocitos de hámster es similar y sólo en el caso que el eyaculado sea patológico esta justificado la utilización de percoll. Seidel et al (1995), tampoco observan diferencias entre los porcentajes de penetración y división embrionaria utilizando espermatozoides de toro seleccionados por percoll, columnas de albúmina sérica bovina o swim-up.

Por el contrario también se ha observado que los espermatozoides de verraco lavados a través de percoll penetran más a los ovocitos de hámster sin zona pelúcida que los preparados por dilución (Berger y Horton, 1988) o por swim-up (Berger y Parker, 1989). Grant et al. (1994) demuestran que los espermatozoides de verraco lavados en dos gradientes de percoll tienen unas tasas de penetración superiores a los espermatozoides concentrados en TALP (porcentaje de división embrionaria: 60% vs. 11'5%) así como los porcentajes de polispermia (37'5% vs. 4'5%). Sin embargo, los resultados de penetración obtenidos por estos autores para espermatozoides concentrados son muy bajos si se comparan con los obtenidos por Martínez et al.(1996) utilizando el M199 en vez del TALP como medio de fecundación (91'3%). En nuestro estudio, al igual que no encontramos este efecto beneficioso descrito por estos autores para el percoll, tampoco hemos encontrado el efecto perjudicial que obtiene Asworth et al.(1994) cuando lava los espermatozoides de morueco a través de un doble gradiente de percoll. En cualquiera de los casos, el efecto del percoll sobre los espermatozoides sigue sin ser estudiado y podría depender del macho ya que Parrish et al (1995) observa que la diferencia en la penetración de espermatozoides de toro lavados por percoll o seleccionados con swim-up depende del toro y no del procedimiento de lavado. De este modo, en machos que presentaran una pobre calidad seminal podría ser beneficioso la utilización del percoll mientras que en machos que presentaran una calidad seminal buena (como ha sido el caso de los verracos de nuestro experimento) el percoll no mejoraría las tasas de penetración.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- La citometría de flujo es una técnica objetiva, rápida y exacta en el análisis de los espermatozoides de verraco en suspensión teñidos con yoduro de propidio e isotiocianato de fluoresceína.
- 2.- Existe una muerte espermática prematura durante la incubación in vitro en TCM199, aunque la adición de progesterona al medio preserva la viabilidad de una parte de la población.
- 3.- La progesterona induce la reacción acrosómica de los espermatozoides de verraco incubados en TCM199.
- 4.- Los máximos porcentajes de espermatozoides vivos reaccionantes se obtienen entre los 45 y los 90 minutos de incubación en TCM199, independientemente del tipo de suplemento utilizado.
- 5.- Existe una respuesta similar en cuanto al número de espermatozoides reaccionantes y las tasas de penetración in vitro de ovocitos madurados in vitro tanto en espermatozoides lavados en percoll como en los no lavados.

7.- ABREVIATURAS

AM		Anormalidades Morfológicas
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	Albumina Sérica Bovina
BTS	<i>Beltsville Tampon Solution</i>	
CF		Citometría de Flujo
DMSO		Dimetil Sulfoxido
DPBSm		
ECA	<i>Erythrina Cristagalli Agglutinin</i>	
eCG	<i>Equine Corionis Gonadotrophin</i>	Gonadotropina Coriónica Equina
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	Suero Fetal de Ternera
FFp		Fluido Folículo Porcino
FITC	<i>Fluorescein Isotiocianate</i>	Isotiocianato de Fluoresceina
FIV		Fecundación in vitro
FL		Registro de Fluorescencia
FR		Fracción rica
FSC	<i>Forward Scatter</i>	
hCG	<i>Human Corionic Gonadotrophin</i>	Gonadotrofina Coriónica Humana
IMP		Integridad de la membrana plasmática
MF		Medio de Fecundación
MFI		Microscopía de Fluorescencia
MF-O		Medio de Fecundación con Ovocitos
MF-P		Medio de Fecundación con Progesterona
min		minutos
MNR		Muertos no Reaccionantes
MP		Motilidad Progresiva
MR		Muertos Reaccionantes
MW		Medio de Maduración in vitro
NAR	<i>Normal Apical Ridge</i>	Borde Apical Normal
PNA	<i>Arachis hypogaea agglutinin</i>	
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>	Solución Tamponada de Fosfatos

SJA	<i>Shigella Japonica Agglutinin</i>	
SEM		Media del error estandar
SSC	<i>Side Scatter</i>	
TALP		Medio Tyrode Suplementado
VNR		Vivos no Reaccionantes
VR		Vivos Reaccionantes
YP		Yoduro de Propidio
ZP		Zona Pelúcida

8.- BIBLIOGRAFIA

- AHLUWALIA, B., FARHORI, P., JAMUAR, M., BACCETTI, B. Y ANDERSON, W.A. (1990).** Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 22: 53-62.
- AHUJA, K.K. (1982).** Fertilization studies in the hamster. Exp. Cell Res., 140: 353-362.
- ASHWORTH, P.J., HARRISON, R.A., MILLER, N.G., PLUMMER, J.M., Y WATSON, P.F.. (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.
- ASHWORTH, P.J., HARRISON, R.A., MILLER, N.G., PLUMMER, J.M., Y WATSON, P.F.. (1995).** Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. Mol. Reprod. Dev., 40:164-176.
- AUGER, J., LEONCE, S., JOUANNET, P., Y RONOT, X.. (1993).** Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. J. Histochem. Cytochem., 41:1247-1251.
- AUSTIN, C.R. Y BISHOP, M.W.H. (1958).** Role of the rodent and acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 149: 241-248.
- BACCETTI, B., BAGUARDI, E., BERRUTI, G. (1978).** The cell surface during mammalian spermiogenesis. Dev. Biol., 63: 187-196.
- BARBONI, B., MATTIOLI, M., Y SEREN, E.. (1995).** Influence of progesterone on boar sperm capacitation. J. Endocrinol., 144:13-18.
- BEDFORD, J.M. (1970).** Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. (Suppl.), 2: 128-158.

- BERGER, T. (1990).** Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. Theriogenology, 33: 689-695.
- BERGER, T. Y HORTON, M.B. (1988).** Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. Game Res. , 19: 101-111.
- BERGER, T Y 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.
- BREDDERMAN, P.J. Y FOOTE, R.H. (1971).** Factors stabilizing bulls sperm cells volume and prolonging motility at high dilution. Exp. Cell. Res., 66: 458-464.
- BRUCKER, C., KASSNER, G., LOSER, C., HINRICHSEN, M., Y LIPFORD, G.B.. (1994).** Progesterone-induced acrosome reaction: potential role for sperm acrosome antigen-1 in fertilization. Hum. Reprod., 9:1897-1902.
- CARBER-WARD, J.A., JAROUDI, K.A., EINSPENNER, N, PARHAR, R.S, AL-SEDAIDY, S.T. Y SHETH, K.W. (1994).** Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. Human Reprod., 9: 71-76.
- CENTOLA, G.M., MATTOX, J.H., BURDE, S., Y LEARY, J.F.. (1990).** Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. Mol. Reprod. Dev., 27:130-135.
- CORONEL, C.E. Y LARDY, H.A. (1987).** Characterization of calcium uptake by guinea pig epidymal spermatozoa. Biol. Reprod. , 37: 1097-1107.
- CORSETTI, J.P., COX, C., LEARY, J.F., COX, M.T., BLUMBERG, N. Y DOHERTY, R.A. (1987).** Comparison of quantitative acid-elution technique and flow cytometry for detecting fetomaternal hemorrhage. Ann. Clin. Lab. Sci. ,17: 197-206.

- COY, P., MARTINEZ, E., RUIZ, S., VAZQUEZ, J.M., ROCA, J., MATAS, C. Y PELLICER, M.T. (1993).** In vitro fertilization of pig oocytes after different coincubation intervals. Theriogenology , 39: 1201-1208.
- CROSS, N.L., OVERSTREET J.W. (1987).** Glycoconjugates of the human sperm surface: Distributions and alterations that accompany capacitation in vitro. Gamete Res. ,16: 23-35
- CROZET, N. (1994).** Acrosome reaction and fertilization. Contracept. Fertil. Sex., 22:328-330.
- CHANG, M.C. (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
- CHENG, W.T.K. (1985).** In vitro fertilization of farm animal oocytes. PhD thesis Council for National Academic Awards.
- DARZYNKIEWICZ, Z., TRAGANOS, F. SHARPLESS, T. Y MELAMED, M. (1975).** Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometric. Exp. Cell. Res. , 90: 411-428.
- DIDION, B.A. Y GRAVES, C.N. (1986).** In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. J. Anim. Sci., 62: 1029-1033.
- DIDION, B.A., POMP, D., MARTIN, M.J., HOMANICS, G.E. Y MARKERT, C.L. (1990).** Observation on the cooling and cryopreservation of pigs oocytes at the germinal vesicle stage. J. Anim. Sci., 68: 2801-2810.
- DUDENHAUSEN, E. Y TALBOT, P. (1982).** Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. Gamete Res., 6: 257-265.

- DUNCAN, A.E. Y FRASER, L. R. (1989).** Protein phosphorylation in epididymal mouse sperm during capacitation in vitro . In "Fertilization in mammals. B.D. Bavister, J. Cummings and E.R.S. Roldan. Serono Symposia. USA. Norwell, Massachusetts, 427.
- ERICSSON, S.A., GARNER, D.L., REDELMAN, D. Y AHMED, M.R. (1989).** Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. Gamete Res., 22: 355-368.
- EVENSON, D.P. (1989).** Flow cytometry. Advanced Research and clinical applications. De. A. Yen. Florida, CRC Press.
- EVENSON, D.P. Y THOMPSON, L. (1993).** Flow cytometric analysis of boar sperm chromatin structure as related to cryopreservation and fertility. Reprod. Domest. Anim.Suplemento (1): 245-258.
- EVENSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z. Y MELAMED, M.R. (1980).** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science , 240: 1131-1133.
- FORD, W.C.L., McLAUGHLIN, E.A., PRIOR, S.M., REES, J.M., WARDLE, P.G. Y HUL, M.G.R. (1992).** The yield, motility and performance in the hamster egg test of human spermatozoa prepared from cryopreserved semen by four different methods. Hum. Reprod., 7: 654-659.
- FRASER, L.R. (1989).** Sperm capacitation and its modulation. In "Fertilization in mammals. B.D. Bavister, J. Cummings and E.R.S. Roldan. Serono Symposia. USA. Norwell, Massachusetts, 141-153.
- FRASER, L.R. (1993).** What is capacitation? En: Capacitation, the acrosome reaction and sperm function assessment methods. British andrology Society. London.

- FRIESS, A.E., TÖPFER-PETERSEN, E. Y SCHILL, W.B. (1987).** Fracture labelling of boar spermatozoa for fucose binding protein (FBP). Histochemistry, 87: 181-183.
- GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A. Y PACE, M.M. (1986).** Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol. Reprod., 34: 127-135.
- GARNER, D.L., JOHNSON, L.A., YUE, S.T., ROTH, B.L., Y HAUGLAND, R.P. (1994).** Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. J. Androl., 15: 620-629.
- GARNER, D.L. Y JOHNSON, L.A.. (1995).** Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol. Reprod., 53: 276-284.
- GORDON, M., DANDEKAR, P.V. Y BARTOSZEWICZ, W. (1974).** Ultrastructural localization of surface receptors for Concanavalin A on rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 36: 211-214.
- GORDON M., DANDEKAR, P.V., BARTOSZEWICZ, W. (1975).** The surface coat of epididymal, ejaculated and capacitated sperm. J. Ultrastruct. Res. , 50: 199-207.
- GRAHAM, J.K., KUNZE, E. Y HAMMERSTEDT, R. (1990).** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. Biol. Reprod. , 43: 55-63.
- GRANT, S.A., LONG, S.E. Y PARKINSON, T.J. (1994).** Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation. J. Reprod. Fertil. , 100: 477-483.
- HARRISON, R.A.P., DOOT, H.M. Y FOSTER, G.C. (1978).** Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. J. Reprod. Fertil. ,52: 65-73.

- HARRISON, R.A.P., DOOT, H.M. Y FOSTER, G.C. (1982).** Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect". J. Exp. Zool. 222: 81-88.
- HARRISON, R.A.P. Y VICKERS, S.E. (1990).** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 88: 343-352.
- HARRISON, R.A.P., ASWORTH, P.J.C. Y MILLER, N.G.A. (1993a).** Rapid effects of bicarbonate/CO₂ on boar spermatozoa detected by merocyanine, a probe of lipid packing. J. Reprod. Fertil. Abstr. Serie 12, 14.
- HARRISON, R.A., MAIRET, B., Y MILLER, N.G. (1993b).** Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca²⁺ influx in boar sperm populations. Mol. Reprod. Dev., 35:197-208.
- HARRISON, R.A.P., ASWORTH, P.J.C., MAIRET, B., MILLER, N.G.A., PLUMMER, J.M. Y WATSON, P.F. (1994).** Variations between semen samples in the response of sperm populations to capacitating conditions. 7 Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia. 101-105.
- HUANG, E.F., ONZU, F. Y YANAGIMACHI, R. (1982).** Evidence suggesting that L-fucose is part of a recognition signal of sperm zona pellucida attachment in mammals. Gamete Res., 5: 355-361.
- HUNTER, R.H.F. (1987).** Peri-ovulatory physiology of the oviduct, with special reference to progression, storage, and capacitation of spermatozoa. En: New horizons in sperm cell research, pp. 31-45. Ed. H. Mohri. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo.
- HUNTER, R.H.F. (1988).** The fallopian tubes. Springer-Verlag. Berlín.
- HUNTER, R.H.F. Y DZIUK, P.J. (1968).** Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. J. Reprod. Fertil., 15: 199-208.

- JOHNSON, L.A. (1995).** Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. Reprod. Fertil. Dev., 7: 893-903.
- JONES, R., BROWN, C.R., LANCASTER, R.T. (1988).** Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. Development, 102: 781-792.
- KASHIWABARA, T., TANAKA, R. Y MATSUMOTO, T. (1965).** Tail to tail agglomeration of bull spermatozoa by phytoagglutinins present in soy beans. Nature, 207: 831-832.
- KEELER, K.D., MACKENZIE, N.M. Y DRESSER, D. (1983).** Flow cytometric sorting of living human spermatozoa. J. Reprod. Fert. , 68: 205.
- KINSEY, W.H. Y KOEHLER, J.K. (1976).** Fine structural localization of concanavalin, a binding site on hamster spermatozoa. J. Supramol. Struct., 5: 185-198.
- KUSUNOKI, H., YASUI, T., KATO, S. Y KANDA, S. (1984).** Identification of acrosome-reacted spermatozoa by a simplified triple-stain technique. Jpn. J. Zootech. Sci., 55: 832-837.
- KUSUNOKI, H., KATO, S. Y KANDA, S. (1989).** Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa in simple physiological salt solution. J. Exp. Zool. , 250: 346-348.
- LANGLAIS, J. Y ROBERTS, K.D. (1985).** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res., 12: 183-224.
- LANGLAIS, J., KAN, F.W.K., GRANGER, L., RAYMOND, L., BLEAU, G., ROBERTS, K.D. (1988).** Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. Gamete Res. , 20: 185-220.

- LEE, S.H. Y AHUJA, K.K. (1987).** An investigation using lectins of glycocomponents of mouse spermatozoa during capacitation and sperm-zona binding. J. Reprod. Fert., 80:65-74.
- LEWIN, L.M., WEISSENBERG, R., SOBEL, J.S., MARCUS, Z. Y NEBEL, L. (1979)** Differences in Concanavalin A-FITC binding to rat spermatozoa during epididymal maturation and capacitation. Arch. Androl., 2: 279-281.
- MAHMOUD, A.I. Y PARRISH, J.J. (1992).** Flow cytometric analysis of lectin binding to bovine sperm during capacitation with heparin or oviduct fluid. Theriogenology, 37: 252.
- MANN, T. (1964).** The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. (Methuen:London)
- MARTINEZ, E., VAZQUEZ, J.M., MATAS, C., ROCA, J., COY, P., GADEA, J. (1993).** Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using oocytes at the germinal vesicle stage. Theriogenology, 40: 547-557.
- MARTINEZ, E., VAZQUEZ, J.M., MATAS, C., GADEA, J., ALONSO, M.I. Y ROCA (1996).** Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. Biol. Reprod. , 55: 134-140.
- MATTIOLI, M., BARBONI, B., LUCIDI, P. Y SEREN, E. (1996).** Identification of capacitation of boar spermatozoa by chlortetracycline staining. Theriogenology, 45: 373-381.
- MATTIOLI, M., BACCI, M.L., GALEATI, G. Y SEREN, E. (1989).** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. Theriogenology, 31: 1201-1207.

- MATTIOLI, M., GALEATI, G., BACCI, M.L. Y SEREN, E. (1988).** Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocytes. Gamete Res., 21: 223-232.
- MEIZEL, S., PILLAI, M., DIAZ-PEREZ, E., THOMAS, P. (1990).** Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: B.D. Bavister, J. Cummings, E.R. Roldan (Eds): Fertilization in mammals. Norwell: Serono Symposia, pp: 205-222.
- MEIZEL, S. Y TURNER, K.O. (1991).** Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. Mol. Cell Endocrinol., 77:R1-R5.
- MELENDREZ, C.S., MEIZEL, S., Y BERGER, T. (1994).** Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. Mol. Reprod. Dev., 39:433-438
- MENDOZA, C. Y TESARIK, J. (1993).** A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. FEBS Lett., 330:57-60.
- MEYERS, S.A., OVERSTREET, J.W., LIU, I.K., Y DROBNIS, E.Z. (1995).** Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. J. Androl., 16:47-54.
- MIYAKE, M., KONEY, P, IRITANI, A. Y KLING, O.R. (1989).** Motility and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa washed by a continuous gradient of percoll. Gamete Res. , 24: 49-57.
- MIYAZAKI, R., FUKUDA, M., TAKEUCHI, H., ITOH, S., Y TAKADA, M. (1990).** Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. Arch. Androl., 25:243-251

- MOLINA, J., CASTILLA, J.A., GIL, T., HORTAS, M.L., VERGARA, F., Y HERRUZO, A. (1995).** Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. Hum. Reprod., 10:1280-1286.
- MORRELL, J.M. (1991).** Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. Vet. Rec., 129:375-378.
- MORTIMER, D., CURTIS E.F., MILLER, R.G. (1987).** Specific labelling by pennaut aglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. J. Reprod. Fertil. , 81: 127-135
- NAGAI, T., TAKAHASHI, T., MASUDA, H., SHIOYA, Y., KUWAYAMA, M., FUKUSHIMA, M., IWASAKI, S. Y HANADA, A. (1988).** In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 84: 585-591.
- NICOLSON, G.L., USUI, N., YANAGIMACHI, R., YANAGIMACHI, H. Y SMITH, J.R. (1977).** Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. J. Cell Biol., 74: 950-962.
- NIWA, K. (1993).** Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. J. Reprod. Fertil. Suppl., 48: 49-59.
- OKO, R.J., COSTERTON, J.W. Y COULTER, G.H. (1976).** An ultrastructural study of the head region of bovine spermatozoa. Can. J. Zool., 54: 1326-1340.
- OLIPHANT, G., REYNOLDS, A. B. Y THOMAS, T. S. (1985).** Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am. J. Anat., 174: 269-283.
- ORFAO, A. Y GONZALEZ DE BUITRAGO, J.M. (1995).** La citometría en laboratorio clínico. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.

- OSMAN, R.A., ANDRIA, M.L., JONES, D.A. Y MEIZEL, S. (1989).** Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun., 160: 828-833.
- PARINAUD, J., LABAL, B., Y VIEITEZ, G. (1992).** High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. Fertil. Steril., 58: 599-602.
- PARKS, J.E. Y EHRENWALD, E. (1990).** Fertilization in mammals. Eds. Bavister, B.D., Cummins, J. y Roldan, E.R.S. pp.155-167. Serono Symposia. Norwell.
- PETERSON, R.N. Y RUSELL, L.D. (1985).** The mammalian spermatozoon: A model for the study of regional specificity in the plasma membrane organization and function. Tissue Cell, 17: 769-791.
- POLGE, C. (1978).** Fertilization in the pig and horse. J. Reprod. Fertil., 54: 461-470.
- REVELLI, A., MODOTTI, M., PIFFARETTI YANEZ, A., MASSOBRIO, M., Y BALERNA, M. (1994).** Steroid receptors in human spermatozoa. Hum. Reprod., 9:760-766.
- ROLDAN, E.R., MURASE, T., Y SHI, Q.X. (1995).** Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science, 266:1578-1581.
- ROLDAN, E.R.S. Y FRAGIO, C. (1993).** Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. J. Biol. Chem., 268: 13962-13970.
- RUSSELL, L.D., PETERSON, R.N., HUNT, W. Y STRACK, L.E. (1984).** Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to surface polipeptide composition of boar spermatozoa. Biol. Reprod., 30: 958-978.

- SCHWARZ, M.A. Y KOEHLER, J.K. (1979).** Alteration in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosomal reaction. Biol. Reprod., 21: 1295-1307.
- SCHWARZ, M.A. Y KOEHLER, J.K. (1979).** Alteration in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosomal reaction. Biol. Reprod., 21: 1295-1307.
- SEIDEL JR, G.E., LEIPOLD, S.D. Y SHAWKI, H. (1995).** Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through percoll or BSA. Theriogenology, 43: 319.
- SHAPIRO, H.M. (1988).** Practical flow cytometry. 2nd. Edition. Alan R.Liss, Inc. , New York.
- SIDHU, K.S. Y GURAYA, S.S. (1989).** Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. Int. Rev. Cytol., 118: 231-280.
- SIEGEL, M.S. Y HAYNIE, L.B. (1994).** Effect of human sperm capacitation treatments on the penetration of freshly obtained and zona-free frozen hamster oocyte. Arch. Androl, 32: 5-11.
- SINOWATZ, F. Y FRIESS, A.E. (1983).** Localization of lectin receptors on bovine epididymal spermatozoa using a colloidal gold technique. Histochemistry, 79: 335-344.
- SINOWATZ, F., GABIUS, H.J. Y AMSELGRUBER, W. (1988).** Surface sugar binding components of bovine spermatozoa as evidenced by fluorescent neoglycoproteins. Histochemistry, 88: 395-399.
- STOCK, C.E., BATES, R., LINDSAY, K.S., EDMONDS, D.K., FRASER, L.R. (1989).** Extended exposure to follicular fluid is required for significant stimulation of the acrosome reaction in human spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 86: 401-411.

- TAKAHASHI, K., WETZELS, A.M.M., GOVERDE, H.J.M., BASTIAANS, B.A., JANSSEN, H.J.G. Y ROLLAND, R. (1992).** The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. Fertil. Steril., 57: 889-894.
- TALBOT, P. Y CHACON, R.S. (1980).** A new procedure for rapidly scoring acrosome reaction of human sperm. Gamete Res., 3: 211-216.
- TAO, J., CRITSER, E.S., Y CRITSER, J.K. (1993).** Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. Mol. Reprod. Dev.36:183-194.
- TESARIK, J. (1985).** Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. J. Reprod. Fertil., 74:383-388.
- TESARIK, J., MENDOZA, C., MOOS, J., Y CARRERAS, A. (1992).** Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. Fertil. Steril., 58:784-792.
- TESARIK, J., CARRERAS, A., Y MENDOZA, C. (1993).** Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. Mol. Reprod. Dev.34:183-189.
- THOMAS, P. Y MEIZEL, S. (1989).** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent on Ca^{2+} influx. Biochem J., 264: 539-546.
- TÖPFER-PETERSEN, E., JANUSCHEK, E., SCHMOECKEL, C. Y SCHILL, W.B. (1984).** Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. Andrologia, 16: 539-547.

- UHLER, M.L., LEUNG, A., CHAN, S.Y., Y WANG, C. (1992).** Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. Fertil. Steril., 58:1191-1198.
- VARNER, D.D., WARD, C.R., STOREY, B.T. Y KENNEY, R.M. (1987).** Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. Am. J. Vet. Res., 48: 1383-1389.
- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E., ROCA, J., COY, P., RUIZ, S. (1992).** Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. Theriogenology, 38: 843-852.
- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E., ROCA, J., COY, P., PASTOR, L.M. (1993).** Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. Mol. Reprod. Devel., 36: 84-88.
- VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E., PASTOR, L.M., ROCA, J., MATAS, C. Y CALVO, A. (1996).** 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.
- VILLAROYA, S. Y SCHOLLER, R. (1987).** Lateral diffusion of a human sperm-head antigen during incubation in a capacitation medium and induction of the acrosome reaction in vitro. J. Reprod. Fertil., 80: 545-562.
- WANG, W.H., NIWA, K. Y OKUDA, K. (1991).** In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 93: 491-496.
- WASSARMAN, P.M. (1987).** Early events in mammalian fertilization. Ann. Rev. Cell Biol., 3: 109-142.

- WHITE, D.R. Y AITKEN, R.J. (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.
- YANAGIMACHI, R. (1988).** Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Eds. E. Knobil y J. Neil et al. Raven Press. Ltd. New York. pp: 135-185.
- YOGEV, L., HOMONNAI, Z.T., GAMZU, R., AMIT, A., LESSING, J.B., PAZ, G., Y YAVETZ, H. (1995).** The use of hemizona assay in the evaluation of the optimal sperm preparation technique. Hum. Reprod., 10:851-854.
- YOSHIDA, M. (1987).** In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. Jpn. J. Vet. Sci., 49: 711-718.
- YOSHIDA, M., ISHIZAKI, K. Y PURSEL, V.G. (1992).** Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. Mol. Reprod. Dev., 31: 68-71.
- YOSHIDA, M., ISHIZAKI, Y. Y KAWAGISHI, H. (1990).** Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. J. Reprod. Fertil., 88: 1-8.
- ZUCKER, R.M., PERREAULT, S.D., Y ELSTEIN, K.H. (1992).** Utility of light scatter in the morphological analysis of sperm. Cytometry., 13:39-47.