

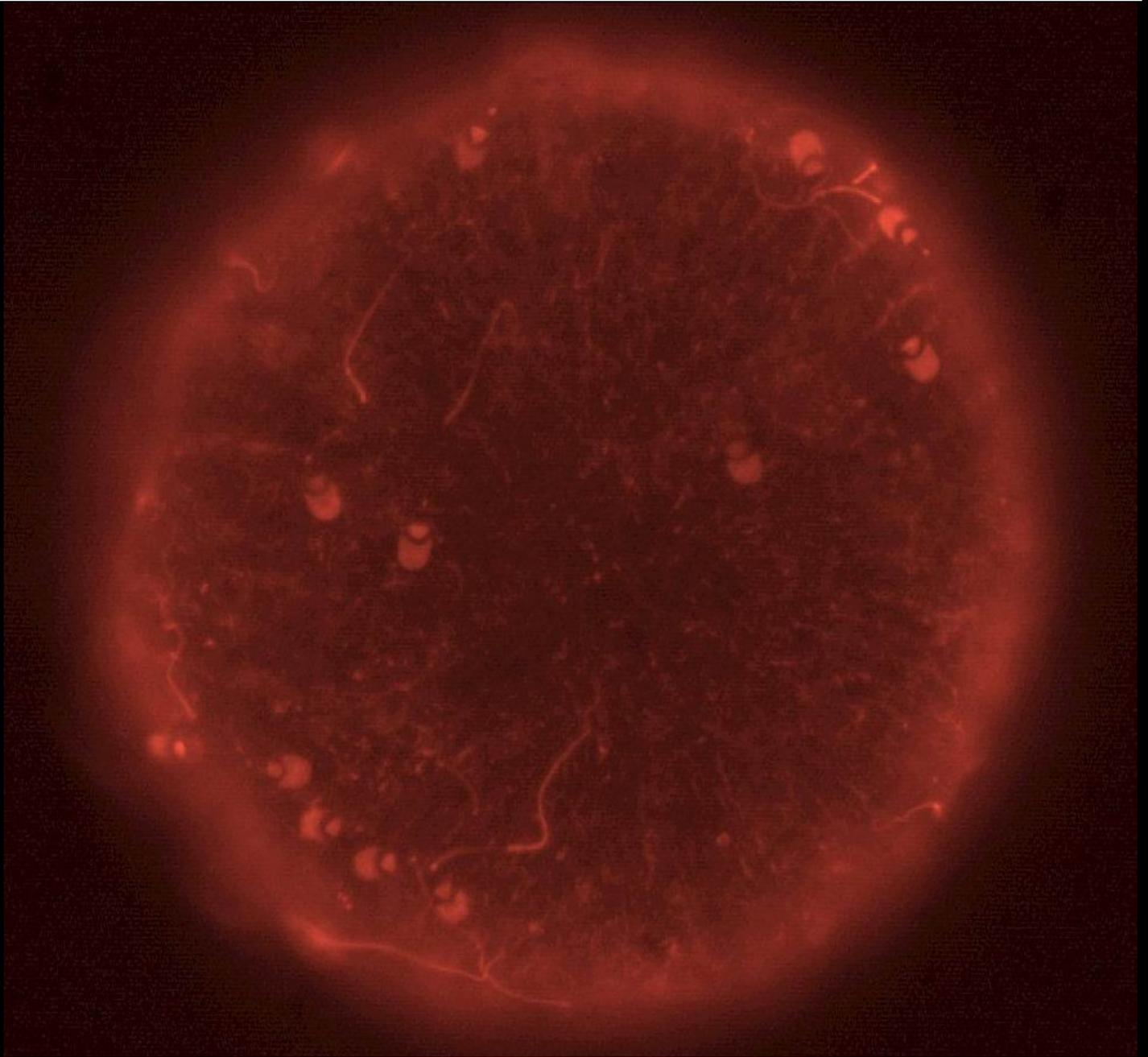
UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
FACULTAD DE VETERINARIA

**Estudio de la funcionalidad espermática,  
interacción de gametos y análisis proteico en  
espermatozoides Epididimarios y Eyaculados  
en la especie porcina**

---



**TESIS DOCTORAL**

**KAREN GUADALUPE AVILÉS LÓPEZ  
MURCIA 2011**

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**E**studio de la funcionalidad espermática,  
interacción de gametos y análisis  
proteico en espermatozoides  
**Epididimarios** y **Eyaculados** en la  
especie porcina

**TESIS DOCTORAL**

**KAREN GUADALUPE AVILÉS LÓPEZ**

**2011**



D<sup>a</sup>. **Carmen Matás Parra**, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides eyaculados y epididimarios en la especie porcina“, realizada por D<sup>a</sup>.

**KAREN GUADALUPE AVILÉS LÓPEZ**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 22 de JULIO de 2011



**D. Francisco Alberto García Vázquez**, Profesor Contratado Doctor Interino de Universidad del Área de FISILOGÍA en el Departamento de FISILOGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina”, realizada por **D<sup>a</sup>.**

**KAREN GUADALUPE AVILÉS LÓPEZ**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Amherst (MA, EE.UU)

En Murcia, a 22 de JULIO de 2011



D. **Jorge de Costa Ruiz**, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología Animal y Director del Departamento de Fisiología, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina“, ha sido realizada por D<sup>a</sup> **Karen Guadalupe Avilés López**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. Carmen Matás Parra y D. Francisco Alberto García Vázquez, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 22 de Julio de 2011

Este trabajo experimental ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos AGL2009-12512-C02-01-02) y Fundación Séneca (08752/PI/08)

Karen Guadalupe Avilés López disfruto de una Beca para estudios de Doctorado en el extranjero del Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) de México en el período 2006- 2010.

**A mis padres**

**A mis hermanas**

**A Juan Antonio**

**En memoria de mi abuela "Licha"**



*“No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso.”*

**Albert Einstein**

Quiero agradecer a todas las personas que han recorrido conmigo este camino lleno de ilusiones y de esperanzas para salir adelante, y sobre todo a aquellos que han compartido junto conmigo ese gusto por la ciencia y aquello que se nos hace fascinante por ser tan pequeño pero a la vez tan grande.

A todos mis amigos familiares y los que se iban agrupando en el camino para estar a mi lado y por confortarme cuando mas lo necesitaba, sobre todo por hacerme sentir que no estaba tan lejos de casa, por animarme día con día a pesar de estar "del otro lado del charco" y por secarme una que otra lagrima cuando me oprimía la nostalgia...

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a mis Directores de Tesis **Carmen y Fran**, por poner todo el empeño, el esfuerzo y paciencia para que esta tesis llegara a su fin, porque sin ustedes esto no hubiese podido existir, esta tesis es más suya que mía... Ha sido un orgullo trabajar con ustedes.. **MIL GRACIAS!!**

**Carmen**.... No puedo explicar en unas cuantas líneas todo lo que has aportado a mi vida, gracias en primer lugar por ser mas que una tutora, una amiga y a veces una madre por darme los consejos desinteresados, por repetirme una y otra vez las cosas, por tenerme una paciencia infinita y sobre todo por enseñarme todo lo que tu sabes, siempre te estaré agradecida, Nunca cambies!!! lo mejor de esta vida es ser feliz que es lo que siempre te quedara... **UN Millón de GRACIAS!!** P.D. Comere frutas y verduras de hoy en adelante.. ahah y solo proteínas, bueno de vez en cuando ire para que me des tus tips!!!! ejejej

**Fran**.... Gracias por todo el esfuerzo que has puesto en esta Tesis sobre todo estando fuera de casa que es ya mucha carga, por estar ahí cuando te consultaba una duda por tu ayuda en la realización de los experimentos, a pesar de que la paciencia se te agotaba siempre me dabas una palabra de aliento, y también por los buenos momentos compartidos, ya te recompensare con una comidita mexicana....**Graaciiaaass!!!**

Quiero agradecer en especial al Dr. **José Cebrián** y la Dra. **Teresa Muiño**, por abrirme las puertas de su laboratorio por brindarme todo lo que necesitaba, por tratarme como una mas de los suyos y sobre todo por hacerme sentir como en casa...

A **Joaquín, Pilar, Salva, y Manolo Avilés** Por estar siempre cuando necesitaba resolver alguna duda de ultima hora, y no poder decir que no. Muchas gracias sobre todo por su amistad son unas personas excelentes!!!.. Joaquín te debo 1,000000000!!!

A Doña **Rakel Romar**... por sacarme una sonrisa siempre, por las pláticas sobre el amor y el desamor, sobre aquellas cosas que son superficiales y a las que

le damos demasiada importancia, gracias por hacerme ver que en esta vida solo debe de importarnos lo que es complicado.. Ser feliz... **Moltes Gràcies!!!**

A mis compañeros de cubil felino... **Jon, Irenica, Luis Vieira, Sebas, Manolo S**, por hacer que los momentos tensos y de agobio fueran menores, por las dudas sin resolver (de expediente secreto X) y por las resueltas con el Endnote, por su ayuda siempre incondicional cuando la necesitaba y por esas charlas sobre temas muy diversos e "importantes" para comprender más a las mujeres... pero sobre todo por brindarme su amistad que es lo que me llevo en el corazón...Nunca lo olvidare.....

**Luisito, Luis César, Lolis, y Aitor**... Gracias por los buenos momentos que pasamos juntos y que con gusto repetiría, por aquellas horas en los que teníamos que hacer experimentos sin fin... sobre todo por compartir una cosa.. El estar fuera de nuestra casa, solo por el afán de superación...

A mis amigos fugaces en estancia pero perennes en mi corazón... A mi checa **Lenka**, A mi italiana **Claudia** y A mi argentino **Gabriel** por hacerme participe de sus vidas, por compartir momentos tan agradables y llenos de risas y por brindarme más que unas horas en el laboratorio.... Su amistad...

**Juanito y Darío**... que puedo decir, un millón de gracias porque sin ustedes mis Percolles y mi TALP no serian lo mismo!!! Juanito.. Gracias por traerme desinteresadamente mis "huevecillos", has sabido escoger bien jeje.. Siempre tendrán mi amistad como ustedes me han brindado la suya....

A mi **Sole**... por ser más que aquella persona que estaba conmigo cuando diseccionaba epidídimos y soportar los sustos que le pegaba cuando me cargaba uno que otro.... Por ser mi amiga, mi confidente y sobre todo por tratarme como a una hija...Por darme animos y tu apoyo incondicional siempre que lo necesitaba. Te estaré eternamente agradecida.....

Quiero agradecer al matadero **El Pozo**, a **Angel Poto** y a la granja lo **Navarro**, por la donación a lo mas esencial de esta tesis.. Mis espermatozoides...

A **Juan Antonio "mi Chaparrito"**.. No puedo expresar en unas cuantas líneas ni folios mi admiración, amor y mi devoción por ti sin que me salte la lagrima remy jeje... Pero lo que si quiero que sepas es que desde que llegaste a mi vida ser feliz es una adicción, gracias por quererme sin condiciones, por estar ahí en la salud pero sobre todo en la enfermedad!! Que son muchas!! (Ha pasado el año de garantía y no me puedes devolver!!!).. Gracias apoyarme en todo momento por siempre sacarme del fango cuando metía la pata y sobre todo por estar conmigo corrigiendo y haciendo esta tesis mas wapa!! ... Ahora si chaparritoo ya no me dirás Has tesis!!! Jaja Ahora te toca decir.... Alabadoo sea el señor!!! Y ponerte rumbo a la meca o lo

que quieras jajajaja... Y resumido en 8 palabras.... **Te Quiero Muchoo!!! Como la trucha al truchoo!!!....**

Mis amigos valencianos Hoo los meu xiquets!!!! **Jose, Chori y Xenxa**, Son más que amigos... son mi aliento de mentaaa!!!! Gracias por el amor, y sobre todo por todos los buenos momentos que sin pensarlo repetiría... Los quiero muchoooooo!!! A **Xavi**... Eres mi mejor amigo y lo sabes, casi mi hermano.. Y no podías ser menos en mis agradecimientos, siempre estarás en mi corazón porque tienes un lugar en él.. Gracias por todo lo bueno que aportas a mi vida, por darme la paz cuando la necesitaba.. y sobre todo por darme tu cariño desinteresado y por permitirme ser parte de tu familia... Te quiero muchoo ratillaa!!!

A padres **Mirna y Hernán**, Gracias por darme la vida y por ser en ella todo un pilar, por apoyarme siempre en todas mis decisiones por fuertes que hayan sido para ustedes. Mami, por soportar como una campeona mi ausencia por darme todo el cariño que no puedo a veces ni recoger, por darme ese amor incondicional que algún día llegare a comprender, por llenar con sonrisas mis lagrimas amargas, por ser el ángel que me cuida y sobre todo por ser mi ejemplo de vida. Papi, siempre has dicho que hay que ser fuerte con todo lo que te venga encima, y sobre todo aprender a "apechugar" con lo que has decidido... Muchas gracias por estar ahí para mi siempre que te necesitaba y se que aun lo estarás.. Y gracias por perdonarme el no ir en el momento en que más me necesitabas... Los Amo con todo el corazón!!!!

**Lore y Cynthia**... Que puedo decir que no les haya dicho ya... Tengo las mejores hermanas del mundo mundial!!!! Gracias por todo lo que me dan todos los días, por ser como son, por quererme como lo hacen y sobre todo por esperar día a día a que vuelva a México para poder abrazarnos.. Las amoooo con todo mi ser!!!!

A mis abuelos, **Esther y Misael** por criarme y por enseñarme valores familiares que siempre llevare conmigo y por estar ahí en la distancia pero siempre presentes en mi corazón.. No se que haría sin ustedes.. A todos mis **tíos, primos**, y amigos Mexicanos (**Pao, xochitl, Salva, Faby, Wendy, Maru, Panchito**, etc) que se que aunque este lejos estoy en su corazón...

Y en general a todas aquellas personas que no menciono porque serian otros tantos folios...que algunos para bien y otros para mal han estado en mi vida y han contribuido a esta tesis.

**“Aceptar nuestra vulnerabilidad en lugar de tratar de ocultarla es la mejor manera de adaptarse a la realidad.”**

*David Viscott*

## ÍNDICE

---

---

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	6
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>3.1. LA CÉLULA ESPERMÁTICA</b> .....	17
<b>3.1.1. Morfología y estructura espermática</b> .....	17
3.1.1.1. Cabeza .....	18
3.1.1.2. Cuello .....	21
3.1.1.3. Cola .....	22
<b>3.1.2. Membrana plasmática del espermatozoide</b> .....	24
3.1.2.1. Estructura .....	24
3.1.2.2. Composición .....	27
<b>3.2. TRÁNSITO ESPERMÁTICO EN EL EPIDÍDIMO: MADURACIÓN ESPERMÁTICA</b> .....	31
<b>3.2.1. Modificaciones físicas del espermatozoide durante la maduración</b> .....	31
<b>3.2.2. Modificaciones químicas del espermatozoide durante la maduración</b> .....	32
<b>3.2.3. Fluido epididimario</b> .....	34
3.2.3.1. Proteínas del fluido luminal .....	35
<b>3.3. EL EYACULADO</b> .....	36
<b>3.3.1. Plasma seminal</b> .....	38
3.3.1.1. Secreción de las glándulas sexuales accesorias .....	38
3.3.1.2. Proteínas del plasma seminal .....	39
<b>3.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA</b> .....	44
<b>3.4.1. Transporte espermático en el tracto genital de la hembra</b> .....	45
<b>3.4.2. Motilidad y reservorio espermático en el oviducto</b> .....	45
<b>3.4.3. Cambios funcionales durante la capacitación espermática</b> .....	49
<b>3.4.4. Bases moleculares de la capacitación espermática</b> .....	49
3.4.4.1. Aspectos relacionados con los procesos rápidos que acontecen durante la capacitación espermática .....	51
3.4.4.2. Aspectos relacionados con los procesos lentos que acontecen durante la capacitación espermática .....	52
3.4.4.3. Moléculas y mecanismos implicados en el proceso de la capacitación .....	53

---

---

<b>3.4.5. Capacitación <i>in vitro</i></b> .....	64
3.4.5.1. Métodos de selección y preparación espermática .....	64
3.4.5.2. Capacitación <i>in vitro per se</i> .....	66
<b>3.5. FECUNDACIÓN</b> .....	67
<b>3.5.1. Penetración de los espermatozoides a través de las células de <i>cumulus oophorus</i></b> .....	68
<b>3.5.2. Unión y penetración del espermatozoide a la Zona Pelúcida</b> .....	69
3.5.2.1. Unión primaria del espermatozoide a la Zona Pelúcida .....	69
3.5.2.1.1. Reacción Acrosómica (RA) .....	73
3.5.2.2. Unión secundaria del espermatozoide a la Zona Pelúcida .....	77
<b>3.5.3. Fusión de la membrana plasmática entre gametos</b> .....	78
<b>3.5.4. Interacción del espermatozoide con el oolema, activación del ovocito y formación pronuclear</b> .....	80
<b>3.5.5. Singamia</b> .....	84
<b>3.5.6. Modificación en los procesos biológicos de fecundación: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)</b> .....	85
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	88
<b>4.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS</b> .....	89
4.1.1. Medios de dilución y de manipulación de espermatozoides .....	89
4.1.2. Medio de transporte y lavado de ovarios y ovocitos .....	92
4.1.3. Medios de cultivo .....	93
<b>4.2. MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	95
4.2.1. Obtención de espermatozoides .....	95
4.2.2. Obtención de fluido oviductal porcino (FOP) .....	98
4.2.3. Obtención de ovocitos .....	99
<b>4.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA</b> .....	100
4.3.1. Evaluación de la motilidad espermática mediante el análisis computerizado de imágenes CASA .....	100
4.3.2. Análisis de la descondensación de cromatina .....	102
4.3.3. Evaluación de la reacción acrosómica .....	103
<b>4.4. ANÁLISIS DE LA UNIÓN A LA ZONA PELÚCIDA-ZP Y FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (ICSI)</b> .....	104

---

---

<b>4.4.1. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV)</b> .....	104
<b>4.4.2. Unión espermatozoide-zona pelúcida</b> .....	105
4.4.2.1. Valoración microscópica de la unión espermatozoide-zona pelúcida .....	105
<b>4.4.3. Fecundación <i>in vitro</i>: Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)</b> .....	106
4.4.3.1. Valoración microscópica de los ovocitos fecundados por ICSI .....	107
<b>4.5. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA</b> .....	109
<b>4.5.1. Análisis mediante Western blot</b> .....	109
4.5.1.1. Extracción de membranas celulares mediante sonicación .....	109
4.5.1.2. Determinación de la concentración de proteínas .....	109
4.5.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	111
4.5.1.4. Western blot .....	112
4.5.2. Inmunocitoquímica: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	113
<b>4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	115
<b>EXPERIENCIA 1. Análisis espermático</b> .....	119
<b>Experimento 1-1.</b> Evaluación de la motilidad espermática (CASA).....	119
<b>Experimento 1-2.</b> Evaluación de la descondensación de la cromatina mediante citometría de flujo .....	119
<b>Experimento 1-3.</b> Evaluación de la reacción acrosómica .....	120
<b>EXPERIENCIA 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación</b> .....	121
<b>Experimento 2-1.</b> Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida .....	121
<b>Experimento 2-2.</b> Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear ...	122
<b>EXPERIENCIA 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante Western blot (WB) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)</b> .....	124
<b>Experimento 3-1.</b> Efecto de la incubación espermática con BSA sobre la fosforilación de la tirosina evaluados mediante WB .....	124
<b>Experimento 3-2.</b> Efecto de la incubación espermática con FOP sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB .....	125
<b>Experimento 3-3.</b> Efecto del tiempo de incubación espermática sobre fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB .....	125
<b>Experimento 3-4.</b> Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides evaluada mediante IFI .....	127
<b>4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	130
<b>5. RESULTADOS</b> .....	131
<b>EXPERIENCIA 1. Análisis espermático</b> .....	132
<b>Experimento 1-1.</b> Evaluación de la motilidad espermática (CASA) .....	132
<b>Experimento 1-2.</b> Evaluación de la descondensación de la cromatina mediante citometría de flujo .....	135
<b>Experimento 1-3.</b> Evaluación de la reacción acrosómica .....	136

---

---

<b>EXPERIENCIA 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación</b> .....	137
<b>Experimento 2-1.</b> Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida .....	137
<b>Experimento 2-2.</b> Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear ...	139
<b>EXPERIENCIA 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante Western blot (WB) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)</b> .....	141
<b>Experimento 3-1.</b> Efecto de la incubación espermática con BSA sobre la fosforilación de la tirosina evaluados mediante WB .....	141
<b>Experimento 3-2.</b> Efecto de la incubación espermática con FOP sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB .....	141
<b>Experimento 3-3.</b> Efecto del tiempo de incubación espermática sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB .....	143
<b>Experimento 3-4.</b> Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides evaluada mediante IFI .....	144
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	147
<b>EXPERIENCIA 1. Análisis espermático</b> .....	149
<b>Experimento 1-1.</b> Evaluación de la motilidad espermática (CASA) .....	149
<b>Experimento 1-2.</b> Evaluación de la descondensación de la cromatina mediante citometría de flujo .....	160
<b>Experimento 1-3.</b> Evaluación de la reacción acrosómica .....	165
<b>EXPERIENCIA 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación</b> .....	168
<b>Experimento 2-1.</b> Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida .....	168
<b>Experimento 2-2.</b> Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear ...	174
<b>EXPERIENCIA 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante Western blot (WB) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</b> .....	180
<b>Experimento 3-1, 3-2 y 3-3.</b> Efecto de la incubación espermática con BSA, FOP y efecto del tiempo de incubación sobre la fosforilación de la tirosina evaluados mediante WB .....	181
<b>Experimento 3-4.</b> Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides evaluada mediante IFI .....	186
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	193
<b>8. ABREVIATURAS</b> .....	196
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	201

# 1. RESUMEN

La capacitación es un proceso fisiológico que el espermatozoide debe experimentar para que la fecundación del ovocito tenga lugar. Este proceso se encuentra regulado en el espermatozoide por diferentes vías moleculares, varias de las cuales, a día de hoy, se desconocen o no están totalmente dilucidadas. Estos eventos moleculares que acontecen en el espermatozoide durante el proceso de capacitación están condicionados por distintos factores que rodean su entorno, entre los cuales podemos destacar el ambiente epididimario, el plasma seminal o las secreciones del aparato reproductor femenino como el fluido oviductal.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el comportamiento de espermatozoides epididimarios-EP (en contacto con el fluido epididimario y no con el plasma seminal) y eyaculados-EY (en contacto con el plasma seminal) sometidos a 3 tratamientos diferentes: 1) Espermatozoides no tratados (grupo control-C); 2) Lavados a través de gradientes de Percoll e incubados en medio de capacitación TALP (grupo lavados-L); 3) Espermatozoides lavados e incubados en Fluido Oviductal Porcino (grupo FOP). Los espermatozoides de los diferentes grupos experimentales fueron analizados mediante diversas técnicas según los experimentos realizados:

- **Experiencia I - ANÁLISIS ESPERMÁTICO:** se analizaron los parámetros de motilidad, descondensación de la cromatina y reacción acrosómica.
- **Experiencia II - ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE GAMETOS Y FECUNDACIÓN:** se evaluó la unión espermática a la zona pelúcida (ZP) y la activación y formación pronuclear tras la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).
- **Experiencia III - ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA:** evaluado mediante Western-blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

I. Al realizar el análisis de los parámetros de motilidad en los 6 grupos experimentales (EP y EY x C, L y L-FOP) observamos que en los

espermatozoides de EP el grupo C se comportaba de diferente manera en prácticamente todos los parámetros respecto al grupo L. Sin embargo, el grupo FOP en algunos casos era similar al grupo C y en otros a ambos grupos (C y L). Si comparamos los 3 grupos experimentales de espermatozoides EY entre sí, el grupo C en la mayoría de los parámetros estudiados era diferente a los grupos L y L-FOP, siendo estos similares en la mayoría de los parámetros analizados. Por otro lado, observamos una menor descondensación de la cromatina en los grupos C, en relación a los grupos L y L-FOP. Además, se evaluó la reacción acrosómica a diferentes tiempos de incubación de los espermatozoides en un medio de capacitación (EP: C, 0h, 3h y FOP-3h; EY: C, 0h, 3h y FOP-3h). Los valores más elevados de espermatozoides reaccionados correspondieron al grupo EP-FOP-3h.

En términos generales y para los parámetros estudiados, observamos que los grupos L y L-FOP independientemente del origen espermático se comportaron de una manera similar entre sí y diferentes de los grupos C.

**II.** En el grupo de espermatozoides incubados con FOP se observó, en ambos tipos de espermatozoides (EP y EY), un descenso de éstos en la unión a la ZP comparado con los otros 2 grupos experimentales (C y L), donde en el grupo C se obtuvieron los valores más elevados de unión. En el caso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la activación ovocitaria y la descondensación espermática fueron menores en el grupo EP que en el EY. Observamos una mayor activación y descondensación espermática en los grupos L y L-FOP correspondiente al grupo EY.

Teniendo en cuenta todos los datos de este apartado, podemos decir que el FOP modula la unión espermática a la ZP y a su vez, junto con el grupo L, provoca una mayor activación ovocitaria y grado de descondensación espermática.

**III.** En esta última experiencia se analizó la fosforilación de residuos de tirosina. En primer lugar se analizó la fosforilación mediante WB. En términos

---

---

generales, encontramos bandas reactivas a la fosforilación de tirosina entre 15 y 175 kDa. Una de las diferencias significativas entre espermatozoides EP y EY, fue la ausencia de la banda de 20 kDa en el grupo C de EY con respecto al resto de grupos experimentales. Además, y según la bibliografía unas de las proteínas más importantes a la hora de valorar la capacitación en la especie porcina es la fosforilación de la banda de 32 kDa (p32). En espermatozoides de EP, ésta aparece fosforilada con poca intensidad en los grupos C y L. En el grupo EY, aparece claramente en el grupo L pero no en el grupo C.

Teniendo en cuenta por separado los experimentos realizados en este apartado:

- Efecto de la presencia albúmina (BSA): el patrón de bandas fosforiladas fue similar, independientemente del uso de BSA.
- Efecto de la incubación con FOP: en espermatozoides EP el grupo C y L presentaban menos fosforilación de la p32 que en el grupo FOP. En el grupo EY no se encontraron diferencias sobre el patrón de bandas con respecto al grupo L cuando se incubaron los espermatozoides en FOP.
- Efecto del tiempo de incubación: el tiempo de incubación influye en mayor medida en los espermatozoides de EP, donde a las 4 horas de incubación, las bandas de 44, 42 y 32 kDa aumentan en intensidad con respecto a los otros grupos experimentales de EP, adquiriendo un patrón similar a los espermatozoides EY.

Por último, se analizó la localización de la fosforilación de tirosina mediante IFI en los espermatozoides sometidos a los mismos tiempos de incubación que el experimento anterior. Se obtuvieron 8 patrones diferentes de fosforilación los cuales fueron reagrupados en 3:

- I. Espermatozoides **no capacitados**: espermatozoides sin ninguna fluorescencia, fluorescencia baja o en región acrosomal y/o cola.

- II. Espermatozoides **capacitados fosforilados en las regiones subecuatorial y cola.**
- III. Espermatozoides **capacitados fosforilados en la región subecuatorial, acrosoma y/o cola.**

Los grupos C presentaron el porcentaje más alto de espermatozoides con una baja fosforilación o ausencia de la misma (no capacitados). En el caso de los espermatozoides considerados como capacitados encontramos que para el grupo de espermatozoides del grupo III, el mayor porcentaje de espermatozoides inmunorreactivos a fosfotirosina se encontraron en los espermatozoides de EP (EP-L 0, 3 y 4h), seguido de EY-L 3h, mientras que los grupos FOP (tanto en EP como EY) el porcentaje de fosforilación fue menor. Esto nos podría indicar el papel modulador del FOP en el proceso de capacitación.

Por otro lado, la fosforilación en el flagelo se asocia con la hiperactivación. Nuestros resultados mostraron que en los grupos C y EY-0h la fosforilación de la cola fue baja o nula con respecto al resto de grupos.

## SUMMARY

Capacitation is a physiological process that sperm must undergo in order to fertilize an oocyte. The process is regulated in the sperm by different molecular pathways, several of them still unknown or not fully elucidated. These molecular events occurring in sperm during the capacitation process are conditioned by different factors surrounding the sperm such as the epididymal environment, the seminal plasma or the female reproductive tract secretions such as the oviductal fluid.

The main objective of this study was to analyze the behavior of epididymal sperm (EP) that have not been in contact to with seminal plasma, and the ejaculated sperm (EJ) that have been in contact to seminal plasma. Both groups were subjected to 3 different treatments: 1) untreated sperm (control group-C), 2) washing through Percoll gradients and incubation in capacitating medium TALP (washed-L group), 3) washing and incubation in Porcine Oviductal Fluid (POF group). Sperm from different experimental groups were analyzed using different techniques according to the different experiments:

- **Experience I - SPERM ANALYSIS:** sperm motility parameters, decondensation of chromatin and acrosome reaction were analyzed.
  
- **Experience II - ANALYSIS OF GAMETES INTERACTION AND FERTILIZATION:** oocyte activation and pronuclear formation was assessed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) also the sperm binding to the zona pellucida (ZP) was evaluated.
  
- **Experience III - TYROSINE PHOSPHORYLATION ANALYSIS:** it was analyzed by Western blot (WB) and indirect immunofluorescence (IFI).

**I.** Analysis of motility parameters in the 6 experimental groups (EP and EJ x C, L and L-POF) revealed that sperm from EP-C group behaved differently in almost all parameters compared to L group, but the EP-L-POF group was similar to group EP-C in some cases but similar to EP-C and EP-L groups in

other cases). When we compare the 3 experimental groups of EJ sperm between them, the EJ-C group behaved differently from EJ-L and EJ-POF groups for most of the studied parameters whereas EJ-L and EJ-POF groups were similar between them in most analyzed parameters. Furthermore, a lower decondensation of chromatin was observed in C group compared to L and POF groups. In addition, the acrosome reaction was evaluated at different times of sperm incubation in capacitation medium (EP: C, 0h, 3h and POF-3h; EJ: C, 0h, 3h and POF-3h) and EP-POF-3h group reached the highest values of reacted sperm.

In general terms, for the studied parameters and independently of sperm origin, sperm from L and POF groups behave similarly between them and differently from C group.

**II.** When the sperm was incubated in POF, both in EP and EJ types, a decrease in the number of sperm bound to the ZP was observed compared to the other sperm treatment being the C group the one with higher sperm binding. When ICSI was performed, oocyte activation and sperm decondensation data were lower in EP than in EJ group. We observed increased activation and sperm decondensation in groups EJ-L EJ-POF groups.

Considering all the data in this section, we might say that POF modulates sperm binding to the ZP and in turn, with the L treatment, leads to a higher oocyte activation and sperm decondensation degree.

**III.** In this last experience tyrosine residues phosphorylation was analyzed. The analysis by WB showed tyrosine-reactive bands between 15 and 175 kDa. One of the significant differences between epididymal and ejaculated sperm was the absence of the 20 kDa-band in the EJ-C group compared to the other experimental groups. According to the literature, one of the most important proteins to assess capacitation in boar sperm is the phosphorylation of the 32 kDa-band (p32). In our study, it appears phosphorylated in epididymal sperm with a low intensity in groups EP-C and EP-L whereas in ejaculate doesn't it appears clearly phosphorylated in EJ-L but not in EJ-C group.

Considering the experiments in an independent way we could say that:

- Effect of the presence *albumin* (BSA): the phosphorylated pattern of bands was similar regardless of the use of BSA.
- Effect of incubation with *POF*: EP-C and EP-L groups had less phosphorylation of p32 than EP-POF group. On the EJ group there were no differences on the phosphorylation pattern with respect to the EJ-L group when sperm were incubated in POF.
- Effect of incubation *time*: incubation time has a greater influence in epididymal sperm, where at 4 hours of incubation, the 44-, 42- and 32 kDa-bands increased their intensity in comparison to the other experimental EP groups, acquiring a pattern similar to EJ sperm.

Finally, we analyzed the localization of tyrosine phosphorylation by **IFI** in the sperm incubated under the same conditions and time than in the previous experiment. We obtained 8 different phosphorylation patterns that were grouped into 3:

- I. **Non capacitated** sperm: sperm displaying absence or low fluorescence, or fluorescence on the acrosomal region and/or tail.
- II. **Capacitated** sperm with phosphorylation in **sub-equatorial and tail regions**.
- III. **Capacitated** sperm with phosphorylation in **sub-equatorial, acrosome and/or tail regions**.

Control groups had the highest percentage of sperm showing absence or low phosphorylation (non capacitated sperm). For the sperm considered as capacitated (III group), the highest percentage of immunoreactive sperm to phosphotyrosine was found in epididymal sperm (EP-L 0, 3 and 4h), followed by EJ-L 3h, whereas in POF groups (both EP and EJ) the phosphorylation rate was lower. This could reflect a modulator role of POF in the capacitation process. On the other hand, phosphorylation at the flagellum level is associated with hyperactivation. Our results showed that in C and EJ-0h groups the tail phosphorylation was low or nonexistent compared to the other groups.

## **2. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

Actualmente, la biotecnología reproductiva en las diferentes especies domésticas se encuentra en pleno desarrollo y requiere en la mayoría de los casos la producción *in vitro* de embriones (PIV) en áreas como la transgénesis, recuperación de razas en peligro de extinción, células madre... Vajta et al., (2010) postularon que "...algunos de los logros conseguidos en esta década incluyen el uso militar de bombas de hidrógeno y atómicas, vuelos espaciales, submarinos nucleares, descifrar el código genético,...mientras que en la ciencia biológica, la producción de blastocitos en una placa de *petri* es todavía un sueño inalcanzable para la mayoría de los embriólogos...".

La PIV es un proceso que comprende la obtención y maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, la capacitación *in vitro* de los espermatozoides, el cocultivo de ambos gametos o fecundación *in vitro* (FIV), y el cultivo *in vitro* de los embriones resultantes (CE) hasta alcanzar el estadio de blastocisto.

En 1989, Mattioli et al., obtuvieron la primera camada de lechones porcinos procedentes de un sistema MIV/FIV/CE, sin embargo, aunque se han hecho grandes progresos en el desarrollo de las técnicas de MIV, FIV y CE, aún son necesarias nuevas mejoras y conocimientos que optimicen la producción de embriones. No obstante, a diferencia de lo que ocurre con otras especies, el principal problema en porcino es el alto número de fecundaciones polispérmicas (Funahashi, 2003). Las causas de la polispermia no están claras (Barros y Yanagimachi, 1971; Hoodbhoy y Talbot, 1994, 2001; Sun, 2003; Talbot y Dandekar, 2003; Wang et al., 2003), pero indudablemente el gameto masculino es uno de los factores claves en este proceso.

El transporte *in vivo* de los espermatozoides y el proceso de capacitación ocurren en un microambiente regulado por multitud de factores. Los espermatozoides tras ser eyaculados ascienden por el tracto genital femenino, donde solo una pequeña proporción es capaz de unirse a las células epiteliales del oviducto en el denominado reservorio espermático. Aquí, permanecen hasta el momento de la ovulación en el que son liberados secuencialmente gracias a modificaciones endocrinas que conllevan a una

serie de cambios en la membrana plasmática del epitelio del oviducto así como en la composición del fluido oviductal (Fazeli et al., 1999). Entre las modificaciones de las funciones espermáticas cuando estas células se unen al epitelio oviductal se encuentran cambios en la concentración interna de  $Ca^{2+}$ , la fluidez de la membrana y la motilidad. Como hemos mencionado anteriormente, próximo al momento de la ovulación los espermatozoides son gradualmente liberados para encontrarse con el ovocito en la ampolla oviductal (Hunter, 1981). Estudios previos han demostrado que las células epiteliales secuestran espermatozoides de alta calidad, pero no se ha estudiado detalladamente el papel del fluido oviductal en la función espermática.

Los procedimientos que se utilizan *in vitro* para realizar la fecundación se basan en imitar lo que acontece *in vivo*. Por ello, los métodos de preparación espermática que habitualmente se emplean para realizar la FIV tratan, por un lado de seleccionar los espermatozoides de mayor calidad y por otro, lograr la capacitación de una manera similar como tiene lugar en condiciones fisiológicas. Básicamente, el proceso de capacitación engloba una serie de cambios que le confieren al espermatozoide la capacidad de modificar su motilidad, atravesar las células del *cumulus* y de experimentar la reacción acrosómica una vez que haya contactado con la zona pelúcida del ovocito. Se ha determinado que la capacitación espermática *in vitro* puede inducirse mediante la incubación de los espermatozoides en un medio enriquecido con albumina,  $Ca^{2+}$  y bicarbonato (Visconti et al., 1995a).

Generalmente un paso previo a la incubación en el medio para inducir la capacitación, es la eliminación del plasma seminal. En la composición del plasma seminal se encuentran ciertos componentes que modulan la capacitación de forma que éstos factores, que han sido clásicamente denominados como “decapacitantes”, pueden inhibir o incluso revertir la capacitación (Oliphant, 1974). Además, parece ser que estos componentes previenen de una prematura capacitación. Por otro lado, también se ha visto que el plasma seminal contiene factores que mejoran la capacitación ya que se ha demostrado que numerosas proteínas del plasma seminal facilitan la salida de colesterol de la membrana plasmática, lo cual hace disminuir su estabilidad

e induce su reorganización, hecho que es considerado como una de las etapas de la capacitación (Lusignan et al., 2007).

Durante la maduración epididimaria y la eyaculación numerosas glicoproteínas y péptidos, secretadas por las glándulas accesorias, se unen a la superficie espermática con diferentes afinidades (Jones, 1989; Cooper y Yeung, 1999). Estos componentes tienen un efecto significativo sobre la función de las membranas (Calvete et al., 1997; Yeung et al., 2006). Igualmente, la eliminación de estas sustancias durante los lavados previos a la FIV pueden revertir los efectos del plasma seminal o las secreciones epididimarias, influenciando la capacitación y la supervivencia espermática.

Uno de los sistemas más utilizados para procesar espermatozoides para FIV es el lavado a través de gradientes de distinta densidad. Gradientes hechos a base de Percoll® se han utilizado en la preparación espermática en técnicas de reproducción asistida, tanto en la especie humana como en diversas especies de animales (Grant et al., 1994). Durante la centrifugación a través de un gradiente de densidad se seleccionan células de morfología, densidad y tamaño similares, sobre todo si se utilizan gradientes discontinuos (Pertoff, 2000). También se ha sugerido que los lavados espermáticos a través de gradientes de Percoll® modifican los patrones de glicosilación de ciertas estructuras importantes para la fecundación (De Maistre et al., 1996). En este sentido, Furimsky et al. (2005) demostraron que con el lavado a través de gradientes de Percoll®, se modificaba el perfil lipídico de los espermatozoides y por ello, éstos eran capaces de unirse en mayor número a la zona pelúcida. La explicación a este proceso se basa en que se favorece una mayor salida de colesterol y un incremento del nivel intracelular del bicarbonato. Matás et al. (2010) observaron que espermatozoides eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll® eran capaces de fecundar ovocitos *in vitro* con un menor tiempo de cocultivo que los procedentes de epidídimo, por lo que pudieron comprobar que el contacto de los espermatozoides con el plasma seminal mejoraba la capacitación espermática si éste se eliminaba bajo ciertas condiciones.

Existen diferentes técnicas para determinar la capacitación espermática. Entre éstas se encuentra la fosforilación de tirosina de proteínas localizadas en distintas zonas del espermatozoide (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1999; Tardif et al., 2001; Pommer et al., 2003; Grasa et al., 2006). En experiencias realizadas *in vitro* se ha determinado que los espermatozoides que permanecen unidos a las células del oviducto, presentan un bajo grado de fosforilación en tirosina y podrían representar la población de células más viable destinada a la fecundación, mientras la población no unida presentaba alto grado de fosforilación y podría ser la que ya está capacitada (Petrunkina et al., 2001b; Zumoffen et al., 2010).

No obstante, también existen otro tipo de técnicas que se pueden utilizar para evaluar la capacitación espermática como son los test de unión a zona pelúcida (binding), el análisis del grado de descondensación de la cromatina como fase previa a la fecundación y la evaluación de la formación pronuclear tras la fecundación *in vitro*. Sin embargo, ninguno de ellos se puede considerar como un perfecto predictor de la capacitación *in vitro*, aunque en su conjunto nos pueden ofrecer una valiosa información de los eventos que acontecen durante dicho proceso.

## HIPÓTESIS

Si es necesaria la eliminación del plasma seminal para la fecundación *in vitro* y se ha determinado que el Fluido Oviductal Porcino (procedente de cerdas en fase folicular temprana) favorece la capacitación, los espermatozoides sin plasma seminal e incubados en fluido oviductal deberían ser los más adecuados para estandarizar un sistema de FIV y permitir un mayor control sobre la polispermia.

## OBJETIVO

Por todo lo anteriormente expuesto, el **objetivo general** de este trabajo ha sido evaluar la capacitación de espermatozoides *in vitro* tanto procedentes de epidídimo como de eyaculado bajo distintas condiciones (lavados en Percoll® y/o incubados en Fluido Oviductal Porcino-FOP), mediante el estudio de los patrones de motilidad, el análisis de la condensación de la cromatina, reacción acrosómica, interacción espermatozoide-ovocito, activación y formación pronuclear mediante ICSI y por último, la evaluación de la fosforilación en residuos de tirosina.

### **3. REVISION BIBLIOGRÁFICA**

En 1951, Austin y Chang, de forma independiente, descubrieron que los espermatozoides de mamíferos deben pasar en el tracto reproductivo femenino un período de tiempo para alcanzar la capacidad fecundante. Poco después, este intervalo entre la deposición del semen en el genital de la hembra y el tiempo en el que se produce la fecundación se denominó “capacitación” (Austin, 1951). Este concepto, a día de hoy, es mucho más amplio y engloba modificaciones funcionales y estructurales entre las que destacan: la capacidad del espermatozoide de atravesar las células del *cumulus* y unirse a la zona pelúcida (ZP), experimentar la reacción acrósomica, adquirir un tipo de movimiento especial denominado “hiperactivación”, y finalmente permitir la fusión con la membrana plasmática del ovocito.

Durante esta revisión, en primer lugar describiremos la morfología, estructura y composición del espermatozoide, con especial atención en la especie porcina, así como la composición del fluido epididimario (o luminal) y del plasma seminal. Seguidamente, describiremos las bases moleculares que engloban a la capacitación espermática, y analizaremos algunos de los factores relacionados con dicho proceso.

### **3.1. LA CÉLULA ESPERMÁTICA**

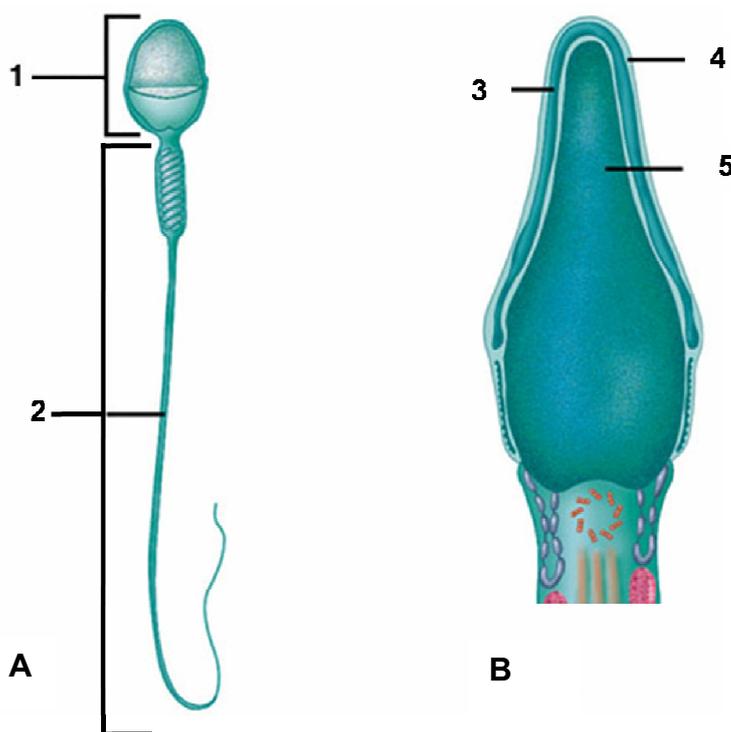
#### **3.1.1. Morfología y estructura espermática**

El espermatozoide (del griego *esperma*-semilla, y *zoon*-animal) es una célula haploide que constituye el gameto masculino y cuya función es la formación de un cigoto totipotente, resultado de la fusión de su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar posteriormente al embrión.

La célula espermática tiene 3 regiones altamente diferenciadas y especializadas: cabeza, cuello y cola o flagelo (Figura 3.1A). En el caso del verraco la longitud total del espermatozoide es de 50-60  $\mu\text{m}$  (Pesch y Bergmann, 2006). A continuación vamos a describir cada una de las regiones que componen el espermatozoide:

### 3.1.1.1. Cabeza

Es una estructura de morfología más o menos piriforme en mamíferos. En el verraco posee una longitud de 8.84-8.95  $\mu\text{m}$  y un perímetro de 26.33-27.65  $\mu\text{m}$  (Quintero-Moreno et al., 2008). En ella podemos encontrar el acrosoma y el núcleo, encontrándose ambas envueltas por la membrana plasmática (Figura 3.1B).

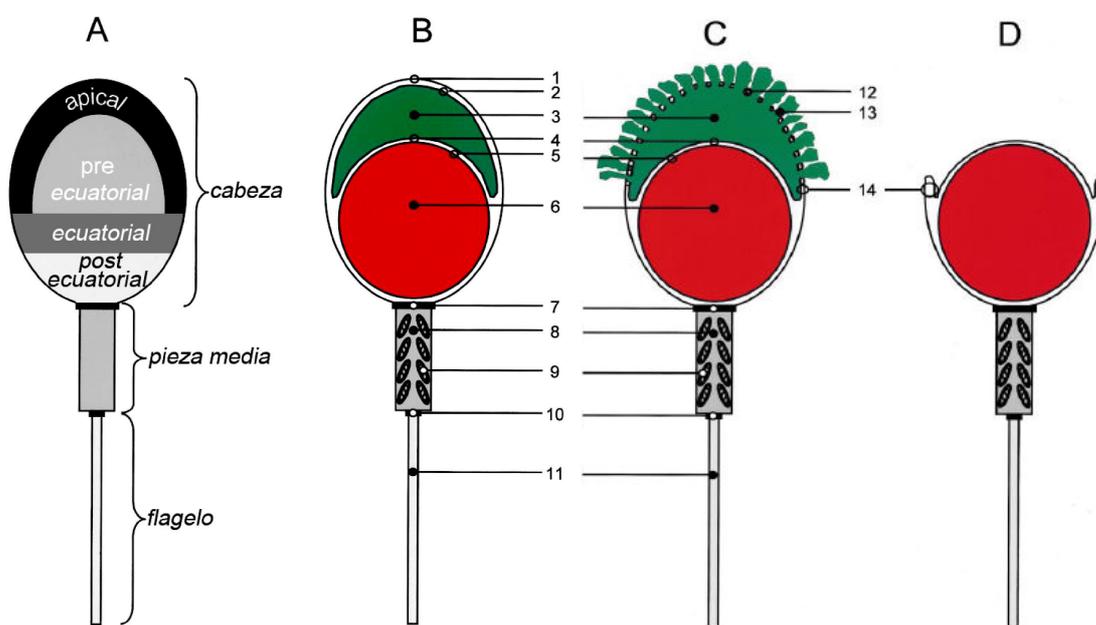


**Figura 3.1.** A) Partes principales del espermatozoide: 1) Cabeza, 2) Cola. B) Corte transversal de la cabeza espermática: 3) Acrosoma, 4) Membrana plasmática y 5) Núcleo. (Tomado de <http://www.oocytes.org/ar/biolembrio>)

Además, estructuralmente la cabeza, se puede subdividir en 4 segmentos: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial (Figura 3.2 A). A continuación describiremos el acrosoma y el núcleo.

**Acrosoma:** El acrosoma cubre aproximadamente los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide. Posee una membrana interna y una externa que delimita su contenido (Pesch y Bergmann, 2006) (Figura 3.2 B). Entre el acrosoma y el núcleo hay un pequeño espacio sub-acrosomal cuya función, aún discutida, parece ser una capa adhesiva que tiende a unir el

acrosoma al núcleo subyacente (Fawcett, 1970). El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialorunidasa y muchas otras hidrolasas y esterases. Estas enzimas son esenciales para la lisis de la zona pelúcida y la penetración de las células que rodean al ovocito. Cuando la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática, los enzimas son liberados. Este proceso se conoce como reacción acrosómica (RA) (Barros et al., 1967), (Figura 3.2 C-D).



**Figura 3.2.** (A) Esquema de la estructura del espermatozoide. (B) Corte sagital de la célula espermática: 1: Membrana espermática, 2: Membrana acrosomal externa, 3: Contenido acrosomal, 4: Membrana acrosomal interna, 5: Núcleo celular, 6: Contenido de ADN altamente condensado, 7: Anillo posterior ó placa basal, 8: Pieza media, 9: Mitocondria, 10: Anillo anular, 11: Flagelo. (C) Contenido acrosomal que es liberado durante la reacción acrosómica, (enzimas hidrolíticas) 12: Vesícula (fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, 13: Secreción acrosomal. (D) Exposición de la membrana acrosomal interna después de la reacción acrosómica, 14: Estructura en horquilla (Imagen de Flesch y Gadella, 2000).

**Núcleo:** El núcleo espermático está formado por ADN y proteínas nucleares, todo ello rodeado por la membrana nuclear. Estas proteínas nucleares tienen funciones tanto estructurales (compactación del ADN), como enzimáticas (reparación). Aparentemente, la estructura y/o composición de la cromatina en el núcleo de los espermatozoides puede ser muy variable dependiendo de la especie.

Durante la espermiogénesis ocurre una remodelación que conlleva a la producción de una célula altamente especializada pero con un núcleo transcripcionalmente inactivo y con la totalidad del citoplasma encapsulado en forma de cuerpo residual (Sakkas et al., 2002). Solo en la región de la cabeza aparece una pequeña área de cromatina sin condensar, donde la transcripción, transducción y biosíntesis de proteínas es aún posible (Dadoune, 1995; Dadoune et al., 2004). En el testículo, durante la espermiogénesis, la cromatina espermática es empaquetada en una estructura altamente condensada (Yanagimachi, 1994c). Además, el núcleo espermático se ve rodeado por una estructura conocida como *teca perinuclear (TP)* que es comprimida por al menos 6 proteínas distintas (Sutovsky et al., 1997), y tiene como función la unión de membranas espermáticas (Korley et al., 1997) y la preservación de su integridad (Watson, 2000).

El estado de condensación nuclear es la consecuencia del reemplazo de las proteínas nucleares denominadas histonas, por proteínas más básicas llamadas protaminas, las cuales se caracterizan por su alto contenido en arginina (55-70%) y residuos de cisteína formando puentes disulfuro entre las cadenas de ADN. Inmediatamente después de su síntesis, las protaminas son fosforiladas facilitando su correcta unión al ADN; pero una vez formado el complejo ADN-protamina, las protaminas son defosforiladas antes que el espermatozoide llegue al epidídimo. En consecuencia, la fosforilación y defosforilación de las protaminas es requerida para una apropiada condensación de la cromatina (Brewer et al., 2002). Las alteraciones en la estructura de la cromatina e integridad del ADN podrían tener implicaciones en la fertilidad masculina y podrían ejercer un efecto desfavorable en la descendencia en el caso que un espermatozoide dañado llegase a fecundar un ovocito (Evenson, 1999; Sánchez-Peña et al., 2004). Por tanto, la función principal de las protaminas es empaquetar el ADN en una cromatina muy condensada, proporcionando al núcleo espermático una extraordinaria estabilidad mecánica y química, lo que le confiere resistencia a una gran variedad de agentes químicos como ácidos fuertes, proteasas, ADN-asas y detergentes.

La descondensación del núcleo espermático, se realiza de forma natural en el ovocito posterior a la fecundación. El primer cambio visible que ocurre en el núcleo del espermatozoide después de su incorporación en el ovocito, es la rotura de la envoltura nuclear. Tras esto, el material perinuclear comienza a mezclarse con el citoplasma antes de que la descondensación se haga aparente. La cromatina entonces experimenta un proceso de descondensación que comienza en la región posterior de la cabeza espermática y avanza hasta la porción anterior (Terada et al., 2000). Contrario a lo que ocurre durante la espermiogénesis, en el proceso de fecundación se requiere que los puentes disulfuro sean rotos de manera eficiente para la formación del pronúcleo masculino. Para que se realice esta rotura se necesitan equivalentes reductores, entre los que se ha propuesto el glutatión, presente en el citoplasma del ovocito (Calvin y Bedford, 1971).

Los factores citoplásmicos, que causan la descondensación, parecen no ser específicos de la especie, debido a que diversos autores han logrado la descondensación *in vitro* del espermatozoide con factores procedentes de diferentes especies como en el caso de la especie porcina y en determinados primates (Cánovas et al., 2007; Taberner et al., 2010).

### **3.1.1.2. Cuello**

El cuello es un segmento de unión corto (1  $\mu\text{m}$ ) entre el flagelo y la cabeza espermática, compuesto de columnas segmentadas y una estructura densa y fibrosa denominada *capitulum*. Seguido del *capitulum* se encuentran los centriolos proximal y distal. Este último está ausente en el espermatozoide maduro. El cuello sirve como conector y pieza articular (Pesch y Bergmann, 2006).

### 3.1.1.3. Cola

La cola es la parte más larga del espermatozoide; sus componentes estructurales principales son: el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras externas densas y la vaina fibrosa (Figura 2.3) (Eddy, 1994; Flesch y Gadella, 2000). Puede dividirse en diversas porciones: pieza media, pieza principal y pieza terminal (Figura 2.3):

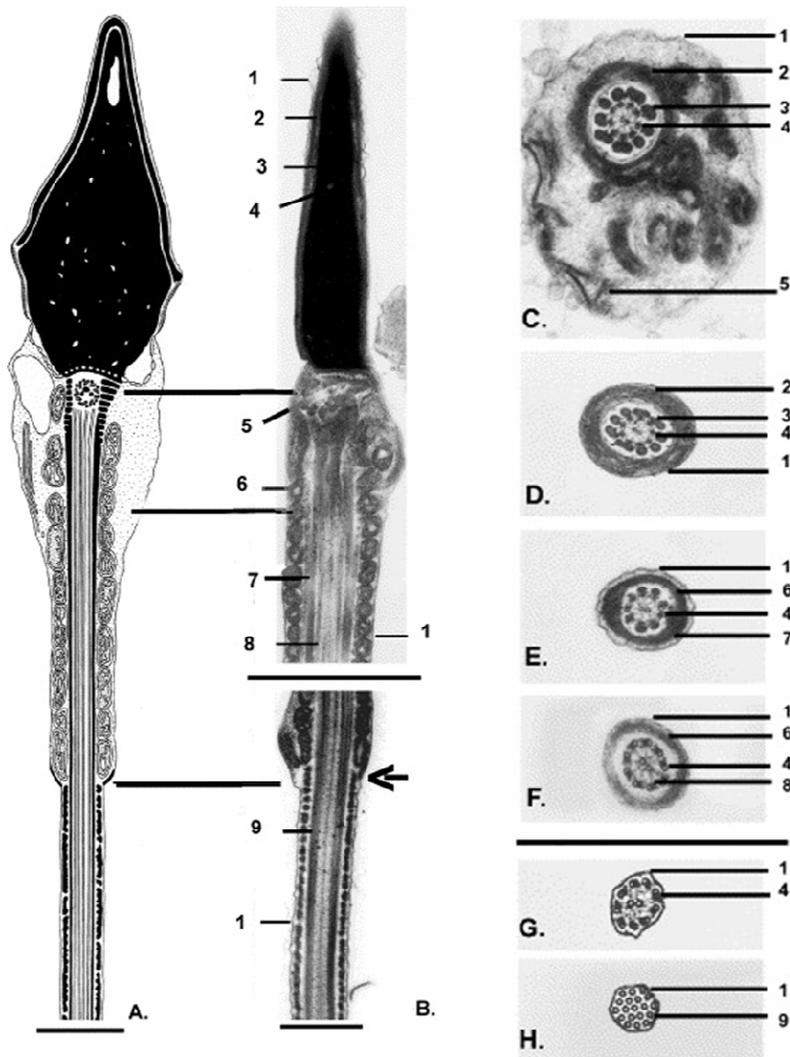
La pieza media (Figura 3.3 C-D) tiene una longitud de 4-14  $\mu\text{m}$  según la especie, siendo en la especie porcina de 10  $\mu\text{m}$  (Cummins y Woodall, 1985). Está caracterizada por la presencia de una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que rodea al complejo axonema y las fibras densas. El axonema consiste en un par de microtúbulos únicos (Figura 3.3 C-G) que están rodeados por un paquete cilíndrico de dobles microtúbulos dispuestos uniformemente (Figura 3.3 B (8), C y G (4)) (Pesch y Bergmann, 2006). El par de microtúbulos centrales está conectado con cada uno de los que le rodea mediante puentes. La membrana flagelar está firmemente adherida al anillo y previene el desplazamiento caudal de las mitocondrias durante el movimiento de la cola (Si y Okuno, 1993). La parte caudal de la vaina mitocondrial es denominada anillo de *Jensen*, e indica la barrera entre la pieza media y la pieza principal.

La pieza principal (Figura 3.3 E-F) es el segmento más largo (entre 30-50  $\mu\text{m}$ ), siendo esta longitud en la especie porcina de 30  $\mu\text{m}$ . La función principal es la de proporcionar movilidad al espermatozoide (Pesch y Bergmann, 2006).

Está constituida por vainas fibrosas, el citoesqueleto que rodea el axonema y las fibras densas del exterior. Las vainas fibrosas se constituyen principalmente de dos columnas longitudinales (dorsal y ventral) conectadas entre sí (Figura 3.3 E/F6). Estas conexiones entre las columnas son más gruesas en su aproximación a las mismas. Esta vaina finaliza bruscamente a 9-10  $\mu\text{m}$  del extremo de la cola donde la pieza principal se convierte en la pieza terminal (Figura 3.3 G).

Las proteínas constitutivas de la vaina fibrosa tienen uniones disulfuro, lo que hacen que toda la estructura de la cola sea extremadamente estable (Curry y Watson, 1995). Además, las vainas fibrosas trabajan como una estructura para las proteínas en vías de señalización, por lo que debe estar involucrada en la regulación de la maduración espermática, motilidad, capacitación, hiperactivación y/o reacción acrosómica.

La pieza terminal (Figura 3.3 G-H) es la parte distal de la vaina fibrosa donde se encuentra la parte terminal del flagelo, es una porción corta y tiene una longitud de 3  $\mu\text{m}$ . Los elementos micro tubulares del axonema terminan en esta región. La estructura de microtúbulos  $9 \times 2 + 2$ , se pierde y los 9 dobletes forman 18 microtúbulos simples (Figura 3.3H).



**Figura 3.3.** (A) Dibujo esquemático de un espermatozoide humano según Holstein y Roosen-Runge (1981), (B) Sección longitudinal de un espermatozoide de caballo (20 481×); (C)–(H) secciones transversales de la cola del espermatozoide: (C) pieza media proximal (41 680×), (D) pieza media distal (35 465×), (E)/(F) pieza principal (39 203× y 69377×, respectivamente), (G)/(H) pieza terminal (69 377×). (1) Membrana plasmática, (2) acrosoma, (3) núcleo, (4) vacuola nuclear, (5) centriolo proximal, (6) mitocondria, (7) fibras externas densas (ODF), (8) túbulo exterior doble, (9) vaina o envoltura fibrosa; (←) unión de la pieza media con la hélice mitocondrial y la pieza principal con la vaina fibrosa (Imagen tomada de Pesch y Bergmann, 2006).

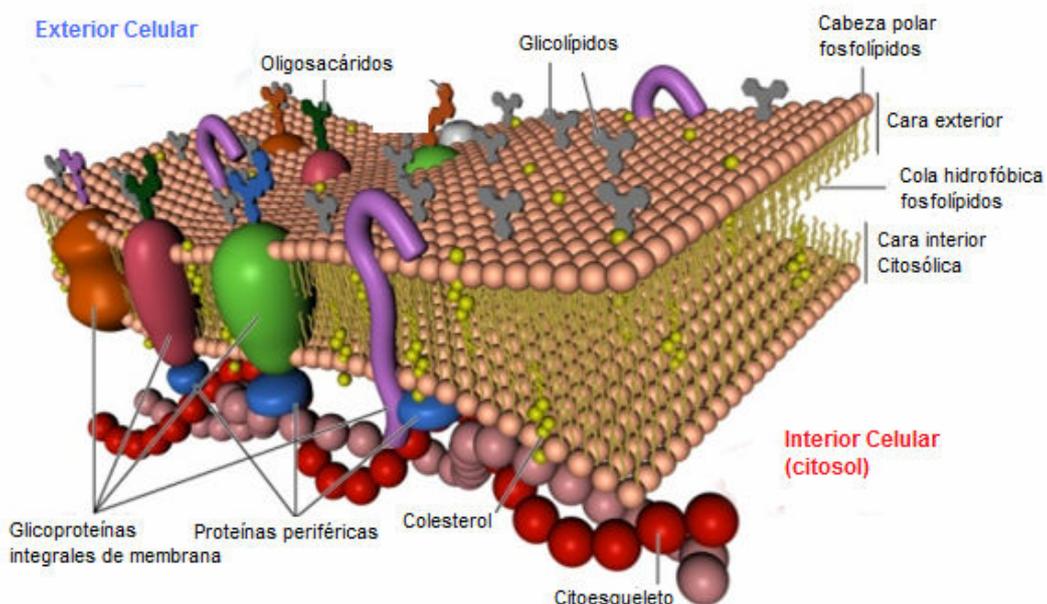
### 3.1.2. Membrana plasmática del espermatozoide

#### 3.1.2.1. Estructura

El modelo actual que describe la organización estructural de la membrana plasmática se basa en el propuesto por los científicos Garth Nicholson y S. Jonathan Singer en 1972 (revisado por Vereb et al., 2003). Este

modelo describe a la membrana plasmática como un mosaico fluido que contiene diversas proteínas embebidas en una matriz de fosfolípidos, así pues, todas las membranas biológicas son entidades dinámicas y fluidas ya que la mayoría de sus lípidos y proteínas son capaces de moverse en el plano de la membrana, además de sufrir un continuo recambio de sus componentes.

La membrana plasmática es una estructura asimétrica formada por dos monocapas que forman la bicapa lipídica. La cara externa queda expuesta al medio extracelular y está compuesta principalmente de fosfatidilcolina, esfingomiolina, oligosacáridos unidos a lípidos (glicolípidos) y a proteínas integrales de membrana (glicoproteínas). La cara interna, en contacto con el citosol, está conformada primordialmente de fosfatidietilamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Modelo de la estructura tridimensional de la membrana plasmática (Tomado de <http://biologiacelular-membranacelular.blogspot.com>).

En los mamíferos, la membrana plasmática del espermatozoide tiene una gran variedad de especializaciones y cada una de ellas tiene un papel único en la cascada de eventos, cuyo objetivo final es permitir la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con el ovocito.

Una característica importante en el espermatozoide es la subdivisión de la membrana plasmática en regiones que difieren en composición y función denominadas “dominios”, estos dominios reflejan las funciones especializadas de la superficie y de los componentes citoplasmáticos del espermatozoide (Koehler, 1978; Holt, 1984), experimentando cambios en la organización y composición de la misma durante la vida del espermatozoide (Bearer y Friend, 1981; Toshimori, 1998).

La mayoría de los dominios de superficie del espermatozoide, se establecen probablemente durante la espermiogénesis cuando las espermátidas son remodeladas a espermatozoides (Eddy, 1994). Por ejemplo, el dominio de membrana de la pieza media es modificado cuando el espermatozoide pasa por el epidídimo por medio de la migración de la gota citoplasmática desde la parte anterior al final de la parte posterior del flagelo. Así mismo, la forma de la cabeza del espermatozoide puede experimentar cambios morfológicos (Fawcett y Hollenberg, 1963; Toshimori, 1998); el acrosoma puede experimentar una reducción en su tamaño (Fawcett y Hollenberg, 1963) y las proteínas que se encuentran en la superficie de la cabeza del espermatozoide pueden migrar a otros dominios (Hunnicuttt et al., 1997).

En la cabeza hay dos subdominios de la membrana plasmática, el acrosomal y el subacrosomal. El primero cubre, como su nombre indica, el acrosoma y se caracteriza por presentar islas de colesterol y esfingolípidos anclados a proteínas integrales de la membrana plasmática, denominadas caveolinas, inmersas en una membrana “desordenada”. El segundo subdominio se encuentra en la región subacrosomal, siendo ésta rica en fosfolípidos (Flesch y Gadella, 2000).

### 3.1.2.2. Composición

Hemos dividido la composición de la membrana plasmática del espermatozoide según sus componentes en:

- Componente glicídico (Glicocalix).
- Componente lipídico: fosfolípidos, glicolípidos, lípidos neutros, lípidos *rafts* y lipoproteínas.
- Componente proteico.

#### **Componente glicídico (Glicocálix)**

La superficie de los espermatozoides de mamíferos se encuentra cubierta por una serie de moléculas ricas en carbohidratos denominada glicocálix. La determinación de la composición del glicocálix se ha realizado utilizando lectinas específicas que se unen a diferentes tipos de cadenas laterales de los azúcares (Cummings, 1994). Se estima que hay cientos de glicoproteínas formando el glicocálix, algunas de las cuales son sintetizadas en el testículo, en el epitelio de los conductos eferentes, por el epidídimo y posiblemente por las glándulas accesorias, asociándose al espermatozoide a través del tránsito de éste por los distintos conductos y su posterior almacenamiento (Flesch y Gadella, 2000).

Durante las modificaciones espermáticas previas a la fecundación, se ha comprobado que el glicocálix cambia, eliminándose determinados factores que estabilizan al espermatozoide. A pesar de que su estructura molecular es bien conocida, su papel funcional todavía no está totalmente dilucidado aunque podría jugar un papel importante en la comunicación intercelular entre gametos (Flesch y Gadella, 2000).

#### **Componente lipídico**

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos difiere en gran medida con la de las células somáticas de éstos, tanto en su composición como en sus propiedades biofísicas. La membrana plasmática de

los espermatozoides tiene niveles inusualmente altos de uniones tipo éter y lípidos con alto grado de insaturación.

Una vez los espermatozoides abandonan los túbulos seminíferos, éstos ya no tendrán síntesis lipídica (Flesch y Gadella, 2000). Sin embargo, experimentan cambios dramáticos a nivel post-testicular en la composición lipídica de la membrana plasmática durante la maduración en el epidídimo, y durante el proceso de capacitación. Los lípidos de membrana juegan un papel importante en los procesos de señalización intracelular y en el reconocimiento ovocito-espermatozoide durante el proceso de fecundación.

En general, y aunque varía entre los mamíferos, el componente lipídico de la membrana plasmática está constituido aproximadamente por un 70% de fosfolípidos, un 25% de lípidos neutros y un 5% de glicolípidos (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Los ácidos grasos libres abarcan una cantidad relativamente pequeña de los lípidos y los diacil-gliceroles están presentes en cantidades similares que los glicolípidos (Nikolopoulou et al., 1985). A continuación describimos algunos de ellos:

Fosfolípidos: los fosfolípidos de membrana se pueden dividir en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y la esfingomiélin. La fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, el ácido fosfátidico, el fosfatidilglicerol y los lisofosfolípidos se encuentran en menor proporción. Los fosfolípidos se encuentran distribuidos asimétricamente entre las capas de lípidos de la membrana plasmática. La capa exterior está enriquecida de esfingomiélin y fosfatidilcolina, mientras que la mayoría de la fosfatidiletanolamina y esencialmente todas las fosfatidilserinas se encuentran en la capa interior (Florman y Ducibella, 2006).

Lípidos neutros: los lípidos neutros (compuesto de un ácido graso con un grupo alcohol) varían en su composición según la especie, el individuo e incluso el eyaculado. El factor más variable es el contenido de colesterol en la membrana plasmática. Se ha demostrado que el contenido del colesterol y de fosfolípidos en el cerdo disminuye durante la maduración y durante el tránsito del espermatozoide en el epidídimo respectivamente, y que esta disminución

podría estar mediada por la proteína HE1 la cual une y extrae colesterol de la membrana espermática (Okamura et al., 1999). Además, el cambio en el contenido de colesterol en la membrana parece afectar a la fluidez, a la estabilidad frente al choque térmico, y a la reacción acrosómica, así como a otras funciones espermáticas (Okamura et al., 1999). Espermatozoides humanos contienen aproximadamente el doble de colesterol que los espermatozoides de verraco. El contenido celular lipídico parece estar relacionado con el tiempo de capacitación. De hecho, se ha demostrado que el colesterol es eliminado de la membrana plasmática de los espermatozoides durante la capacitación, aunque se han encontrado pequeñas cantidades de desmosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol en dicho proceso (Flesch y Gadella, 2000).

Glicolípidos: los glicolípidos están normalmente formados por un grupo glicosídico unido a una ceramida. La única excepción en vertebrados es el glicolípidido seminolípido, el cual se encuentra solo en las células espermáticas de mamíferos y las células de *Schwann*. Se sabe que después de la eyaculación, los seminolípidos pueden desulfatarse por medio de las enzimas arilsulfatasas (las cuales se originan en las glándulas accesorias) y se cree que ambos, los seminolípidos y su contraparte desulfatada participan en ciertos procesos de la fertilización (Gadella et al., 1993).

Lípidos rafts: en la membrana plasmática del espermatozoide aparecen unas estructuras, denominadas como lípidos *rafts*, las cuales están compuestas mayoritariamente de lípidos saturados, colesterol, ciertos glicolípidos y proteínas (Brown y London, 2000; Simons y Vaz, 2004). Entre las funciones que se les atribuye a estos lípidos se encuentran la de facilitar la activación de señales y regular el movimiento en la membrana (Simons y Toomre, 2000). De este modo, a través de estos lípidos anclados en la membrana se produce la transducción de señales hacia el interior de la célula promoviendo el incremento de segundos mensajeros y por tanto, la activación y la respuesta celular (Alonso y Millán, 2001).

Lipoproteínas: las moléculas lipídicas pueden extraerse o intercambiarse de la membrana plasmática por lipoproteínas específicas y por proteínas lipídicas de transferencia. Este proceso parece jugar un papel importante en la modificación de la composición de los lípidos extracelulares de la membrana espermática durante la capacitación (Leblond et al., 1993; Ravnik et al., 1995). Otro tipo de interacción relevante, es la interacción entre lípido y proteína que resulta de la adhesión a la membrana. Estas interacciones se pueden realizar de diversas maneras como por medio de enlaces covalentes entre las proteínas a las cadenas de ácidos grasos (ejemplo: proteolípidos que contienen ácido mirístico), anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) o interacciones protéicas electrostáticas con cabezas lipídicas (grupo de fosfocolina o residuos glicosídicos de glicolípidos) lo que contribuye a la capacidad fecundante de las células espermáticas (Flesch y Gadella, 2000).

### **Componente proteico**

En los mamíferos, las proteínas de la membrana plasmática celular constituyen cerca del 40% de su masa total, siendo estructuralmente más grande que los lípidos, pero en menor cantidad, es decir por cada molécula proteica hay 50 moléculas lipídicas, pero la mayoría de las funciones específicas son llevadas a cabo por las proteínas. Éstas, en su conformación, pueden estar separadas o bien formando grandes complejos.

El papel de dichas proteínas es diverso, pero es bien conocido que son las mayores controladoras de la función celular. Las proteínas transmembrana abarcan la bicapa en su totalidad debido a la presencia de uno o más tramos de aminoácidos hidrofóbicos. Estas proteínas son componentes integrales de la membrana y únicamente son solubles en presencia de detergentes (Jones, 1998).

Entre las moléculas de la membrana que permiten el flujo de los iones a través de la membrana tenemos las que forman los *canales iónicos*. Los canales iónicos son proteínas que forman un poro a través del cual los iones atraviesan las membranas de manera regulada y con gran eficiencia (~10<sup>7</sup> iones/seg) (Darszon et al., 2006). Las proteínas que forman canales de calcio

(Ca<sup>2+</sup>) están localizadas en regiones específicas de la membrana plasmática del espermatozoide y participan en la regulación homeostática del Ca<sup>2+</sup> el cual es requerido para varias funciones espermáticas; un ejemplo de esta regulación es la acción de una proteína de seis segmentos transmembra denominada CatSper1. En el ratón se ha determinado que ésta proteína regula la entrada de Ca<sup>2+</sup> y se encuentra en la membrana plasmática de la región principal del flagelo espermático (Carlson et al., 2003). Se ha descrito que si se bloquea el gen CatSper1 se provoca infertilidad masculina debido a un fallo en el espermatozoide para lograr hiperactividad y motilidad (fenómenos dependientes de calcio) (Carlson et al., 2003).

Otro grupo de canales de iones de Ca<sup>2+</sup> están presentes en la membrana plasmática de la pieza principal (Ca<sub>v</sub> 1.2, Ca<sub>v</sub> 2.2 y Ca<sub>v</sub> 2.3), del acrosoma (Ca<sub>v</sub> 1.2 y Ca<sub>v</sub> 2.2) y la región post acrosomal (Ca<sub>v</sub> 2.3) del espermatozoide de ratón (Darszon et al., 2006). El bloqueo de la subunidad (α1E) del canal Ca<sub>v</sub> 2.3, da como resultado un aumento en los parámetros de linealidad y velocidad de la motilidad espermática, lo que sugiere que los canales de calcio juegan un papel importante en la regulación de la motilidad y la hiperactivación del espermatozoide (Sakata et al., 2002).

## **3.2. TRÁNSITO ESPERMÁTICO EN EL EPIDÍDIMO: MADURACIÓN ESPERMÁTICA.**

Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo hacia el conducto deferente sufre una serie de modificaciones físicas y químicas que le confieren determinadas características conocidas como “maduración espermática”.

### **3.2.1. Modificaciones físicas del espermatozoide durante la maduración**

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

debido en gran medida a la falta de maduración de su membrana plasmática (Yanagimachi, 1994a). Se ha observado que los espermatozoides pasan de ser inmóviles a experimentar un movimiento circular no progresivo, hasta llegar a ser lineal y progresivo en regiones más distales del mismo (Blandau y Rumery, 1964; Hinton et al., 1979). El porcentaje máximo de espermatozoides móviles se consigue en la cabeza del epidídimo en roedores (Yeung et al., 1992), y más distalmente en el verraco (Chevrier y Dacheux, 1992).

Una vez que los espermatozoides se separan de las células de *Sertoli*, presentan una cantidad de citoplasma residual de las espermátidas retenida por las células de *Sertoli* y otra porción que se queda unida al espermatozoide, formando la gota citoplasmática (Chenoweth, 1997). Durante la maduración epididimaria la gota citoplasmática va a migrar desde la pieza de conexión al anillo de *Jensen* (Bedford, 1975) y concretamente en la especie porcina esta migración de la gota citoplasmática tiene lugar durante el tránsito por el cuerpo del epidídimo (Harayama y Kato, 1992) y va a ser liberada durante la eyaculación (Kato et al., 1996). La presencia de una elevada proporción de espermatozoides con gotas citoplasmáticas en el eyaculado se asocia comúnmente con alteraciones en la maduración epididimaria y con una capacidad fecundante reducida (Gómez et al., 1996; Keating et al., 1997).

### **3.2.2. Modificaciones químicas del espermatozoide durante la maduración**

Entre las modificaciones que puede experimentar el espermatozoide durante su maduración se encuentran (Cuasnicú et al., 1984; Cooper, 1998)

- Cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana y cantidad de colesterol en proporción a los fosfolípidos.
- Incremento de las uniones disulfuro.
- Incremento de la carga neta negativa de la superficie.
- Re-localización de antígenos de superficie.
- Modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie.

En relación a las modificaciones proteicas se observa que muchas de estas proteínas están asociadas a la superficie del espermatozoide y poseen anclajes glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), como por ejemplo, hialuronidasa y SPAM 1 en el ratón (Zhang y Martin-Deleon, 2003), P26h en hámster (Légaré et al., 1999) o la P25b en el toro (Frenette y Sullivan, 2001).

Las proteínas de origen epididimario y las que se encuentran ancladas a la membrana plasmática por GPI, son secretadas por un mecanismo aún desconocido (Kirchhoff y Hale, 1996). Estudios recientes muestran que las proteínas secretadas por el epidídimo, pueden incorporarse dentro de sub-compartimentos intracelulares de la célula espermática (Sullivan et al., 2007). Estas observaciones sugieren que dichas proteínas son transferidas al espermatozoide por mecanismos aún desconocidos en la célula (Cooper, 1998). Se ha observado que estas proteínas son incorporadas al espermatozoide mediante epididimosomas, los cuales son pequeñas vesículas membranosas electrodensas, que son secretadas de forma apocrina por las células del epitelio epididimario con un tamaño de 50-500 nm de diámetro, ricas en colesterol y lípidos *rafts* (Sullivan et al., 2005).

Los cambios en el contenido lipídico y la distribución en el espermatozoide ocurren durante la maduración epididimaria. Estos cambios pueden llegar a tener efectos significativos en la composición y la función de la membrana en diferentes dominios. El contenido total de lípidos del espermatozoide disminuye durante la maduración epididimaria en el toro, rata, carnero y en cerdo (Dawson y Scott, 1964; Aveldaño et al., 1992). En el cerdo este concepto de disminución de los lípidos de membrana durante la maduración epididimaria, ha sido estudiado y confirmado por otros experimentos en hámster, cabra y rata, en donde se ha aislado membranas plasmáticas de espermatozoides, demostrando que el contenido de colesterol disminuye en el espermatozoide (Hall et al., 1991; Rana et al., 1991; Awano et al., 1993). Debido a esto se podría pensar que los cambios en la cantidad de los lípidos de membrana durante la maduración explicaría porque los espermatozoides de eyaculado son más sensibles a los cambios bruscos de

temperatura, que los espermatozoides procedentes del testículo en el caso del toro y el carnero (Voglmayr et al., 1971; Vijayasathy y Balaram, 1982).

En relación a las proteínas testiculares del espermatozoide, éstas serán eliminadas o sufrirán degradación mediante diversas enzimas proteolíticas, como ocurre con diferentes miembros de la familia ADAMs (Blobel, 2000), hialorunidasa (pH20/2B1) (Seaton et al., 2000) y la forma germinal de la enzima convertidora de la angiotensina (Gatti et al., 1999), las denominadas espermadhesinas (AQN, AWN, PSPI/PSP II) (Töpfer-Petersen et al., 1998).

Por otro lado, un gran número de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo (principalmente en la región de la cabeza y el cuerpo) serán integradas en la membrana espermática durante su tránsito por el epidídimo (Gatti et al., 2004; Dacheux et al., 2005). Un ejemplo de este proceso se encuentra en la proteína AWN1, la cual se adhiere a la membrana del espermatozoide en el epidídimo, mientras que tras la eyaculación se unirían moléculas no agregadas de AWN1 y AQN3 sobre las cuales se unirían el resto de agregados de espermadhesinas (Dostàlovà et al., 1995) como el heterodímero PSP-I/PSP-II (Caballero et al., 2007).

### **3.2.3. Fluido epididimario**

El fluido que aparece en el epidídimo procede tanto de la secreción producida a nivel de testículo como la producida en el propio epidídimo. Las células de *Sertoli* secretan el fluido testicular que transporta a los espermatozoides desde los túbulos seminíferos a los conductos eferentes, donde la mayor parte del fluido testicular es absorbido (Tuck et al., 1970; Mruk y Cheng, 2004). Por otro lado, el epidídimo es el encargado del transporte, concentración y maduración espermática, y para realizar estas funciones, su epitelio secreta un fluido formado por agua, iones inorgánicos y moléculas orgánicas, principalmente proteínas.

Por tanto, la formación del fluido luminal es el resultado de la reabsorción y secreción a lo largo del conducto del epidídimo. Estos procesos

de secreción y de absorción son producidos por la entrada de agua a través del epitelio; este flujo es posible porque el epitelio que reviste los conductos eferentes epididimarios tiene una elevada permeabilidad al agua (Wong y Huang, 1989). Por otro lado, la composición proteica en el epidídimo esta mayormente ligada a la actividad secretora del epitelio (Dacheux et al., 2003). Esta secreción esta mediada por transportadores situados en la membrana basolateral de las células epiteliales (Wong, 1989). Por lo tanto, el fluido luminal va cambiando de forma continua mientras los espermatozoides van moviéndose a lo largo del conducto (Turner, 1991). Además, se produce la secreción de macromoléculas que se unen al espermatozoide maduro, secreción de iones de bajo peso molecular y osmolitos orgánicos que proporcionan al espermatozoide la capacidad de regular su volumen o mantenerlo en reposo (bajos niveles de  $\text{Na}^{2+}$  y altos de  $\text{K}^+$ ) (Ching-hei, 2006).

#### **3.2.3.1. Proteínas del fluido luminal**

A medida que el espermatozoide va viajando a través del epidídimo encuentra una gran variedad de ambientes, y la membrana plasmática del espermatozoide sufrirá una reestructuración de la composición de proteínas y fosfolípidos. Como ya hemos mencionado anteriormente la mayor parte de las proteínas testiculares serán eliminadas, pero a su vez otras nuevas proteínas epididimarias serán incorporadas a la membrana plasmática (Gatti et al., 2004; Dacheux et al., 2005)

Además, la superficie de la membrana del espermatozoide también puede sufrir cambios por la actividad enzimática de distintas proteínas del fluido epididimario, debido a las altas concentraciones de diversas enzimas secretoras como las glicosidasas, fosfatasas y proteasas. Las principales glicosidasas secretadas son la manosidasa, hexosaminidasa, galactosidasa, glucosidasa y glucuronidasa (Dacheux et al., 2005). Muchas proteasas e inhibidores de proteasas también se han encontrado en diversas zonas del tubo epididimario. Muchas de estas enzimas como las catepsinas (D, S y procathepsina L) y metaloproteasas de matriz (MMP 2-3-9), son directamente secretadas en el epidídimo de cerdo. La acrosina también se encuentra en el

fluido pero proviene del acrosoma de células espermáticas muertas (Dacheux et al., 2005).

En el epidídimo proximal los espermatozoides están sujetos a la acción de ciertas enzimas que modifican la membrana y a otras proteínas, posteriormente permitirán la fusión del espermatozoide con el ovocito. En la parte media de la región del epidídimo otro grupo de proteínas se vuelven activas, en ésta región predominan las proteínas asociadas con el transporte del esteroide (HE1) (Okamura et al., 1999). Estas proteínas modifican la membrana de manera que permite la integración de proteínas ancladas GPI para la unión a la zona pelúcida. En la parte más distal del epidídimo, los espermatozoides encuentran un incremento en la concentración de proteínas del tipo glicosidasas y proteasas, las cuales están involucradas en la unión a zona y la fusión con el ovocito. Además de estos componentes, también se encuentran diversos factores (conocidos como factores decapacitantes) que facilitan la supervivencia espermática y evitan reacciones acrosómicas espontáneas después de la eyaculación (Cooper y Yeung, 2006a; Cooper y Yeung, 2006b; Yeung, 2006).

A través de proteómica y con la ayuda de los avances técnicos como la microperfusión, micropunción de fluidos epididimarios y la neosíntesis *in vivo/in vitro* de proteínas radioactivas (Syntin et al., 1996; Fouchécourt et al., 2000), se ha estimado el número total de proteínas secretadas por el epitelio epididimario en varias especies. En el cerdo se ha descrito que un total de 125 proteínas epididimarias son secretadas (Syntin et al., 1996). Todos estos estudios demuestran que la actividad secretora del epidídimo es muy activa y que al menos varios cientos de proteínas secretadas interaccionan entre sí.

### **3.3. EL EYACULADO**

El eyaculado se define como el conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de todos los animales. Se describe como un líquido blanquecino que es expulsado a través

del pene durante la eyaculación. Está compuesto por espermatozoides y plasma seminal que se forma por el aporte de los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata, glándulas de *Cowper* o bulbouretrales y glándulas de Litre) en el cerdo.

En la especie porcina, el volumen promedio del eyaculado es de 200-300 ml, con una concentración media de  $250-300 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Martín, 1982). Menos del 10% del volumen del semen de una eyaculación corresponde a los espermatozoides, y el resto se corresponde con el líquido seminal. Posee un color normalmente blanco lechoso o levemente amarillento, por las flavinas provenientes de las vesículas seminales. Y tiene un pH aproximado de 7.5. Durante la eyaculación porcina podemos distinguir diferentes fracciones:

- Primera fracción o pre-espermática: se corresponde con un volumen aproximado de 10 ml, es de consistencia mucosa, transparente y no presenta espermatozoides. Procede de las secreciones de la próstata, vesículas seminales y algunos grumos procedentes de las glándulas de *Cowper*. La función de esta fracción parece ser de limpieza del canal de la uretra.
- Segunda fracción o espermática: está constituida por espermatozoides y secreciones de las vesículas seminales y de la próstata. Tiene un color blanquecino lechoso, y una gran concentración de espermatozoides que varía de  $0.5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  células/ml. El volumen oscila de 30 a 100 ml dependiendo de los factores que influyan en la producción espermática.
- Tercera fracción o post-espermática: formada por una pequeña cantidad de espermatozoides. Contiene principalmente las secreciones de la glándula prostática y de las glándulas de *Cowper*. Es de color blanquecino con grumos gelatinosos y tiene una concentración menor de  $0.1 \times 10^6$  espermatozoides/ml. El volumen aproximado de esta fracción es de 200 ml (Martín, 1982).

### **3.3.1. Plasma seminal**

El plasma seminal se define como el medio líquido en el cual los espermatozoides se encuentran inmersos tras la eyaculación. Está compuesto por la secreción de las glándulas accesorias y la secreción proveniente de epidídimo y testículo. La proporción aproximada en que intervienen en la formación del plasma seminal de verraco es: próstata 55-70%, glándulas de Cowper 10-25%, vesículas seminales 15-20%, el testículo y epidídimo alrededor de un 2%.

Básicamente su composición es: agua, iones orgánicos, azúcares, sales orgánicas, ácido cítrico, prostaglandinas y un número variado de proteínas. El plasma seminal sirve como medio tampón, mantiene la osmolaridad y es una fuente de energía para el metabolismo de las células espermáticas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

#### **3.3.1.1. Secreción de las glándulas sexuales accesorias**

Durante la eyaculación, los espermatozoides procedentes del epidídimo entran en contacto con las distintas secreciones procedentes de las glándulas accesorias que en la especie porcina son tres: vesicales, próstata y bulbouretrales o de Cowper (Hafez, 1993). Las sustancias producidas por estas glándulas es especie-específico y muy variable entre individuos de una misma especie e incluso entre eyaculados de un mismo individuo (Cardozo et al., 2006).

En la composición del plasma seminal encontramos iones como el Zinc ( $Zn^{2+}$ ), el cual funciona como estabilizador de macromoléculas y como agente antibacteriano (Strzezek et al., 1987) y el calcio, que participa en los procesos de capacitación espermática y reacción acrosómica (Visconti et al., 2002). Por otra parte, los azúcares como la fructosa y otros componentes como el inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico proporcionan una fuente de energía para las células (Voglmayr y Amann, 1973; Frei et al., 1990). Los aminoácidos como el ácido glutámico, carnitina, taurina e hipotaurina realizan esta función y además

proporcionan a la célula protección contra sustancias oxígeno reactivas (Strzezek, 2002). Enzimas como las proteasas, acrosina, nucleasas, fosfatasa ácida y alcalina y superóxido dismutasa, intervienen en el proceso de licuefacción seminal, penetración del ovocito y digestión de espermatozoides muertos y/o dañados (Harrison, 1974; Zini et al., 1993).

### **3.3.1.2. Proteínas del plasma seminal**

Tal y como se ha descrito anteriormente, el plasma seminal en los mamíferos es una mezcla compleja de secreciones originadas desde el testículo, el epidídimo y las glándulas accesorias masculinas. Contiene una amplia variedad de compuestos inorgánicos, orgánicos y proteínas, éstas últimas forman parte importante del plasma seminal. Durante la eyaculación, las proteínas del plasma seminal se unen a la superficie espermática formando las capas proteicas que posteriormente serán reorganizadas durante las siguientes etapas de la reproducción. Entre las propiedades multifuncionales de las proteínas del plasma en los procesos reproductivos destacamos (Strzezek, 2002):

- Modulación de la función espermática durante el transporte en el tracto reproductivo y la fecundación del ovocito.
- Actividad inhibitoria y de estabilización de los sistemas enzimáticos y la cromatina espermática.
- Propiedades inmunosupresivas e inmunomoduladoras.
- Control de la actividad enzimática en el metabolismo espermático.
- Formación del reservorio espermático en el oviducto y en la capacitación espermática (Talevi y Gualtieri, 2010).

En la superficie celular ocurren numerosas modificaciones tras la eyaculación y durante el transporte del espermatozoide en el interior del genital de la hembra. La unión y desunión de proteínas en el espermatozoide parece estar asociado con los procesos de capacitación y decapitación, respectivamente. Se ha comprobado que la unión de factores procedentes del plasma seminal al espermatozoide estabiliza los componentes de la membrana

plasmática, enmascara antígenos de superficie y previene de reacciones acrosómicas espontáneas.

Las proteínas del plasma seminal se pueden dividir en 3 grandes grupos de acuerdo a sus propiedades químicas (Töpfer-Petersen et al., 2005):

- Proteínas con el dominio fibronectina tipo II (Fn-II).
- Espermadhesinas.
- Proteínas secretadas ricas en cisteína (CRISP).

La familia de **proteínas Fn-II** ha sido localizada en numerosas especies domésticas, como el vacuno, caprino, bisonte, carneros, equino y porcino (revisado por Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005b; Caballero et al., 2007). Recientemente se ha enfatizado sobre la función y estructura de un grupo de proteínas del plasma seminal encontradas en el bovino. Éstas proceden de una familia de proteínas de unión a lípidos llamadas colectivamente BSP (*Bovine Seminal Plasma Proteins*), y han sido designadas como BSP-A1, BSP-A2 y A3, y BSP-30-kDa (Manjunath y Thérien, 2002).

Las proteínas BSP-A1, BSP-A2 y A3, son aparentemente cadenas de polipéptidos sencillas con un rango de peso molecular de 15.5 a 16.5 kDa. La proteína BSP-30-kDa tiene un peso molecular de 28 a 30 kDa (Manjunath y Thérien, 2002). La BSP-A1 y A2, poseen una secuencia de aminoácidos idéntica y la diferencia entre una y otra radica en el grado de glicosilación. Sobre la función de las BSP se han propuesto algunos modelos, uno de ellos se refiere a que posiblemente las uniones de las proteínas BSP a las células espermáticas se pierden después de su interacción con las células epiteliales del oviducto (Gwathmey et al., 2006b).

En porcino se ha visto la existencia de una proteína homóloga a la BSP denominada pB1, esta proteína representa aproximadamente el 1% de las proteínas totales del plasma seminal del cerdo. Contiene 105 aminoácidos, posee diferentes glicofomas y tiene un peso molecular entre 12.6-13.4 Kda según el estado de glicosilación (Calvete et al., 1997). Las proteínas BSP y pB1

comparten una secuencia similar del 35%-65%. Al igual que las proteínas BSP, la pB1 contiene un tándem de dominios de fibronectina tipo II y se une a heparina, condroitinsulfato, fosforilcolina y a los espermatozoides epididimarios de cerdo (Jonáková et al., 1998; Jonáková et al., 2000).

Tras la eyaculación, las proteínas tipo Fn-II se unen al espermatozoide mediante interacciones específicas con los residuos de colina de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide (Desnoyers y Manjunath, 1992; Müller et al., 1998). Al mismo tiempo se produce una eliminación de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática produciéndose una reorganización estructural de la misma. La unión de estas proteínas podría prevenir el movimiento de fosfolípidos estabilizando la membrana plasmática. Estas proteínas presentan además la capacidad de unión con lipoproteínas de alta y baja densidad, así como con heparina, la unión con estas sustancias presentes en el oviducto de la hembra podría provocar una segunda salida de colesterol y la disminución del ratio colesterol/fosfolípido (revisado por Caballero et al., 2007).

Las **espermadhesinas** pertenecen a una familia de glicoproteínas con un bajo peso molecular de entre 12 y 16 kDa, y son el principal componente proteico del plasma seminal en el verraco. Esta familia de proteínas está conformada por una gran diversidad de miembros como la AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I (proteína seminal porcina) y PSP-II, además de las isoformas glicosiladas AQN-3, AWN, PSP-I y PSP-II (Töpfer-Petersen et al., 1998; Töpfer-Petersen, 1999a), y la isoforma acetilada de AWN (revisado por Caballero et al., 2007).

Las espermadhesinas forman una capa protectora alrededor del área de la cabeza del espermatozoide durante la eyaculación estabilizando la membrana plasmática (Sanz et al., 1992; Töpfer-Petersen et al., 1998). La asociación en la membrana de las moléculas de espermadhesinas a la superficie del espermatozoide podría también estar involucrado con el establecimiento del reservorio espermático en el oviducto (Suárez, 2001; Talevi y Gualtieri, 2010).

La interacción bioquímica de la AQN-3 y AWN está caracterizada por su unión a los fosfolípidos de la bicapa de la membrana plasmática del espermatozoide (Dostàlovà et al., 1995; Töpfer-Petersen et al., 1995) y esto depende del grado de agregación de las moléculas, es decir, solo los monómeros de AWN y AQN-3 son capaces de mostrar una unión específica a los fosfolípidos. Por otra parte, la glicosilación de las PSP baja la actividad de la unión de carbohidratos, mientras que la conformación de los heterodímeros de PSP-I y PSP-II modulan las uniones afines a heparina (Töpfer-Petersen et al., 1998). También se ha demostrado *in vivo* que, cuando el espermatozoide se encuentra en el oviducto e interacciona con el ovocito, la AWN aun se encuentra unida fuertemente a la membrana espermática (Rodríguez-Martínez et al., 1998).

En relación a las espermadhesinas PSP-I/PSP-II y su afinidad por la ZP existen contradicciones en la literatura, unos autores encontraron afinidad del heterodímero PSP-II por la ZP (Calvete et al., 1995), mientras que otros no (Jonáková et al., 2000).

En conjunto, las espermadhesinas demuestran un amplio rango de funciones diferentes estrechamente vinculadas con los diferentes pasos de la fecundación: como en la unión primaria de los gametos masculinos a las células epiteliales (Töpfer-Petersen, 1999b) ó prevenir las reacciones acrosómicas prematuras. Otras proteínas involucradas en la unión a la ZP están la lactadherina (P47), las zonadhesinas, la galactosil transferasa, McABs y la proteína de 95 kDa la cual debido a su reciente conocimiento aún no tiene un nombre específico.

Los miembros de la familia de proteínas **CRISP** (CRISP1, CRISP2, CRISP3) se caracterizan por la presencia de 16 residuos de cisteína que formarán 8 puentes de disulfuro, subdividiendo la molécula en 3 dominios (Töpfer-Petersen et al., 2005). La función de estas proteínas en la reproducción parece estar relacionada con los procesos de espermiogénesis, maduración del espermatozoide, capacitación espermática y en la unión del espermatozoide con el ovocito (revisado por Caballero et al., 2007). Las proteínas CRISP han

sido encontradas en las regiones post-acrosomal, ecuatorial y en la pieza intermedia de los espermatozoides, incluso tras los procesos de capacitación *in vitro* y reacción acrosómica, lo que hace pensar en una posible relación con el proceso de fusión entre el espermatozoide y el ovocito (Caballero et al., 2007).

La proteína denominada CRISP1 parece estar relacionada con los procesos de maduración e inhibición prematura de la capacitación espermática, además de ser necesaria para la fusión del espermatozoide con el ovocito (Udby et al., 2005).

La proteína CRISP2 se produce específicamente en el testículo y su función parece estar relacionada con el desarrollo de las espermátidas, siendo responsable de la adherencia de éstas a las células de *Sertoli* (Maeda et al., 1999).

La proteína CRISP3 se encuentra en diferentes tejidos del organismo. En la especie equina se caracteriza por ser una de las proteínas con mayor concentración en el plasma seminal (1 mg/ml). Töpfer-Petersen et al. (2005) demostraron que esta proteína se liberaba tras el lavado de los espermatozoides por lo que al parecer podría tener alguna función específica en el tracto genital de la hembra.

Además de estas 3 grandes familias de proteínas, también se han descrito algunas otras como son: la glicoproteína 54, la fosfotirosina fosfatasa ácida, la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, proteína inhibidora de proteinasas y el factor inhibidor de la motilidad espermática (SMIF), entre otros (revisado por Strzezek, 2002).

### 3.4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides de mamíferos no son capaces de fecundar al ovocito inmediatamente después de la eyaculación, el espermatozoide adquiere su capacidad fecundante después de permanecer en el tracto genital femenino un período de tiempo más o menos largo (Austin, 1951; Chang, 1951). Este intervalo entre la deposición de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra y la fecundación se denominó “*capacitación*” (Austin 1952). Hoy en día, la capacitación se define como una serie de modificaciones funcionales y moleculares que tienen lugar en el espermatozoide que le confiere la capacidad de fecundar el ovocito. En condiciones *in vivo* tanto el tracto reproductivo del macho como de la hembra influyen en dichas modificaciones. No obstante, la capacitación, bajo determinadas condiciones también puede ser reproducida *in vitro* (ver apartado 3.4.4.) en un gran número de especies, variando el grado de éxito entre ellas. Por otro lado, la capacitación espermática requiere un periodo de tiempo el cual puede oscilar entre 1 a 7 horas dependiendo de la especie (Tabla 3.1).

Nombre común	Tiempo requerido para la capacitación (horas)
Ratón (Austin, 1952), Gato (Hamner et al., 1970) Carnero (Davis, 1981)	1-2
Toro (Parrish et al., 1988) Hámster dorado (Austin y Bishop, 1958a) Rata (Bedford, 1970)	2-4
Conejo (Austin, 1985) Cerdo (Hunter y Hall, 1974a; b) Caballo (Odeh et al., 2003)	5-6
Hombre (Davis, 1981)	6-7

**Tabla 3.1.** Intervalos de tiempo requeridos para que se produzca la capacitación *in vitro* en algunas especies de mamíferos.

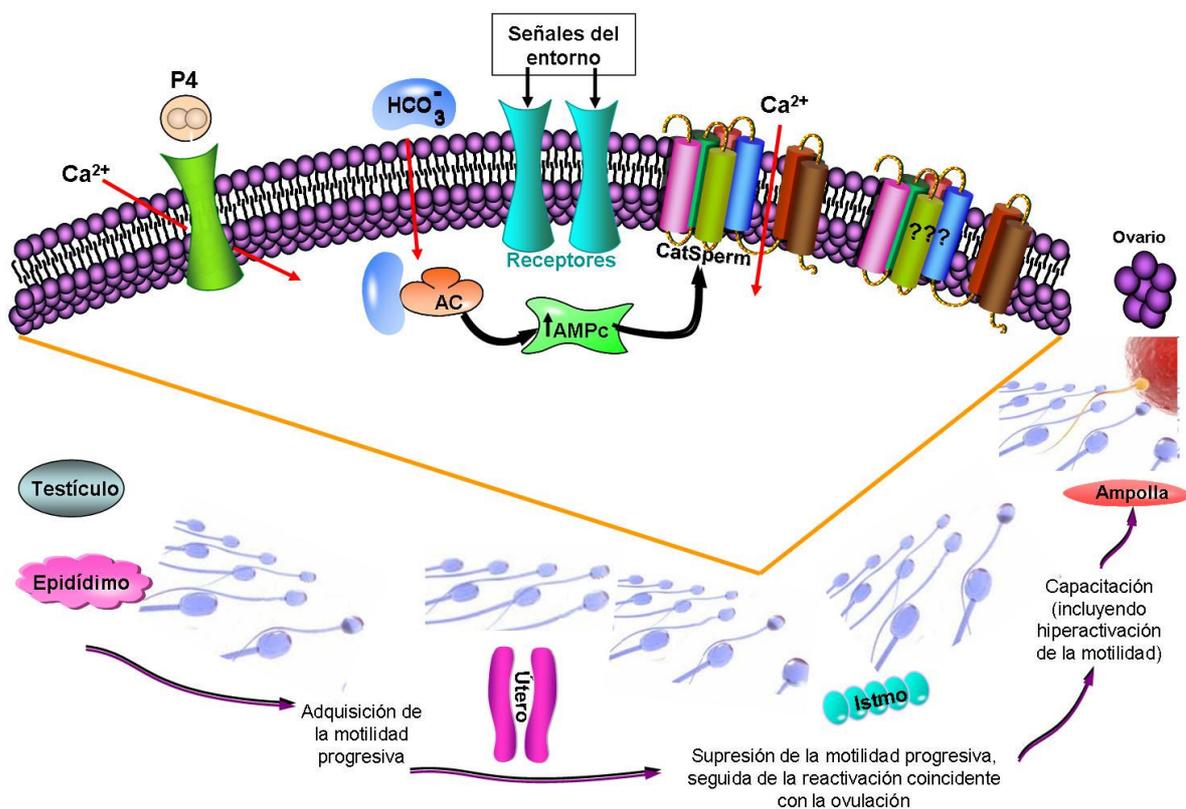
### **3.4.1. Transporte espermático en el tracto genital de la hembra**

Tras la monta o la inseminación artificial, millones de espermatozoides son depositados en el tracto genital femenino, de los cuales solo una pequeña proporción es capaz de alcanzar el oviducto (Rodríguez-Martínez et al., 2005; Holt, 2009). Durante el ascenso por el tracto reproductivo la mayoría de los espermatozoides (>70%) son eliminados en la luz uterina (Viring y Einarsson, 1980), ya sea mediante el reflujo retrogrado (25-45%) (Matthijs et al., 2000; Matthijs et al., 2003) o por acción de los polimorfonucleares (Rozeboom et al., 1999). Esta eliminación se encuentra mediada principalmente por leucocitos que migran al lumen procedentes del endometrio en los primeros 30 min tras la monta (Matthijs et al., 2003). Hay varios factores implicados que inician esta respuesta, como la propia distensión uterina, los espermatozoides o el plasma seminal (Bischof et al., 1994). Proteínas como el heterodímero glicosilado PSP-I/PSP-II posee actividad inmuno-estimuladora, y es capaz de inducir la migración de leucocitos (Leshin et al., 1998). Ese periodo de latencia hasta que se produce la migración al lumen uterino, permite que cierta población espermática atraviese el útero y no sea fagocitada (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Durante dicho ascenso se produce también la progresiva y coordinada modificación de ciertos factores procedentes del plasma seminal que están unidos a la superficie plasmática del espermatozoide (Hunter y Rodríguez-Martínez, 2004). Estos, previenen capacitaciones prematuras, intervienen en la tolerancia inmunitaria, a la vez que están involucrados en la unión con las células oviductales (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Finalmente solo una pequeña proporción atravesará la unión útero-tubárica.

### **3.4.2. Motilidad y reservorio espermático en el oviducto**

Una vez que los espermatozoides se hayan en la porción caudal del istmo, la población de células motiles se encuentran con una secreción viscosa glicoproteica que modificará la superficie del espermatozoide (Johansson et al., 2000; Rodríguez-Martínez et al., 2001). La motilidad progresiva disminuye en este medio viscoso facilitando la adhesión del espermatozoide al epitelio

(Figura 3.5). Estudios experimentales en animales domésticos como la cabra, vaca y cerdo han demostrado que en el periodo pre-ovulatorio (entre 25-40 h) los espermatozoides son incapaces de moverse y permanecen unidos y retenidos hasta cerca de la ovulación (Figura 3.5), es el denominado reservorio espermático (RS). Sin embargo, entre 1-2 h antes de la ovulación, un restringido número de espermatozoides en el RS comienzan a reactivarse y liberarse de su unión progresando hacia el sitio de fecundación (Hunter, 2008). Conforme los espermatozoides se activan y son liberados, se incrementa progresivamente su número hacia la unión ampular-istmica. En el cerdo, alrededor de unos 4.000-5.000 espermatozoides pueden ser almacenados en cada istmo antes de la ovulación. Esta breve descripción de la actividad espermática en la porción caudal del istmo sugiere que hay una influencia ovárica sobre los tejidos del conducto y sobre las células retenidas (Hunter, 2008).



**Figura 3.5.** Transporte y cambios fisiológicos de la célula espermática desde el epidídimo hasta su llegada al oviducto.

En el RS, la mayoría de los espermatozoides mantiene una ultraestructura y viabilidad normales (Rodríguez-Martínez et al., 1990b; Mburu et al., 1997). Varios factores son los involucrados en la formación de este reservorio, como por ejemplo:

- Estrechez del lumen del oviducto (Hunter, 1984).
- Presencia de un moco viscoso (Johansson et al., 2000).
- Baja temperatura (Hunter y Nichol, 1986).
- Ambiente enzimático e iónico propios (Rodríguez-Martínez et al., 1991).
- Unión selectiva de los espermatozoides al epitelio (Fazeli et al., 1999).
- Componentes específicos del fluido (Tienthai et al., 2004).

La unión se produce por contacto directo mediante una interacción ligando-receptor entre las moléculas presentes en la zona apical del espermatozoide y los carbohidratos de la membrana plasmática de las células oviductales. Dicha unión es especie-específico (Lefebvre et al., 1997; Suárez, 1998) y es un proceso reversible que involucra diferentes azúcares en todas las especies estudiadas (Dobrinski et al., 1996; Suárez, 1998).

La liberación secuencial de un pequeño número de espermatozoides desde el RS hacia la unión ampular-ístmica, asegura la fecundación de los ovocitos en un intervalo de tiempo, incluso si la ovulación se produce en un periodo largo de tiempo (Rodríguez-Martínez et al., 2008). La progresión del espermatozoide en el tracto genital femenino durante el período periovulatorio es un complejo sistema que concierne diversos procesos como la apertura del lumen oviductal debido al descenso de los niveles hormonales, disolución del mucus rico en hialuronato, hiperactivación espermática, incremento del flujo del fluido tubal y redirección de las contracciones uterinas (Rodríguez-Martínez et al., 1998).

Todavía no se ha determinado con exactitud cual/es son los mecanismos implicados que inducen la liberación de los espermatozoides del RS en la especie porcina. Por ejemplo, se ha demostrado en la especie porcina, que la adicción de AQN1 [de la familia de las espermadhesinas unida a través de fosfolípidos a la membrana espermática del espermatozoide (Calvete et al., 1997), reconociendo diferentes carbohidratos como manosa y galactosa (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005a)] inhibe la unión del espermatozoide a las células epiteliales de explantes oviductales de manera dosis dependiente (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005a). Además, los sitios de unión están localizados en la región apical de la cabeza del espermatozoide, perdiéndose durante la capacitación espermática (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005b).

Mediante el análisis de las células de la superficie oviductal se ha determinado la interacción de la membrana apical del espermatozoide con una proteína presente en las células epiteliales del itsmo (Marini y Cabada, 2003), la *glicoproteína de unión espermática* (SBG). Está localizada en la cara apical de las células epiteliales del oviducto (Pérez et al., 2006), tiene como residuo expuesto el disacárido o-unido Gal $\beta$ 1-3GalNac, el cual tiene capacidad de unión con la espermadhesina AQN1 (Marini y Cabada, 2003).

La SBG podría estar involucrada en la selección de poblaciones espermáticas, ya que esta proteína solo se une a espermatozoides capacitados, alterando la integridad acrosomal y suprimiendo la motilidad (Teijeiro et al., 2008). Las anexinas aisladas de las células del oviducto porcino también presentan afinidad por proteínas de la membrana periacrosomal. En particular la anexina A2, localizada en la cara apical del epitelio oviductal, puede estar involucrada en la formación del reservorio espermático a través de la interacción con AQN1 (Teijeiro et al., 2009). Otras proteínas presentes en la membrana apical del epitelio oviductal, como HSPA8 tienen capacidad de unión a los glicolípidos sulfatados a la región rostral del espermatozoide, además de aumentar la capacidad de supervivencia del espermatozoide (Elliott et al., 2009).

Por otro lado, también se ha demostrado que la inyección de progesterona o de fluido folicular preovulatorio sobre la capa serosa o directamente al reservorio produce una liberación masiva de espermatozoides, produciéndose altos índices de polispermia (Hunter, 2008). Esto ha conducido a la suposición de que la progesterona podría ser una señal directo o indirecta para la liberación de los espermatozoides (Talevi y Gualtieri, 2010). Además, glicosaminglicanos no sulfatados (componente de la matriz extracelular del cumulus en ovocitos de cerdo que se incrementa durante la ovulación), también podría participar en la capacitación espermática y la liberación de los mismos del reservorio (Brüssow et al., 2008).

### **3.4.3. Cambios funcionales durante la capacitación espermática**

Durante el proceso de capacitación los espermatozoides sufren una serie de cambios funcionales entre los que destacamos los siguientes (revisado por Bailey, 2010):

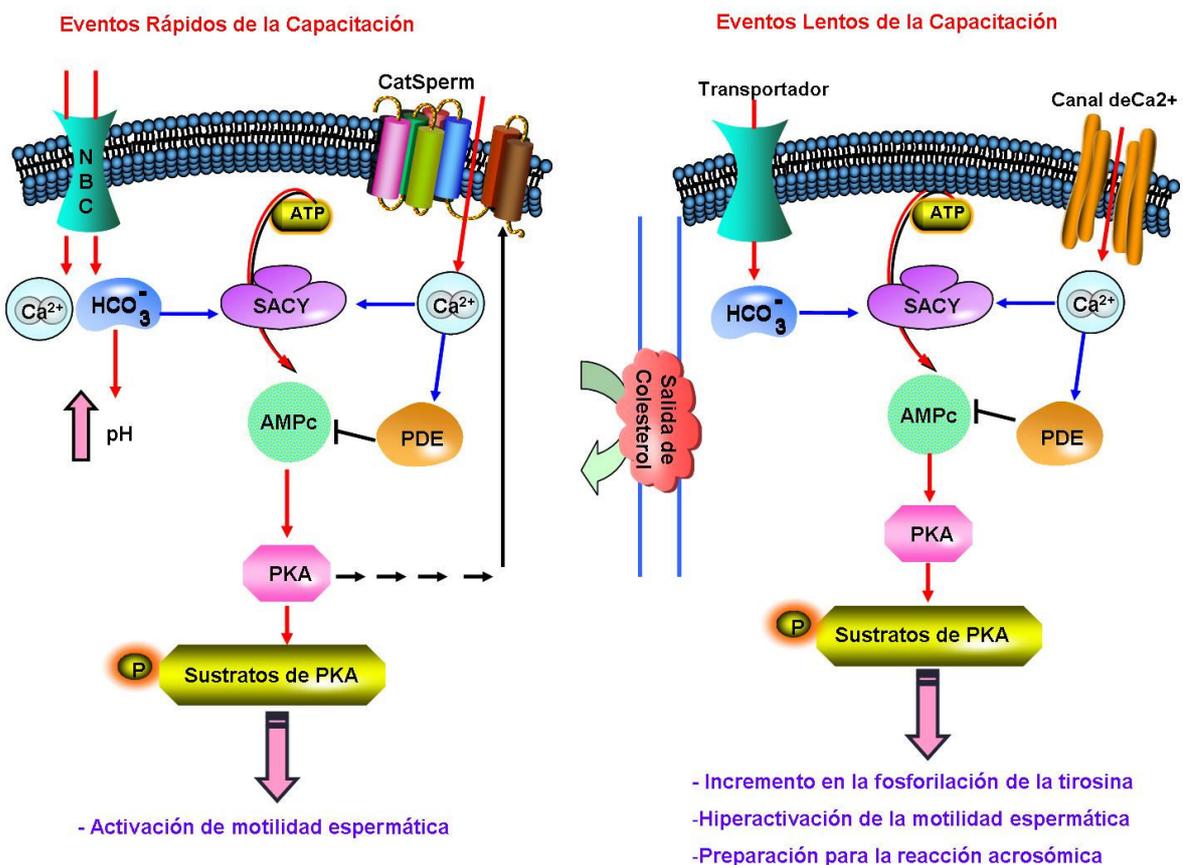
- La habilidad del espermatozoide para unirse a la matriz extracelular del ovocito, es decir, la zona pelúcida (ZP) y como consecuencia la reacción acrosómica. Aunque este último aspecto está en discusión ya que recientemente, Jin et al. 2011 han demostrado que la reacción acrosómica en los espermatozoides de ratón tienen lugar antes de la unión a la ZP.
- La hiperactivación, que son cambios en el patrón del movimiento del flagelo que permiten al espermatozoide penetrar el ovocito.
- La capacidad de fusionarse con el ovocito.

### **3.4.4. Bases moleculares de la capacitación espermática**

El proceso de capacitación lleva implícito una serie de cambios que se producen tanto de forma secuencial como paralela. Algunos de estos cambios son rápidos y tienen lugar en el momento en el que el espermatozoide es

eyaculado. Otros cambios necesitan de un periodo de tiempo más largo y se desarrollan en el tracto genital femenino (*in vivo*) o en un medio capaz de sustentar este proceso (*in vitro*). Todos estos procesos (tanto rápidos como lentos), se encuentran regulados por la *proteína kinasa A* (PKA) (Visconti et al., 1995b).

Las primeras señales de la capacitación rápida parecen ser esenciales para que el proceso de capacitación lenta tenga lugar. No obstante, ambos procesos, la capacitación lenta y rápida parecen estar reguladas por moléculas similares ( $\text{HCO}_3^-$ , adenil ciclasa soluble-SACY o sAC, y adenosin 3'5' monofosfato cíclico-AMPc) (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Bases moleculares durante la capacitación lenta y rápida asociados con la capacitación espermática después de la eyaculación en mamíferos. **NBC:** Cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , **SACY:** Adenilato Ciclasa Soluble (tipo único); **PKA:** Protein kinasa A. (Modificado de Visconti, 2009).

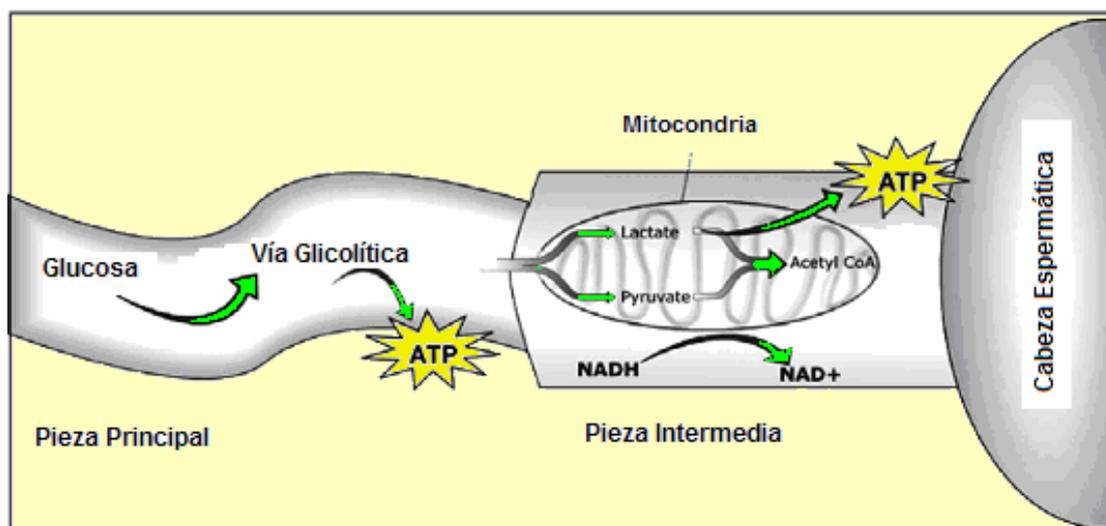
#### 3.4.4.1. Aspectos relacionados con los procesos rápidos que acontecen durante la capacitación espermática

Un evento temprano que ocurre en la capacitación es la activación de la motilidad espermática. Aunque los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo consumen oxígeno en alta proporción, son prácticamente inmóviles. El movimiento vigoroso del flagelo se inicia inmediatamente después que el espermatozoide es liberado del epidídimo y entra en contacto con el fluido seminal. Esto se debe a diferentes factores que se detallan a continuación (Figura 3.6):

- La exposición de los espermatozoides al  $\text{HCO}_3^-$ , desencadena inmediatamente la activación del flagelo y la despolarización de la membrana provocando el incremento en la entrada de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wennemuth et al., 2003).
- Los niveles fisiológicos de  $\text{HCO}_3^-$ , inducen un colapso rápido en la asimetría de los fosfolípidos espermáticos y este proceso está mediado por enzimas denominadas escramblasas (Harrison et al., 1996; Gadella y Harrison, 2002).
- En los dos casos mencionados anteriormente, las acciones del  $\text{HCO}_3^-$  parecen estar mediadas por la vía AMPc a través de la activación de la AC.
- Como consecuencia del incremento en los niveles de AMPc, la PKA es activada, dando como resultado la rápida fosforilación de proteínas (Harrison, 2004).
- Una familia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  llamada CatSper, parece ser la mediadora de la inducción de la despolarización, provocando el incremento de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula (Carlson et al., 2003).
- De modo interesante, contrario a otros eventos asociados a la capacitación lenta, el proceso de capacitación rápida no requiere de la presencia de aceptores de colesterol como la albúmina sérica bovina (BSA).

Además, también son necesarias fuentes energéticas para la capacitación, como es el caso de la glucosa, produciendo energía a través del

proceso de glicólisis. La producción de ATP por esta vía es requerida para la activación del espermatozoide y la capacitación (Figura 3.7) (revisado por Vadnais et al., 2007). El espermatozoide porcino tiene una alta afinidad para el uso de los monosacáridos a través de la vía de la glicólisis para la producción de ATP, así como los productos finales de la glicólisis como el piruvato y lactato, los cuales también son metabolizados en el flagelo para la producción de ATP (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Fuente energética del espermatozoide. La producción de ATP a través de la glicólisis promueve la hiperactivación del espermatozoide (modificado de Vadnais et al., 2007).

#### 3.4.4.2. Aspectos relacionados con los procesos lentos que acontecen durante la capacitación espermática

En contraste a la activación rápida de la motilidad, otros procesos asociados a la capacitación requieren periodos de tiempo mayores. Durante este periodo, los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar la cual está precedida de la preparación del espermatozoide para experimentar la reacción acrosómica y de cambiar el patrón de motilidad conocido como hiperactivación (Figura 3.8). Los hechos que acontecen durante el proceso lento de la capacitación es el que hasta ahora los investigadores han tenido en cuenta como parte de la capacitación espermática (Visconti, 2009), y el mecanismo por el cual estos componentes son capaces de promover la capacitación a nivel molecular ha sido, en la pasada década, un área

importante de investigación. Estos procesos lentos se pueden lograr *in vitro* mediante la incubación de los espermatozoides en medios definidos. En todos los casos, los medios de capacitación *in vitro* contienen una fuente proteica, que habitualmente es la BSA, y diferentes iones, incluyendo al  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . A nivel molecular estos cambios están correlacionados con un incremento en la fosforilación de tirosinas y esto a su vez es consecuencia de la estimulación de la PKA.

Además, el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide es transferido a proteínas de alto peso molecular como la albúmina y lipoproteínas de alta densidad presentes en el fluido oviductal. El flujo de colesterol en la membrana plasmática está asociado con la activación de vías y señales de transducción en la membrana, fenómeno relacionado con la capacitación. En el ratón, las ciclodextrinas  $\beta$  (heptasacáridos cíclicos) promueven el flujo de colesterol dando como resultado un incremento de la capacitación y en la fosforilación de la tirosina a través de la vía de señalización AMPc/PKA (Visconti et al., 1999).

#### **3.4.4.3. Moléculas y mecanismos implicados en el proceso de la capacitación**

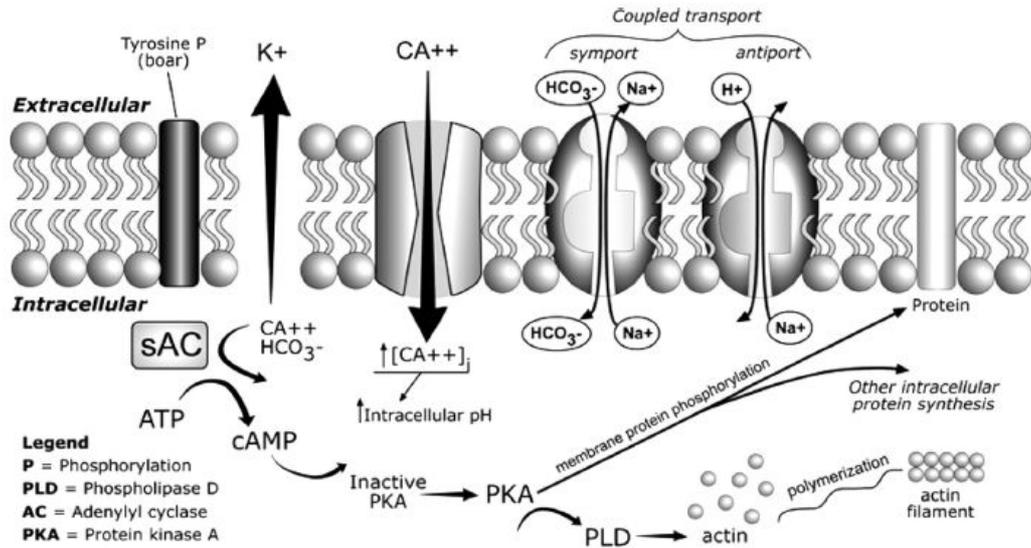
##### *Bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y activación de la vía sAC/AMPc/PKA:*

El  $\text{HCO}_3^-$  juega un papel clave en la habilidad del espermatozoide para capacitarse y por tanto lograr la fecundación tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Okamura et al., 1985; Visconti et al., 1995a; Harrison, 1996; Harrison et al., 1996). En el epidídimo hay bajos niveles de  $\text{HCO}_3^-$  (3-4mM) (Rodríguez-Martínez et al., 1990a), pero estos niveles son mayores a nivel de útero y oviducto (>20 mM) que es el lugar donde tiene lugar la fecundación.

El movimiento del  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana ha sido asociado con el incremento intracelular del pH durante la capacitación (Zeng et al., 1996). Sin embargo, otro objetivo probable para la acción del bicarbonato en el

espermatozoide es la regulación del metabolismo de AMPc (Garbers et al., 1982) por estímulo de un solo tipo de adenil ciclasa (Visconti, 2009). Existen dos tipos de adenil ciclasa en eucariotas responsable de la síntesis de AMPc: adenil cilclasa transmembrana y adenil ciclasa soluble (sAC) (Buck et al., 1999), existiendo múltiples evidencias que la sAC es activada durante la capacitación (revisado por Salicioni et al., 2007). En los mamíferos la capacitación de los espermatozoides depende del incremento de AMPc (revisado por (Visconti et al., 2002). Por tanto, el bicarbonato activa a la sAC y este enzima actúa sobre el ATP generando un incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc (Figura 3.8). Esto a su vez estimula la PKA para fosforilar substratos de proteínas permitiendo de esta manera la fosforilación de la tirosina (Visconti y Kopf, 1998; Gadella y Harrison, 2002). Además, la activación de la PKA tiene como resultado la activación de la fosfolipasa D (PLD) la cual estimula a su vez la polimerización de F-actina en bovino, humano, murinos y en el carnero (Cohen et al., 2004) (Figura 3.8), evento relacionado con el proceso de reacción acrosómica.

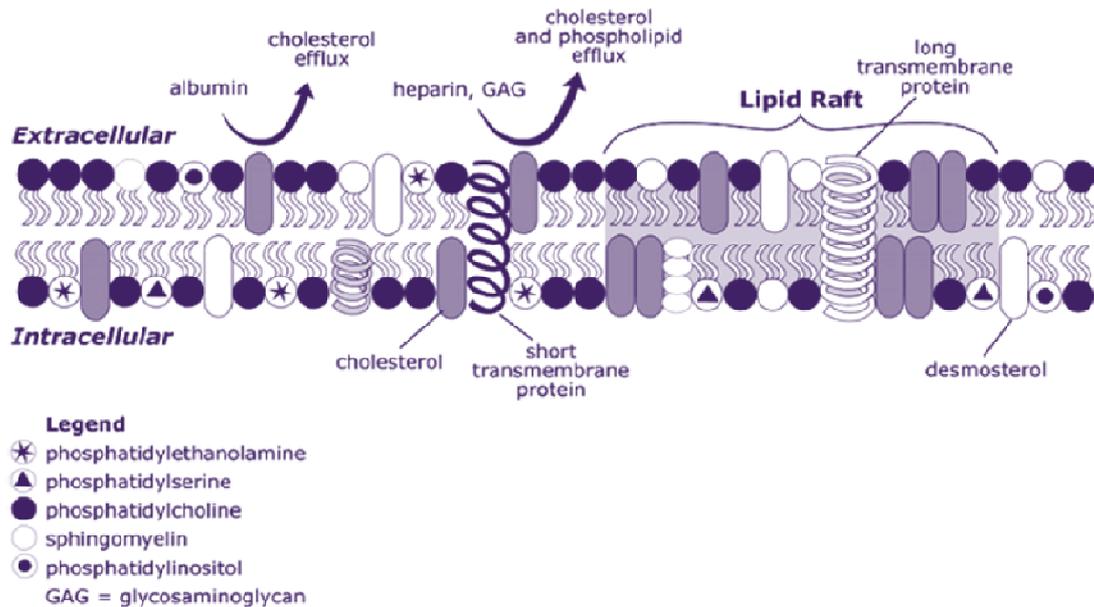
En el cerdo, se ha observado que el bicarbonato provoca una serie de eventos tales como la regulación de los niveles de AMPc, cambios reversibles en la arquitectura lipídica de la membrana plasmática y la hiperpolarización de membrana plasmática espermática, por medio de la vía de señalización AMPc/PKA (Harrison, 2004). Se ha determinado que la capacitación es un proceso dependiente de bicarbonato (Gadella y Harrison, 2002; Visconti et al., 2002) y el transporte de bicarbonato en estas células, está mediado en parte, por un miembro de la familia de co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (Romero y Boron, 1999) (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Vías de señalización de la capacitación del espermatozoide. La activación de sAC, mediante el  $Ca^{2+}$  y el  $HCO_3^-$ , inicia la vía de AMPc/PKA resultando en la fosforilación de las proteínas de membrana (Vadnais et al., 2007).

Bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) y estructura de la membrana lipídica:

El  $HCO_3^-$  modifica la estructura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Modificaciones de la membrana plasmática durante la capacitación. La albúmina, heparina y GAG causan un eflujo de colesterol que promueve el desorden de la membrana lipídica (Vadnais et al., 2007).

Este hecho fue demostrado por Harrison et al., (1996) utilizando una tinción lipofílica e hidrofóbica (merocianina). Al exponer a los espermatozoides con el  $\text{HCO}_3^-$  la señal de merocianina aumentó sugiriendo un aumento del desorden lipídico de la membrana (Harrison et al., 1996).

Durante la capacitación la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  provoca un cambio inicial en la estructura lipídica de la membrana por la vía sAC/AMPc/PKA (Gadella y Harrison, 2000) y está aumentada por inhibidores de las fosfatasa (Harrison y Miller, 2000). Estos cambios de membrana dan lugar a una reordenación de los fosfolípidos: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), esfingomielina (SM) y fosfatidilcolina (PC). Estos cambios lipídicos en la membrana del espermatozoide porcino iniciados por el bicarbonato son reversibles (Harrison et al., 1996).

Además, esta reordenación permite al colesterol de la membrana recolocarse en la parte apical de la cabeza espermática. Al parecer esta recolocación tiene como función la eliminación del colesterol (Flesch et al., 2001a). La albúmina, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y  $\beta$ -ciclodextrinas han sido descritas como promotoras de la capacitación espermática actuando como aceptores del colesterol eliminando éste de la membrana plasmática (Vadnais et al., 2007). Como resultado de este proceso se produce un descenso del ratio colesterol/fosfolípido contribuyendo a un aumento en la fluidez de la membrana que conlleva un incremento en la permeabilidad a los iones (Davis, 1976; Cross, 1998; Visconti et al., 1999; Travis y Kopf, 2002).

#### *Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en la capacitación:*

El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene la propiedad de ser empleado como regulador por numerosas proteínas celulares. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  participa en el control de múltiples funciones celulares desde la fertilización hasta los procesos de muerte celular, secreción, metabolismo hasta la diferenciación y replicación celular (Berridge et al., 1999). De todos los mecanismos de señalización intracelular el más caracterizado y el mejor estudiado es la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta vía consiste en aumentos transitorios de la concentración de calcio

intracelular  $[(Ca^{2+})_i]$  producidos por numerosos mensajeros intercelulares. Estos cambios son denominados “señales de calcio”.

La acción del  $Ca^{2+}$  sobre distintas enzimas efectoras involucradas en la señal de transducción espermática sugiere que este catión juega un papel importante en la capacitación (Dragileva et al., 1999). En 1915, Loeb (Loeb, 1915) fue el primero en demostrar que se requiere  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular para se produzca la fertilización en invertebrados. Una exigencia similar fue demostrada en espermatozoides de ratón (Iwamatsu y Chang, 1971). Desde entonces, muchos autores han mostrado la importancia del  $Ca^{2+}$  en la fisiología espermática (Handrow et al., 1989; DasGupta et al., 1993; Fraser et al., 1995) y en la fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas (Visconti et al., 1995b).

Una de las consecuencias más importante de la salida de colesterol de las membranas, es una masiva entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular que se considera requisito indispensable para que el proceso de reacción acrosómica tenga lugar (Flesch y Gadella, 2000). Esta entrada de  $Ca^{2+}$  puede ser consecuencia de los cambios que ocurren en la fluidez de la membrana, lo que le confiere que sea más permeable al  $Ca^{2+}$ . En el caso del cerdo el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular en el espermatozoide puede activar uno o más sistemas o vías enzimáticas. Por ejemplo, la sAC aumenta durante la capacitación (Fraser, 1984; Stein y Fraser, 1984; Monks et al., 1986) en respuesta al  $Ca^{2+}$  (Hyne y Garbers, 1979; Garbers et al., 1982) esta enzima va a catalizar la conversión de ATP a AMPc (Figura 3.8).

Visconti y Kopf en 1998, sugirieron un efecto cooperativo del  $Ca^{2+}$  y del  $HCO_3^-$  en la modulación de la capacitación espermática, es decir, es necesaria la presencia de ambos para que tenga lugar un incremento de los niveles de AMPc y la posterior fosforilación de diversas proteínas. En la especie porcina, tanto el  $Ca^{2+}$  como el  $HCO_3^-$  parecen ser necesarios para la capacitación y además sus papeles son sinérgicos, ya que se ha demostrado que el  $HCO_3^-$  va a estimular la entrada de  $Ca^{2+}$  en esta especie (Harrison et al., 1993).

CatSperm 1 y 2 son canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran localizados en la cola del espermatozoide. Espermatozoides de ratones deficientes en estos canales de calcio no presentan una hiperactivación durante la capacitación siendo incluso infértiles a pesar de presentar fosforilación de la tirosina (Carlson et al., 2003).

Otro aspecto que influye en la capacitación en relación con el  $\text{Ca}^{2+}$  es el pH intracelular. Espermatozoides no capacitados mantienen un pH intracelular acidificado (Parrish et al., 1989) actuando como un regulador del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Florman et al., 1992), previniendo la capacitación y la reacción acrosómica. El pH intracelular se convierte en más alcalino durante la capacitación (Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995). Actualmente se cree por la mayoría de investigadores que el efecto del aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y el pH intracelular durante la capacitación espermática es la activación de la sAC con el consiguiente aumento de AMPc (Travis y Kopf, 2002; Breitbart, 2003; Harrison y Gadella, 2005; Hess et al., 2005).

La calmodulina, una proteína de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  considerada como un transductor importante de las señales de calcio, parece estar disminuida durante la capacitación, lo que aumentaría los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide, tal vez por la inhibición de  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa de la membrana plasmática y aumentando los niveles de AMPc mediante la inhibición de fosfodiesterasa 1 (PDE1) (revisado por Bailey, 2010).

#### Potencial de la membrana espermática:

Los espermatozoides durante su transporte a través del tracto genital masculino y femenino, están expuestos a cambios significativos en el entorno en el que se encuentran inmersos. Por ejemplo, el fluido epididimario es un ambiente que contiene alto contenido de  $\text{K}^+$ , bajo contenido de  $\text{Na}^+$  y concentraciones aun más bajas de  $\text{HCO}_3^-$  (Brooks, 1983; Roberts, 2002). Después de la eyaculación existe un cambio drástico en las concentraciones de estos iones, en primer lugar en el fluido seminal y posteriormente en el tracto femenino, el  $\text{K}^+$  se reduce significativamente y las concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  se

incrementan de manera considerable (Brooks, 1983; Yanagimachi, 1994a). Como consecuencia de estos cambios en la concentración extracelular de iones, se producen cambios en las concentraciones intracelulares de estos iones lo que modifica en el potencial de membrana del espermatozoide (Muñoz-Garay et al., 2001; Demarco et al., 2003).

El potencial de membrana basal está determinado por la permeabilidad relativa de la membrana plasmática espermática a los iones que van a constituir el medio de capacitación. Bajo condiciones normales, los espermatozoides mantienen una concentración de iones en el interior de la célula marcadamente diferente de la existente en el medio extracelular (Salicioni et al., 2007). La diferencia esta determinada por la relativa permeabilidad de la membrana plasmática a los iones que se encuentran en el medio, de sus gradientes y del estado metabólico de la célula (Salicioni et al., 2007).

La capacitación espermática en los mamíferos está acompañada de una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Zeng et al., 1995), resultando en cambios en la actividad de los canales iónicos y transportadores que controlan el flujo iónico (Salicioni et al., 2007). Se ha demostrado que en el espermatozoide de ratón, los cambios en el potencial de membrana no ocurren en ausencia de BSA o de  $\text{HCO}_3^-$ , (Demarco et al., 2003). Estos resultados sugieren que en un medio de capacitación el  $\text{HCO}_3^-$ , así como el flujo de colesterol, puede tener una función directa o indirecta controlando eventos que permiten la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Salicioni et al., 2007). Arnoult et al. en 1999, demostraron que únicamente con una población de espermatozoides hiperpolarizados podía tener lugar la reacción acrosómica en presencia de zonas pelúcidas solubilizadas (Arnoult et al., 1999).

#### Fosforilación de proteínas espermáticas:

La fosforilación de proteínas juega un papel importante en la regulación de numerosos procesos intracelulares como la transducción de señales

extracelulares, transporte intracelular y progresión del ciclo celular (Salicioni et al., 2007). El estado de fosforilación o defosforilación de las fosfoproteínas es controlado por la actividad de las protein kinasas y protein fosfatasas y las actividades en conjunto de estas kinasas y fosfatasas proporcionan a las células un “*switch*” o interruptor por el que pueden activar o no la función de varias proteínas .

La fosforilación puede ocurrir en los residuos de serina, treonina y tirosina de las proteínas. Aunque la fosforilación de serina/treonina en las proteínas también ha sido reportada en el espermatozoide, la fosforilación de la tirosina es la más importante y puede ser el primer o incluso el único indicador de las vías de señalización de transducción en las células (Naz y Rajesh, 2004). La fosforilación o defosforilación del aminoácido tirosina de las proteínas ha estado implicada en la regulación de una gran variedad de funciones celulares como la regulación del crecimiento, procesos de adhesión celular, cambios en el citoesqueleto, así como en el control del ciclo celular o exocitosis (Aplin y Juliano, 1999; Schlaepfer et al., 1999). La fosforilación de la tirosina está ligada desde hace unos años a los procesos de capacitación e hiperactivación en los espermatozoides de numerosos mamíferos (Visconti et al., 2002; Urner y Sakkas, 2003), como la especie humana (Leclerc et al., 1996), la bovina (Galantino-Homer et al., 1997) o la murina (Visconti y Kopf, 1998). Como en el resto de especies, las proteínas del espermatozoide porcino también se fosforilan durante la capacitación. En un estudio de Tardif et al. (2001) en espermatozoides porcinos demostraron la fosforilación de la tirosina de una o varias proteínas con aparente peso molecular de 32 kDa.

En espermatozoides de diversas especies, incluida la porcina, el incremento en la fosforilación de la tirosina está regulada por una vía dependiente de AMPc que involucra a la PKA (Kalab et al., 1998). Se ha indicado la implicación de la PKA desde que se observó que los inhibidores de la actividad de PKA, eran capaces de inhibir la fosforilación de la tirosina así como también la capacitación. En el 2002, Visconti et al., describieron los posibles mecanismos por medio de los cuales podría regularse la fosforilación de la tirosina por la vía de señalización dependiente de AMPc/PKA:

- La estimulación directa o indirecta de una tirosin quinasa por la PKA.
- La inhibición directa o indirecta de una fosfotirosin fosfatasa.
- La fosforilación directa o indirecta de proteínas por medio de la PKA sobre residuos de serina o treonina que preparan estas proteínas para su posterior fosforilación en residuos de tirosina.

Aunque la fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas está asociada con la capacitación en muchas especies de mamíferos, los requerimientos para la fosforilación de este aminoácido son específicos para cada especie. Por ejemplo, la fosforilación de la tirosina durante la capacitación espermática requiere la presencia de BSA,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  en el caso del ratón, del hombre (Visconti et al., 1995b), del hámster (Visconti et al., 1999; Kulanand y Shivaji, 2001) y del cerdo (Dubé et al., 2003; Tardif et al., 2003). Otro factor a tener en cuenta en la fosforilación de tirosina es el tiempo. De este modo, en los espermatozoides porcinos esta fosforilación se produce próxima a 1 hora tras la adición de bicarbonato (Gadella y Van Gestel, 2004), mientras que espermatozoides de toro se produce 4h tras la adición de heparina (Galantino-Homer et al., 1997).

A pesar de que la fosforilación de la tirosina es una clave importante en la capacitación, aun no está del todo claro cómo es que la fosforilación de estas proteínas está involucrada en el reconocimiento espermatozoide-zona, en la interacción de gametos y en la exocitosis del contenido acrosomal (Flesch et al., 2001b). En el cerdo y en el perro se ha demostrado que los espermatozoides eyaculados que son seleccionados en el oviducto y que se adhieren a las células epiteliales de éste, suprimen la fosforilación de la tirosina de las proteínas espermáticas. Esta modulación por parte del epitelio oviductal sobre la fosforilación de la tirosina y por tanto de la capacitación, podría ayudar a sincronizar las funciones espermáticas con el momento de la ovulación (Petrunkina et al., 2001a; Petrunkina et al., 2003b).

Diversos estudios han correlacionado el grado de fosforilación de la tirosina con el estado de capacitación del espermatozoide en ratón (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1999). En éstos estudios observaron un incremento

de la fosforilación de la tirosina dependiente del tiempo en un grupo de proteínas específicas en un rango molecular de 40 a 120 kDa. Se ha visto que esta correlación fosforilación-tiempo se mantiene en diversos mamíferos como el hámster, gato, cerdo, bovino, caballo, hombre y mono (Naz y Rajesh, 2004).

El flagelo es la estructura principal donde están presentes las proteínas fosforiladas en tirosina (Petrunkina et al., 2001a; Tardif et al., 2001). La inmunocitoquímica ha sido utilizada para localizar proteínas fosforiladas en el flagelo de espermatozoides de diferentes mamíferos como el hombre (Naz et al., 1991; Carrera et al., 1996; Leclerc et al., 1997), mono (Mahony y Gwathmey, 1999), hámster (Si y Okuno, 1993; 1999), rata (Lewis y Aitken, 2001) y ratón (Urner et al., 2001).

En la tabla 3.2. quedan reflejados los diferentes componentes que pueden intervenir en la capacitación espermática así como su función y su acción.

Componente	Función	Resultado
<b>Bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>	- Activa la vía de señalización de AC/AMPc/PKA y la remodelación de fosfolípidos.	-Incremento en la fluidez de la membrana
<b>Calcio (Ca<sup>2+</sup>)</b>	- Ayuda a activar las vías de señalización de sAC/AMPc/PKA - Hiperpolarización de membrana.	-Fosforilación de proteínas, -Alcalinización del pH intracelular.
<b>Adenil Ciclasa soluble (sAC)</b>	- Elevación de los niveles de AMPc	-Segundo mensajero para la capacitación -Activa PKA
<b>Proteína Kinasa A</b>	- Fosforilación de la serina y treonina, conduce a la fosforilación de la tirosina, marcador bioquímico consistente para la capacitación.	-La fosforilación de la proteína tirosina puede regular la hiperactivación de la motilidad e incita a la reacción acrosómica. -Activa la PLD (fosfolipasa D)
<b>Fosfolipasa D</b>	- Polimerización de la Actina	-Formación de filamentos de Actina
<b>Albúmina</b>	- Flujo de colesterol	-Incremento de la fluidez de la membrana y transporte iónico -Posible redistribución de fosfolípidos y <i>rafts</i> lipídicos
<b>Glucosa</b>	- Energía por la vía glicolítica	-Producción de ATP
<b>Piruvato Lactato</b>	- Inhibidor de la glucosa para la capacitación espermática bovina	-Regenera NAD <sup>+</sup>
<b>Péptido Promotor de la Fertilización (FPP)</b>	- Estimula la capacitación - Previene la reacción acrosómica espontánea	-Primer mensajero para la capacitación
<b>Adenosina Calcitonina Angiotensina II</b>	- Actúan por medio de la regulación de sAC/AMPc	-Posible participación de proteínas G
<b>Factor activador de Plaquetas (PAF)</b>	- Señales de transducción - Activación molecular	-Activación autocrina de la capacitación

**Tabla 3.2.** Componentes que intervienen en la capacitación del espermatozoide en mamíferos (modificado de Vadnais et al., 2007).

### 3.4.5. Capacitación *in vitro*

La capacitación *in vitro* ha sido llevada a cabo, con espermatozoides tanto epididimarios (cola del epidídimo) como de eyaculado, mediante incubación de los espermatozoides en medios definidos y bajo unas determinadas condiciones de temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> que mimetizan el ambiente oviductal (Flesch et al., 1999; Tardif et al., 2003; Bravo et al., 2005; Matás et al., 2010). Estos medios llevan en su composición sustratos energéticos como el piruvato, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), una fuente proteica la cual es usualmente la albúmina, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el Ca<sup>2+</sup> (Visconti y Kopf, 1998). Por otro lado, mediante diferentes tratamientos espermáticos previos se eliminan determinados componentes procedentes del plasma seminal, restos de diluyentes utilizados para conservación espermática (incluidos crioprotectores) o simplemente partículas contaminantes que puedan afectar al cultivo posterior.

#### 3.4.5.1. Métodos de selección y preparación espermática

Existen diferentes sistemas de selección y preparación espermática previos a la capacitación *in vitro*, cuyo uso depende en gran medida de la especie con la se está trabajando. Según el mecanismo de separación que se utilice se podrían clasificar de la siguiente manera:

A).- Lavados con albúmina: es el método más sencillo de preparación espermática y consiste básicamente en la eliminación del plasma seminal y restos de otras partículas que hubiesen podido contaminar el eyaculado, mediante centrifugaciones de los espermatozoides previamente resuspendidos en un medio enriquecido con albúmina. Como comentábamos anteriormente, durante la capacitación uno de los procesos bioquímicos que se produce es la desestabilización de la membrana plasmática, lo que provoca un aumento de la fluidez de la misma. El colesterol de la membrana de los espermatozoides es el responsable de la estabilidad de la misma. Mediante el empleo de medios de lavado enriquecidos con albúmina, conseguimos que ésta actúe como

adsorbente de colesterol (Cross, 1998), favoreciendo su pérdida y la consiguiente capacitación espermática (De Lamirande et al., 1997).

B).- Migración: con esta técnica se pretende limpiar el semen y recuperar aquellos espermatozoides con mayor movilidad para mejorar el éxito en la fecundación. Entre ellas destacan:

- *Swim-up*: en este método se lava el eyaculado una o dos veces y se decanta el sobrenadante. Posteriormente, se añade el medio al *pellet* deslizándolo por la pared del tubo y se deja incubar durante aproximadamente 45 min a 37° C. Los espermatozoides capacitados “nadan” hacia arriba (*swim-up*) en el sobrenadante, que es la fracción que se recoge.
- *Swim-down*: este procedimiento es similar al *swim-up*, pero en este caso se coloca primero el medio y después el semen, dejándolo resbalar por las paredes del tubo. De esta manera los espermatozoides van a nadar hacia la parte de abajo, que es donde se encuentra el medio, descartándose el sobrenadante.
- *Self-Migration*: la separación de los espermatozoides se realiza por una migración espermática. Para ello, habitualmente se coloca el semen en el extremo de una pipeta Pasteur, y a continuación se añade el medio. Se deja incubar la pipeta en posición horizontal, y posteriormente se recolecta el medio donde han migrado los espermatozoides. Con esta técnica se puede recuperar un mayor número de espermatozoides móviles que con el método anterior, sin embargo, los resultados de fertilidad son menores.
- *Migración-sedimentación*: consiste en un *swim-up* combinado con un proceso de sedimentación y se basa en la capacidad de los espermatozoides para desplazarse. En este caso no se utiliza la centrifugación y no se daña con ello a los espermatozoides.

C).- Filtración: estos métodos se basan en la capacidad que presenta un determinado material para captar los espermatozoides muertos o con defectos en la membrana a través de la filtración y solamente las células móviles son

capaces de pasar a través de la fibra y no quedar atrapadas durante en dicho proceso. Posteriormente, el filtrado se recoge, se centrifuga y el *pellet* obtenido se diluye en medio de cultivo para su posterior utilización. Entre estas técnicas destacan, en función de la naturaleza del material empleado para captar las células inmóviles, el filtrado en fibra de vidrio y la filtración en columnas *Sephadex*.

D).- Gradientes de densidad: esta técnica aprovecha la diferente densidad de los espermatozoides de modo que aquellos que presentan mejor motilidad y morfología, irán al fondo del tubo tras la centrifugación aislándose además de otros constituyentes, que se acumulan en el gradiente, en su densidad apropiada. Este método permite separar espermatozoides por centrifugación a través de un gradiente y básicamente consiste en formar diferentes capas de densidad variable. Así tenemos, que se va a depositar en el fondo del tubo la capa de mayor densidad y sobre ella el resto de capas en densidad decreciente. La muestra a separar se coloca encima y cuando se realiza la centrifugación, cada componente celular empieza a descender por el gradiente hasta que llega a un punto donde la densidad de la capa es igual a su densidad propia. La velocidad a la que sedimenta cada componente depende de su tamaño y de su forma. Aplicando una fuerza de centrifugación determinada, los espermatozoides móviles se disponen paralelamente a la pared del tubo y facilitan su desplazamiento. Con ello, obtenemos una fracción libre de células y rica en espermatozoides en el fondo del tubo de centrifugación (Flesch et al., 1999). Los gradientes de densidad comúnmente mas utilizados son los de Percoll®, que consisten en partículas de sílice coloidal cubiertas con polivinilpirrolidona.

#### **3.4.5.2. Capacitación *in vitro per se***

Independientemente del método de lavado empleado para que se produzca el inicio de la capacitación espermática, el cual trata de imitar el tránsito espermático desde vagina/útero al oviducto, los espermatozoides deberán estar durante un tiempo variable, que depende de la especie y el

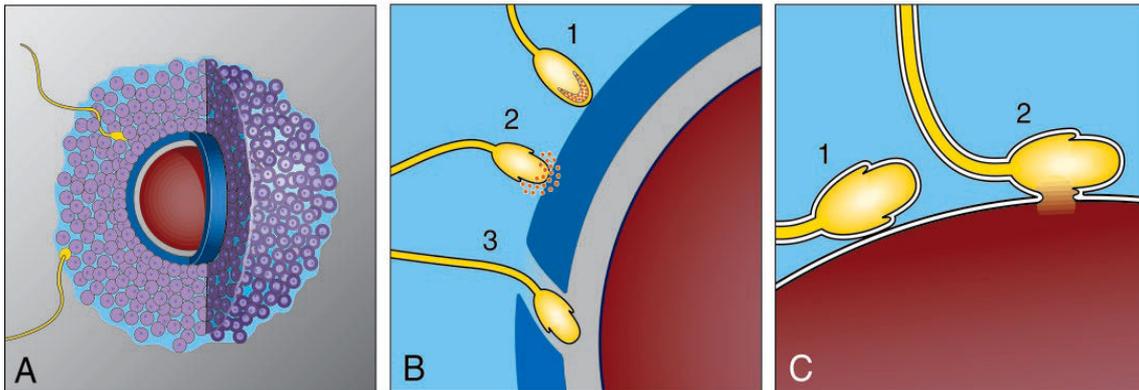
método de separación empleado, en un medio rico en  $\text{HCO}_3^-$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ . Este medio conferirá al espermatozoide las condiciones necesarias para adquirir la hipermotilidad y experimentar la reacción acrosómica al contactar con la zona pelúcida del ovocito.

Los sistemas de selección y preparación espermática descritos anteriormente no conducen al estado de capacitación en la célula espermática en las diferentes especies. Aunque se ha demostrado en humanos, en roedores y en porcino que los espermatozoides lavados a través de un gradiente de Percoll® presentan un alto grado de fecundación si los comparamos con aquellos a los que se les sometió únicamente a un lavado por centrifugación (Tanphaichitr et al., 1988; Tanphaichitr et al., 1990; Matás et al., 2003). Existen evidencias que revelan que la composición y los cambios de los lípidos de la membrana del espermatozoides pueden regular la calidad espermática y sus funciones (Flesch y Gadella, 2000). Una de las cualidades que difiere a los espermatozoides lavados con Percoll® de los lavados por centrifugación es en su estructura subcelular. A su vez, se ha visto que el contenido de lípidos, colesterol y fosfolípidos se encuentran en menor proporción en los espermatozoides lavados con gradiente de Percoll® que aquellos solo lavados por centrifugación, tanto en humano como en ratón (Furimsky et al., 2005).

### **3.5. FECUNDACIÓN**

La fecundación es uno de los procesos biológicos más complejos, del cual todavía se desconocen muchos aspectos. Comienza con el transporte de gametos en el tracto reproductor femenino. Los espermatozoides capacitados que alcanzan la porción ampular del oviducto deben atravesar las células del *cumulus oophorus* y la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Finalmente, tiene lugar la singamia (en la ampolla oviductal), y como consecuencia la formación de los pronúcleos para dar paso al desarrollo embrionario (Miller et al., 2002; Brüssow et al., 2008). Por tanto, podemos dividir el proceso de fecundación en diferentes etapas que iremos desarrollando (Figura 3.10):

- 1) Penetración de los espermatozoides a través de las células del *cumulus oophorus*.
- 2) Unión y penetración del espermatozoide a la ZP.
- 3) Fusión de membranas entre gametos.
- 4) Formación pronuclear.
- 5) Singamia.



**Figura 3.10.** (A) Penetración de las células de cumulus oophorus (color violeta) para alcanzar la ZP (color azul). (B) Ovocito sin las células del cumulus oophorus: 1) el espermatozoide se une a la ZP; 2) el espermatozoide libera el contenido acrosomal (naranja); 3) el espermatozoide penetra la ZP y entra en el espacio perivitelino (gris). (C) el espermatozoide 1 se une a la membrana plasmática del ovocito a través del lateral de su cabeza (región ecuatorial); el espermatozoide 2 se fusiona con la membrana plasmática del ovocito (Imagen tomada de Primakoff y Myles, 2002).

### 3.5.1. Penetración de los espermatozoides a través de las células del *cumulus oophorus*

El *cumulus oophorus* es un conjunto de células que rodean el ovocito formando diversas capas. Dichas células se encuentran unidas entre sí por una matriz extracelular, rica en ácido hialurónico entre otros componentes (Salustri et al., 1992). En un principio se propuso que el *cumulus oophorus*, podría ser atravesado gracias a la motilidad espermática y específicamente por la acción de la proteína PH-20 o SPAM 1 (Meyers y Rosenberger, 1999).. Posteriormente, se demostró la existencia de la proteína Hya15 con actividad hialuronidasa que permitía la penetración del *cumulus oophorus* mediante la digestión de la matriz de ácido hialurónico, poniendo así en duda la funcionalidad de la proteína PH-20 (Kim et al., 2005). Una vez que el

espermatozoide atraviesa el *cumulus oophorus*, se produce la interacción con el ovocito.

### **3.5.2. Unión y penetración del espermatozoide a la Zona Pelúcida**

La membrana plasmática de todos los ovocitos mamíferos está rodeada por la ZP. Ésta es una matriz formada por diferentes glicoproteínas (tres o cuatro, dependiendo de la especie). En el caso de la especie porcina la ZP la conforman 3 glicoproteínas denominadas ZP2, ZP3 y ZP4 (Harris et al., 1994). Estas glicoproteínas están altamente glicosiladas, lo que es muy importante para conferirle a la ZP sus funciones biológicas específicas (Wassarman et al., 1999).

El espermatozoide que alcanza y se une a la ZP, recibe una señal y se produce la reacción acrosómica mediante la exocitosis del contenido acrosomal. Por tanto, el reconocimiento de la ZP por el espermatozoide puede ser subdividido en dos fases: i) **unión primaria** en la cual el acrosoma intacto del espermatozoide se une con proteínas de la ZP; y ii) **unión secundaria** en la cual el espermatozoide reaccionado expone una serie de proteínas intra-acrosomales con alta afinidad a la ZP.

#### **3.5.2.1. Unión primaria del espermatozoide a la Zona Pelúcida**

A pesar de las numerosas publicaciones e investigaciones llevadas a cabo, a día de hoy, no existe un modelo para conocer con exactitud las bases moleculares que acontecen en la unión espermatozoide-ZP (Dean, 2004). Desde un punto de vista simplista, la unión del espermatozoide con el ovocito en mamíferos podría deberse a una molécula localizada en la cabeza espermática (“proteína de unión al ovocito”) reconociendo y uniéndose a su molécula complementaria localizada en la ZP del ovocito (“receptor espermático”) de una manera especie-específica (Wassarman, 1999).

Las células con el acrosoma intacto son las que harán el primer contacto con la ZP, por lo tanto las proteínas que se adhieren y se unen a la ZP, tienen

que situarse en la membrana plasmática del espermatozoide o su recubrimiento extracelular y la primer proteína propuesta de unión principal espermatozoide-zona pelúcida fue la sp56, (Cheng et al., 1994). Posee afinidad por las cadenas de oligosacáridos de la ZP. Además, se han descrito otras moléculas llamadas zona adhesinas, proacrosina, sp38, p47, IAM38 y las espermadesinas involucradas en la unión primaria y secundaria a la ZP. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de interacción de ligandos y receptores de estas moléculas (Yu et al., 2006; Gaboriau et al., 2007).

Una de las moléculas más estudiadas como receptor de los ligandos de la ZP ha sido la  $\beta$ -1,4 Galactosiltransferasa (GalT-I). La GalT-I puede actuar como un receptor específico de glicoproteínas incluyendo la ZP3. Algunos ensayos *in vitro* sugieren que los residuos N- acetilglucosamina de la GalT-I, juegan un papel importante en la adhesión de los espermatozoides a la ZP, siendo así que la interacción entre la GalT-I y la ZP es necesaria para la unión entre gametos (Miller et al., 1992; Zitta et al., 2006). Posteriormente, se hicieron diversos ensayos con el fin de encontrar otro ligando para la ZP en espermatozoides de cerdo, así se estudio una proteína presente en el espermatozoide denominada SED1 (Ensslin y Shur, 2003; Ensslin et al., 2007).

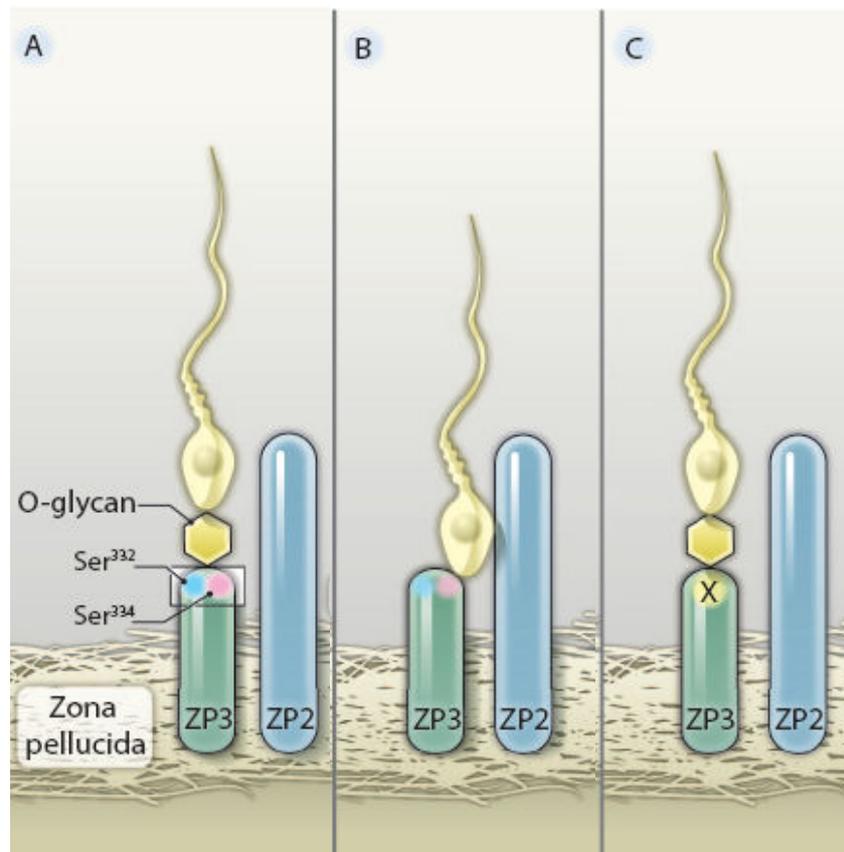
Como hemos visto, se han estudiado un gran número de receptores espermáticos para proteínas de la ZP (Wassarman et al., 1999). Pero ¿cómo se explica que se hayan descrito un gran número de componentes como proteínas de unión a la ZP? Wassarman, en 1999 propuso las siguientes respuestas:

- Participación de diferentes proteínas espermáticas como proteínas de unión al ovocito en diferentes mamíferos.
- Participación de múltiples proteínas de unión al ovocito, actuando de manera individual o como complejos multiproteicos, en determinadas especies de mamíferos.
- Participación de múltiples proteínas espermáticas de unión, cada una con diferentes afinidades por el receptor espermático que pueden actuar en secuencia, en determinados mamíferos.

- Algunos de los métodos usados *in vitro* para evaluar la función de las proteínas de unión al ovocito, pueden no tener función en condiciones *in vivo*.

Probablemente, los supuestos receptores primarios a la ZP son modificados a través de la capacitación espermática, ya que se conoce que la afinidad de unión de la célula espermática a la ZP incrementa dramáticamente durante la capacitación (Yanagimachi, 1994a). El incremento de la afinidad del espermatozoide por el ovocito puede ser también el resultado de la capacitación inducida por los cambios en los receptores (incluyendo la dimerización de receptores) o por la aparición de receptores en la ZP (Flesch y Gadella, 2000).

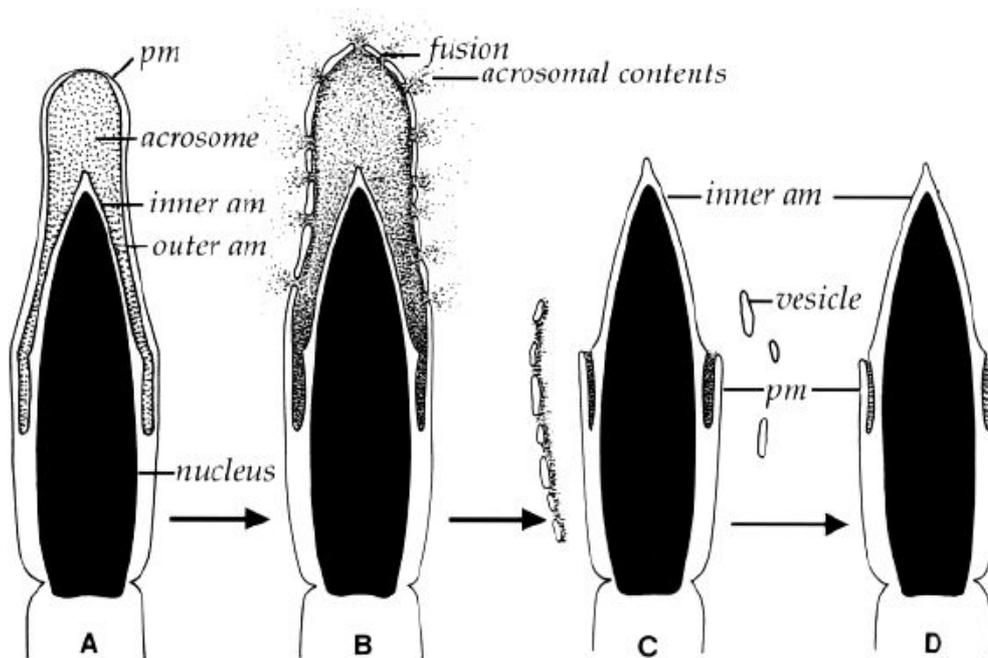
Por otro lado, nos podemos preguntar ¿Cómo saben los espermatozoides que están unidos a la ZP? En un principio se demostró que la unión del espermatozoide a la ZP era debida a la interacción con un oligosacárido O-link conjugado a la ZP3 en los residuos Ser<sup>332</sup> y Ser<sup>334</sup> (Figura 3.11A) (Boja et al., 2003; Chalabi et al., 2006). Pero recientemente se ha demostrado (Gahlay et al., 2010) que la unión espermática a la ZP depende del estado de escisión proteolítica de la ZP2 (Figura 3.11B). Finalmente, un posible modelo consistente podría ser que el espermatozoide se une a la ZP interactuando con un glicano pero que no está conjugado a Ser<sup>332</sup> o Ser<sup>334</sup> de la ZP3, y la habilidad del espermatozoide para acceder a este glicano depende del estado de escisión proteolítica de la ZP2 (Figura 3.11C) (revisado por Visconti y Florman, 2010).



**Figura 3.11.** Modelos de unión del espermatozoide a la ZP. **(A) Modelo glicano.** El espermatozoide se une mediante interacción selectiva con O-glicanos conjugados a la ZP3 en Ser<sup>332</sup> y Ser<sup>334</sup> o ambos residuos. **(B) Modelo de estructura supermolecular.** El sitio de unión del espermatozoide no es específico, si no que intervienen elementos de ZP2 y ZP3. **(C) Modelo híbrido.** El espermatozoide se une a un ligando O-glicano que se encuentra conjugado a la ZP3 en un lugar diferente que Ser<sup>332</sup> y Ser<sup>334</sup> (modificado de Visconti y Florman, 2010).

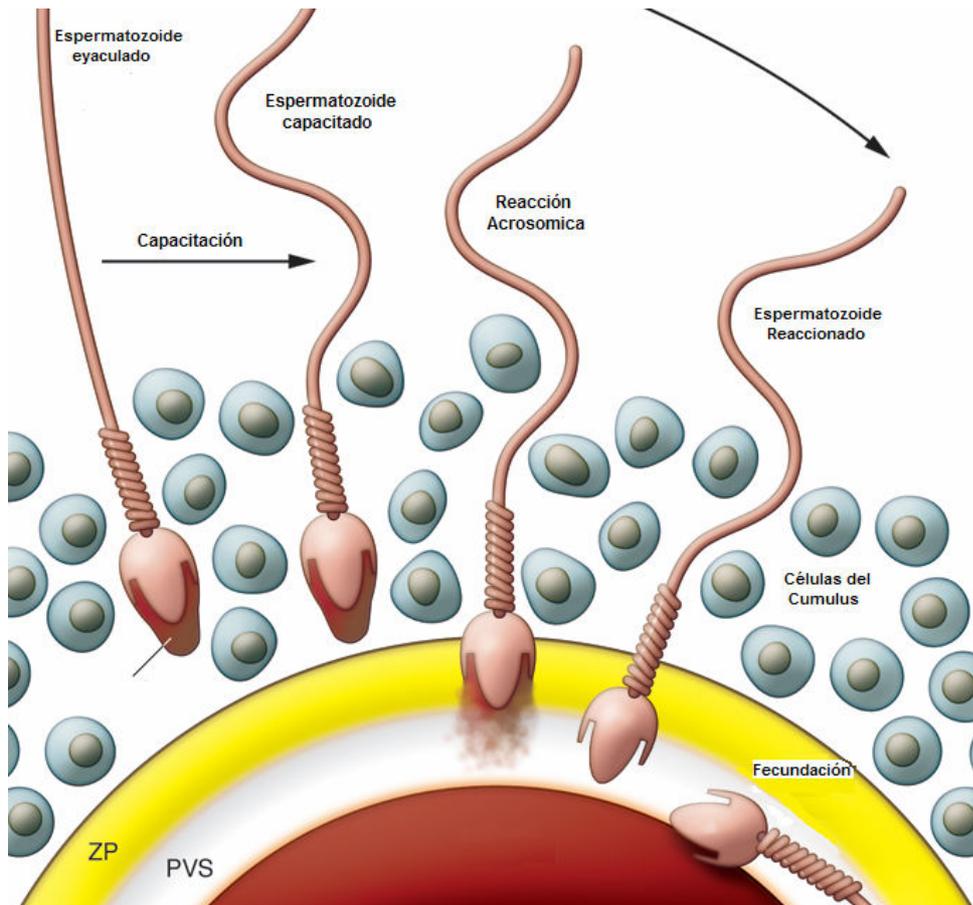
### 3.5.2.1.1. Reacción Acrosómica (RA)

En la RA la membrana plasmática apical de la cabeza del espermatozoide comienza a fusionarse con la membrana subyacente acrosomal externa en múltiples sitios, resultando así en la dispersión del contenido acrosomal (Revisado por Ikawa et al., 2010) (Figura 3.13).



**Figura 3.12.** Diagrama de los cambios morfológicos que tienen lugar durante la reacción acrosómica en los espermatozoides de mamíferos. **(A)** acrosoma intacto; **(B)** fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática; **(C)** y **(D)** vesículas compuestas de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Pm: membrana plasmática; am: membrana acrosomal (modificado de Yanagimachi, 1994a).

Durante la RA las enzimas hidrolíticas y proteolíticas son secretadas para liberar hidrolasa y disolver la matriz de la ZP, justo en la zona en la dirección inmediata donde la célula espermática penetra, lo cual en última instancia, asegura la entrada del espermatozoide (Llanos et al., 1993) (Figura 3.12).



**Figura 3.13.** Mecanismo de interacción espermatozoide-ovocito. PVS: Espacio perivitelino (tomado y modificado de Ikawa et al., 2010).

Como hemos mencionado anteriormente, en los mamíferos, los ovocitos maduros preparados para la fecundación están rodeados por una envoltura llamada zona pelúcida (ZP), que a su vez, está rodeada de numerosas células foliculares incrustadas en una matriz acelular (polímeros de ácido hialurónico). En conjunto, este complejo se conoce como *cumulus oophorus*-ovocito. Aunque es seguro que los espermatozoides, con la ayuda de la hiperactivación flagelar, sufren la RA en el momento de entrar en la ZP, el lugar donde los espermatozoides comienzan su RA ha sido y está siendo objeto de controversia (Yanagimachi, 2011).

Las primeras investigaciones, las cuales analizaron los complejos *cumulus oophorus*-ovocito procedentes de oviducto tras la fecundación, encontraron espermatozoides intactos con el acrosoma modificado o no en el

interior del cúmulo en el momento de la fecundación (Austin y Bishop, 1958b; Cummins y Yanagimachi, 1982; 1986; Yanagimachi, 1986). Yanagimachi y Philips (1984) indicaron que la mayoría de los espermatozoides de hámster que fecundaban los ovocitos *in vivo*, iniciaban su RA mientras iban avanzando a través del cúmulo. Otros investigadores, en especial aquellos que trabajaban con fecundación *in vitro* de ratón, eran opuestos a esta idea y mantenía que el sitio donde fisiológicamente se producía la RA era la ZP (Kopf, 1991; Florman y Ducibella, 2006; Gupta et al., 2007). Esta última hipótesis se basa en: (a) el espermatozoide con el acrosoma intacto se une a la ZP *in vitro* y tiene lugar la RA (Saling y Storey, 1979; Florman y Storey, 1982; Storey et al., 1984); (b) la ZP solubilizada, en particular la ZP3, une específicamente la región acrosomal de la cabeza espermática e induce la RA de forma tan efectiva como el ionóforo de calcio utilizado *in vitro* (Bleil y Wassarman, 1983; Litscher et al., 2009)

Pero hay que reseñar que nunca se ha seguido a un espermatozoide desde el inicio de la RA hasta el final de la fecundación (singamia). El espermatozoide que empieza la RA en la ZP puede no ser el que fecunde (Yanagimachi, 2011). Recientemente, Gahlay et al. (2010) pusieron en duda la habilidad de la ZP para inducir la RA. En relación con estas investigaciones, la ZP de ratones transgénicos (ZP2<sup>mut</sup>, ZP3<sup>mut</sup>) son incapaces de inducir la RA, sin embargo, los ovocitos de estas cepas si fueron fecundados, lo que sugiere que en la fecundación la RA de los espermatozoides se produce antes de su contacto con la zona (Gahlay et al., 2010).

Hirohashi y sus colaboradores (revisado por Jin et al., 2011), intentaron recientemente clarificar este hecho, mediante la grabación en video de espermatozoides de ratón tras la inseminación *in vitro* de los complejos *cumulus oophorus*-ovocitos. Para ello utilizaron ratones macho transgénicos los cuales expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) en sus acrosomas. Las cabezas se mostraban verdes fluorescentes cuando su acrosoma se encontraba intacto. Esta fluorescencia desaparece cuando se iniciaba la RA (Nakanishi et al., 1999). Lo novedoso de este estudio era que los investigadores podían seguir la fecundación mediante el análisis de imágenes.

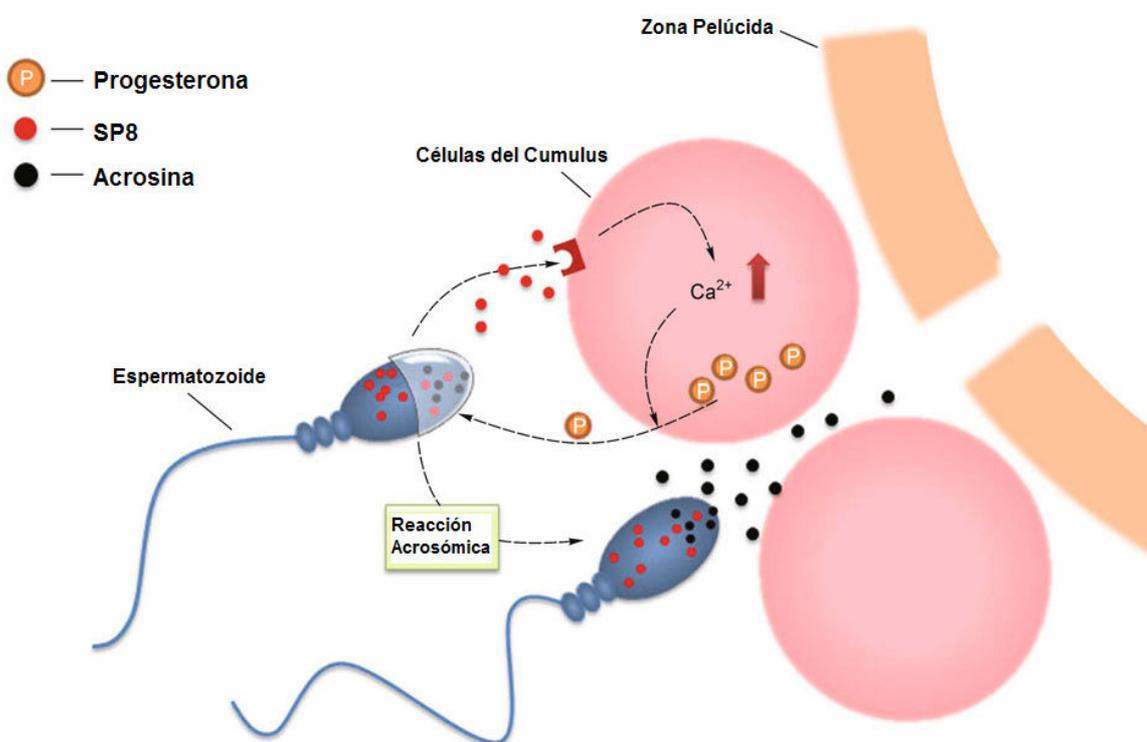
Los resultados obtenidos fueron sorprendentes. La mayoría de los espermatozoides que fecundaron ya habían sufrido la RA en su proximidad al cúmulo. En otras palabras, el inicio de la RA en la zona fue la excepción, no la regla.

Estos resultados fueron similares a los observados en los espermatozoides de cobaya, los cuales únicamente se unían y penetraban la ZP después de la RA (Huang et al., 1981). El trabajo de Jin et al. (2011), nos indica que debemos investigar este mecanismo de interacción, haciendo hincapié en como el espermatozoide fecunda. En muchas especies, la fecundación *in vitro* es posible sin la presencia de cúmulo. No hay duda de que la ZP tiene la capacidad para inducir o acelerar la AR, pero no puede ser considerada como la única sustancia innata que induce la RA de manera fisiológica (Yanagimachi, 2011). Hirohashi y sus colaboradores (2008) no han precisado el sitio donde los espermatozoides de ratón comienzan su RA., sin embargo, lo que se desprende de este estudio es que los espermatozoides de ratón que han iniciado la RA antes de llegar a la ZP fueron capaces de fecundar.

También se ha observado que la dispersión del contenido acrosomal persiste al menos durante 15 min después del inicio de RA *in vitro*, lo que indica que la situación del acrosoma ni es *OFF* (intacto) ni *ON* (reaccionado), si no que incluye una serie de estados intermedios (Hardy et al., 1991; Kim et al., 2001; Kim y Gerton, 2003; Sutovsky, 2010). En muchas especies, la progesterona está presente en el fluido folicular preovulatorio y es liberado al oviducto durante la ovulación, esta puede ser la fuente de progesterona local en el sitio de fecundación. Por lo tanto, se ha sugerido que la progesterona sea el desencadenante de la RA en el *cumulus in vivo*.

Desafortunadamente este proceso aun no está totalmente comprendido, puesto que no queda claro como el espermatozoide interactúa con las células del *cumulus* y dispara la producción/liberación de la progesterona, aunque ha habido investigaciones que muestran que la movilización del calcio es la responsable para la liberación de la progesterona (Jezová et al., 2001;

O'Donnell et al., 2004). El hallazgo reciente de un factor espermático (NYD-SP8), que puede ser liberado durante la interacción espermatozoide-cúmulos la progesterona induce la liberación de calcio-dependiente (Yin et al., 2009), ha arrojado nueva luz en nuestro entendimiento del proceso de RA durante la penetración espermática de los cúmulos. Se ha sugerido que el NYD-SP8 se une a las células del *cumulus* y promueve la producción de progesterona de una manera calcio dependiente, la cual hace que se produzca la reacción acrosómica (Figura 3.14)



**Figura 3.14.** Representación esquemática de la liberación espermática de NYD-SP8 (SP8) y su interacción con las células del cumulus (tomado y modificado de Sun et al., 2011).

### 3.5.2.2. Unión secundaria del espermatozoide a la Zona Pelúcida

Las proteínas intra acrosomales son expuestas después de la reacción acrosómica (ver apartado 3.5.2.1.1) y están involucradas en una adhesión más fuerte de la célula espermática a la ZP (unión secundaria a la ZP) (McLeskey et al., 1998). Se han identificado varias proteínas involucradas en la unión secundaria a la ZP, como por ejemplo: PH-20 (Lin et al., 1993; Hunnicutt et al., 1996; Sabeur et al., 1997), sp38 (Mori et al., 1993) acrosina (Richardson y

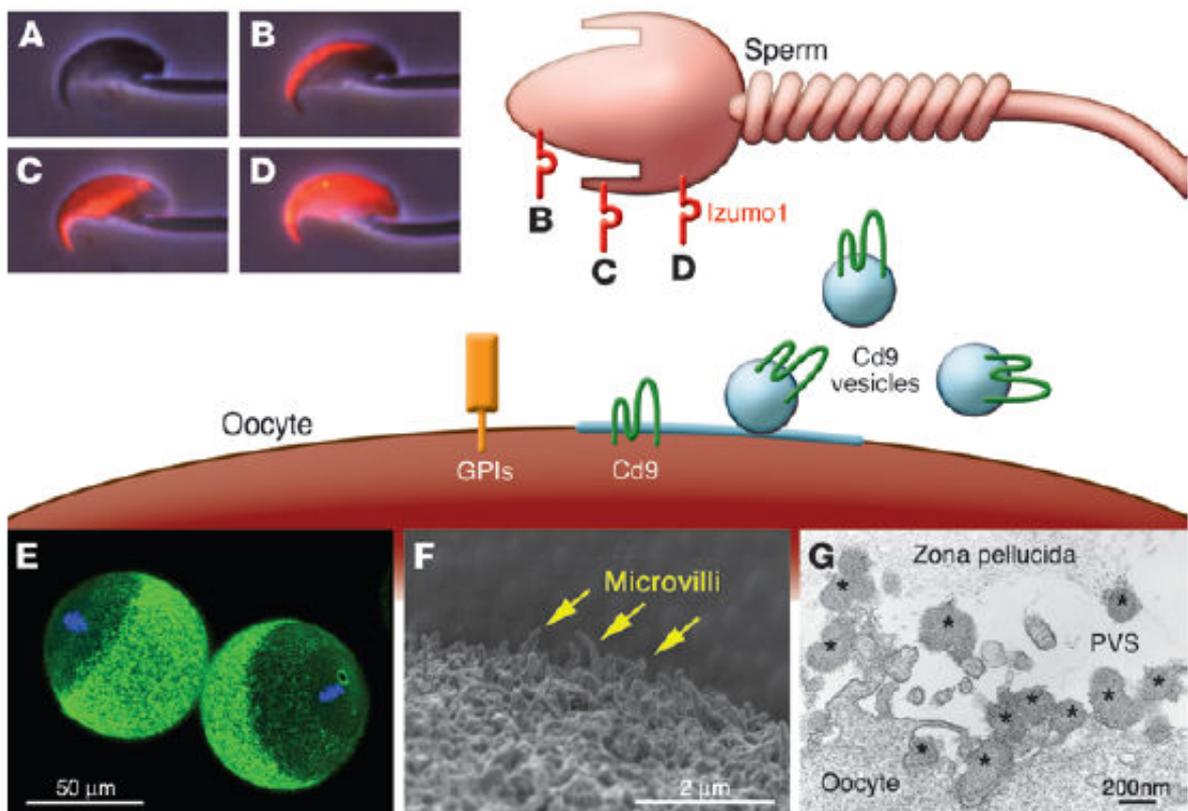
Orand, 1996), y P-selectina (Geng et al., 1997; Oehninger et al., 1998). La acrosina y la PH-20 tienen además de la función mencionada con anterioridad, actividad proteinasa y hialuronidasa (Kim et al., 2005). La unión con estas proteínas podría prevenir la liberación de los espermatozoides hiperactivos que se encuentran unidos a la ZP. Mientras tanto su actividad enzimática es utilizada para digerir la matriz de la ZP, para que a continuación se unan a un nuevo sustrato (Wassarman y Litscher, 1995).

### 3.5.3. Fusión de la membrana plasmática entre gametos

Una vez que se ha producido la RA y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide penetra en la ZP hasta alcanzar el espacio perivitelino del ovocito. Al parecer, la penetración del espermatozoide a través de la ZP depende de tanto de las enzimas procedentes del acrosoma que se liberan durante la RA como del batido del flagelo (O'Rand et al., 1986). Inmediatamente tras la penetración de la ZP, el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. En el espermatozoide la porción de membrana plasmática, región o segmento ecuatorial, que cubre parte del acrosoma no se fusiona con la membrana acrosomal externa durante la RA y es en esta región donde se produce el contacto con el oolema y se inicia el proceso de fusión entre ambos gametos (Ikawa et al., 2010) (ver Figura 3.15). En el caso del ovocito, la fusión tiene lugar en las microvellosidades presentes en la mayor parte del oolema (Figura 3.15 E-F), las cuales se han propuesto como lugar donde se encuentran las proteínas implicadas en el proceso de fusión y adhesión (Runge et al., 2007).

Se ha comprobado que existen diferentes proteínas implicadas en la fusión de las membranas plasmáticas. Se han descrito estas proteínas a nivel espermático como la fertilina (Myles y Primakoff, 1997) y la familia de proteínas tipo inmunoglobulinas, denominadas *Izumo*, necesarias para que tenga lugar la fusión (revisado por Cánovas y Coy, 2008; Ikawa et al., 2010) (Figura 3.15). Inoue et al. (2005), comprobaron que ratones *Izumo*<sup>-/-</sup>, eran incapaces de fecundar. Pero cuando la fusión de membranas era evitada mediante la inyección intracitoplasmática (ICSI) de estos espermatozoides, estos activaban

al ovocito y la fecundación se llevaba a cabo de manera normal. Por tanto, se llegó a la conclusión de que Izumo1 es esencial para la fusión de membranas entre gametos. Aunque otros estudios hablan también de la implicación de varias moléculas a nivel ovocitario, denominadas integrinas y tetraspaninas, como la Cd9 (Evans, 2002; Kaji y Kudo, 2004). La tetraspanina Cd9 se ha visto que es esencial en el ovocito para la unión espermática, y por lo tanto para que se produzca la fecundación (Miyado et al., 2000).



**Figura 3.15.** Mecanismo propuesto para la fusión espermatozoide-ovocito. Izumo1 (espermatozoide) y Cd9 (ovocito) son dos moléculas esenciales para la fusión entre gametos. Las proteínas de anclaje-GPI en la superficie del ovocito, también son esenciales, pero todavía no han podido ser identificadas. (A) Izumo1 es una proteína de membrana acrosomal que no está expuesta antes de que la reacción acrosómica sea completada. El acrosoma reaccionado del espermatozoide puede ser clasificado en 3 grupos dependiendo del patrón de tinción de Izumo1: (B) capuchón acrosomal, (C) ecuatorial, (D) toda la cabeza. (E y F) Cd9 está localizada en los cilios que rodean la superficie del ovocito, excepto en la placa metafásica. (G) Cd9 contiene vesículas (asteriscos) secretadas desde el ovocito que son capaces de traslocarse sobre la superficie del espermatozoide y pueden jugar un papel importante en la fusión de gametos (Ikawa et al., 2010).

El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres etapas:

1) **Reconocimiento de membranas y adhesión:** se trata de un contacto inicial entre las dos membranas mediada por uniones proteína-proteína o por uniones proteína-carbohidrato.

2) **Aposición de las membranas:** la actividad fusogénica de las proteínas conlleva a que las dos membranas tengan un contacto íntimo y se produzca la unión física entre ellas (a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína), lo cual implica un cambio de conformación irreversible (revisado por Cánovas y Coy, 2008).

3) **Integración de lípidos:** una vez que las membranas están en contacto, se produce una combinación de lípidos dando como resultado una bicapa que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células (Jahn y Grubmuller, 2002).

Por último, indicar que el espermatozoide se introduce en su totalidad (dependiendo de la especie) en el ooplasma, la porción anterior de la cabeza se incorpora mediante fagocitosis y la parte posterior de la misma y el flagelo se internalizan mediante la fusión de las membranas (Gaddum-Rosse, 1985). Únicamente las mitocondrias maternas pasaran a la siguiente generación, ya que las mitocondrias presentes en el flagelo del espermatozoide son degradadas.

#### **3.5.4. Interacción del espermatozoide con el oolema, activación del ovocito y formación pronuclear**

La fusión de las membranas de ambos gametos dará lugar a la activación del ovocito y el inicio de una cascada de señalización que resulta en la conversión del ovocito en un embrión diploide capaz de formar un nuevo organismo (Yanagimachi, 1994a). Como resultado de esta activación se produce cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, la reanudación de la meiosis, la reacción cortical y finalmente la formación de los pronúcleos masculinos y femenino (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

Una vez que el espermatozoide se encuentra en el ooplasma tienen lugar la separación entre cola y cabeza. Seguidamente, debido a la pérdida de la envoltura nuclear espermática la cromatina queda libre en el citoplasma ovocitario y comienza su descondensación (Yanagimachi, 1994a). Se han postulado dos teorías acerca de la activación ovocitaria. La primera, es que exista algún receptor espermático en el interior del citoplasma del ovocito, y la segunda, que exista un factor espermático que dé lugar a dicha activación.

La hipótesis de que una molécula en la superficie espermática pueda actuar como ligando para inducir una activación de un receptor de la fosfolipasa C (PLC) del ovocito ha sido estudiada por varios laboratorios. Se ha demostrado que la actividad de la fosfolipasa C del ovocito por una estimulación de los receptores pareados de una proteína G que se introduce en el ovocito resulta en la activación del mismo (Williams, 2002). Sin embargo, no se obtuvo un efecto inhibitorio en la activación ovocitaria cuando se bloqueó la proteína G nativa del ovocito (Williams et al., 1998).

Una hipótesis alternativa hoy en día aceptada, es que un factor del espermatozoide, que entra en el ovocito en el momento de la fusión de los gametos, es el responsable de la generación de inositol- 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>. La hipótesis de un “factor espermático” es sustentada por el hecho de que los extractos espermáticos de diferentes especies, cuando son microinyectados en ovocitos, resultan en oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> y otros eventos de la activación del ovocito (Dale et al., 1985; Stice y Robl, 1990). Ya que el factor espermático es sensible al calor y a las proteasas (Swann, 1990), se piensa que es una proteína; sin embargo, la identificación del factor espermático aun no ha sido esclarecida. Para confirmar que el factor espermático es una proteína debería tener características específicas:

- El factor espermático debería de encontrarse asociado a cabezas espermáticas aisladas (Kuretake et al., 1996) y debería tener un peso molecular de entre 30-100 kDa (Parrington et al., 1996; Kimura et al., 1998).

- El factor espermático debería inducir oscilaciones de calcio parecidas a aquellas que fueron vistas en la fecundación (Swann, 1990), y debería de estar activo cuando se microinyecta en ovocitos en cantidades aproximadas a aquellas que estarían presentes en un único espermatozoide. Además estas oscilaciones de calcio deberían inducirse vía  $IP_3$  que induce el mecanismo de liberación de calcio (Oda et al., 1999).
- Por último, si el factor espermático es verdaderamente un activador fisiológico del ovocito, este debería tener la posibilidad de prevenir la activación del ovocito inducido por el esperma, mediante el bloqueo de la función del factor espermático (Williams, 2002).

Se han propuesto varias proteínas como candidatas del factor espermático. La primera proteína aislada que se consideró como el factor espermático fue la oscilina (Parrington et al., 1996), pero más tarde se demostró que no poseía la habilidad de generar oscilaciones de  $Ca^{2+}$  (Wolny et al., 1999). Otro de los candidatos fue el receptor c-Kit (tr-kit). A pesar de que la microinyección de extractos de células que expresaban esta proteína dentro de los ovocitos de ratón causaba muchos eventos de la activación del ovocito, la mayoría de la proteína endógena estaba asociada con la cola del espermatozoide, no a la cabeza espermática (Sette et al., 1997). Hay un interés considerable en la posibilidad de que una PLC asociada al espermatozoide pudiera ser el factor espermático (Jones et al., 1998). Sin embargo, las isoformas conocidas de PLC presentes en el espermatozoide no co-purifica con la actividad del factor espermático (Parrington et al., 2002) y las formas recombinantes de algunas isoformas de la PLC no inducen oscilaciones de  $Ca^{2+}$  cuando se microinyectan en ovocitos de ratón (Jones et al., 2000).

Los resultados posteriores sustentan la posibilidad de que el factor espermático activa una PLC del ovocito más que una PLC en sí. Recientemente, una proteína de la *teca perinuclear* (ver apartado 3.1.1.1) conocida como la PT32 fue clonada, y es una candidata viable para el factor espermático en los mamíferos (Williams, 2002). Además, las propiedades

bioquímicas de la PT32 imita a aquellas previamente reportadas para el factor espermático, incluyendo su aparente peso molecular de 32 kDa y la habilidad para ser extraído del esperma por métodos de congelación y descongelación o de agentes reductores (Okó et al., 2001).

Como ya hemos mencionado anteriormente, la activación del ovocito involucra un gran número de puntos clave, algunos de ellos ocurren dentro de segundos o minutos de la interacción de las membranas plasmáticas del espermatozoide-ovocito y algunos otros que ocurren durante el curso de varias horas (Yanagimachi, 1994a; Schultz y Kopf, 1995). Uno de los acontecimientos más tempranos de la activación ovocitaria es el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, pero los mecanismos de señalización por los cuales el espermatozoide induce un cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dentro del ovocito aun están siendo estudiados (Williams, 2002). Las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causan la exocitosis de gránulos corticales que están localizados en la región cortical del ovocito, por debajo de la membrana plasmática (Abbott y Ducibella, 2001). Estos gránulos contienen enzimas que son liberadas en el espacio perivitelino provocando modificaciones en la ZP que previenen la adhesión de otros espermatozoides y la penetración de estos a la ZP (Bleil et al., 1981). Estas alteraciones en la ZP constituyen un mecanismo importante por el cual algunos mamíferos, incluyendo al humano, previenen la polispermia (Yanagimachi, 1994a).

Un componente crítico de la activación del ovocito es la reanudación de la meiosis II. Durante la reanudación meiótica se observan también cambios morfológicos como la rotación del huso metafásico (en algunas especies), entra en anafase y la emisión del segundo corpúsculo polar. En este punto, el ADN originario del gameto femenino se vuelve haploide (Williams, 2002).

Varias horas después de la fusión del espermatozoide-ovocito, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  cesan y se forman los pronúcleos femenino (PNF) y masculino (PNM). De este modo, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma una nueva membrana nuclear, dando lugar al PNM.

Por otro lado, el núcleo femenino haploide (tras la extrusión del segundo corpúsculo polar) también se descondensa y se forma la membrana nuclear dando lugar al llamado PNF. La síntesis de ADN comienza simultáneamente en los dos pronúcleos. El factor que controla la formación del PNM se conoce como factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Thibault y Gerard, 1973), y aparece en el ovocito durante la fase final de su maduración (Ding et al., 1992).

En la mayoría de las especies, el ovocito posee una serie de factores citoplasmáticos que reaccionan con la cromatina espermática dando lugar a una serie de cambios tales como la rotura de puentes disulfuro, la degradación enzimática parcial de proteínas nucleares, la liberación de las protaminas asociadas a la cromatina y su inmediata sustitución por histonas procedentes del ovocito (Zirkin et al., 1989). Entre estos factores citoplasmáticos destaca el glutatión (GSH). Se sabe que la síntesis de GSH durante la maduración de los ovocitos es un prerequisite para que se produzca la descondensación de la cromatina espermática y, por tanto, para que se consiga la formación del PNM (Perreault et al., 1988), debido a que el GSH reduce de los puentes disulfuro de las protaminas del núcleo espermático, lo que favorece su rotura (Nagai, 1996).

### **3.5.5. Singamia**

Una vez ya formados, ambos pronúcleos (PNF y PNM) migran a través del citoplasma hacia el centro del ovocito, hasta quedar próximos entre sí. Posteriormente, comienzan a desintegrarse sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian antes de que se produzca la primera división mitótica.

La unión de los pronúcleos se considera como el fin de la fecundación, y por tanto, el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988).

### **3.5.6. Modificación en los procesos biológicos de fecundación: inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)**

La técnica de ICSI, primero desarrollada en el hámster (Uehara y Yanagimachi, 1976), y posteriormente desarrollada en el humano como tratamiento para casos de infertilidad del gameto masculino (Palermo et al., 1992), es una técnica mediante la cual se selecciona un espermatozoide y se microinyecta dentro del citoplasma del ovocito en metafase II. Por tanto, este proceso evita varios pasos de la fecundación, y modifica algunos de ellos, que tanto las membranas espermáticas como el acrosoma son introducidos en el ovocito. Los ovocitos una vez inyectados se activan y llegan a un estado embrionario capaz de terminar su desarrollo. No solo se han utilizado en esta técnica espermatozoides eyaculados, sino también se ha descrito el posible uso de espermatozoides epididimarios y testiculares con resultados similares (revisado por García-Roselló et al., 2009).

Los resultados obtenidos mediante la ICSI sugieren que los eventos de señalización importantes para la activación del ovocito pueden ser determinados por componentes espermáticos en la ausencia de la interacción de la ZP, así como también con la interacción de la membrana plasmática del espermatozoide y del ovocito, respaldando la idea que el factor espermático es el responsable de la iniciación de la activación del ovocito (revisado por Williams, 2002). De hecho, diferencias en los tratamientos espermáticos previos a la ICSI afectan las oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , activación ovocitaria y formación pronuclear (revisado por García-Roselló et al., 2009).

Una de las diferencias entre la ICSI y la fecundación normal es la diferencia en el tiempo de oscilaciones de  $Ca^{2+}$ . Aunque el primer tránsito de  $Ca^{2+}$  comience normalmente pocos min tras la fusión del espermatozoide-ovocito, las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en la ICSI comienzan con un retraso de alrededor de 30 minutos a varias horas en el ovocito de ratón y humano (Tesarik y Sousa, 1994; Nakano et al., 1997; Yanagida et al., 2001). Experimentos similares en primates indican que existe además, un retraso en la descondensación de la cromatina espermática después de la ICSI,

particularmente en la porción anterior de la cabeza espermática. Este hallazgo puede ser explicado por la persistencia de las estructuras del acrosoma y de la TP que están sobre la capa anterior de la cabeza del espermatozoide después de la ICSI y que previene la exposición de esta región a los factores descondensadores en el citoplasma del ovocito.

Del mismo modo que los resultados obtenidos sobre retraso en la descondensación espermática, la síntesis del ADN, la cual es requerida antes de la singamia y la primera división, se ve retrasada en ambos pronúcleos (masculino y femenino) después de la ICSI (Ramalho-Santos et al., 2000). La ICSI sitúa a los componentes del espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito, que normalmente no entrarían a él, incluyendo el acrosoma y la membrana plasmática externa de la cabeza espermática, como hemos mencionado anteriormente. Se han realizado diferentes estudios utilizando tratamientos espermáticos que dañaran la membrana plasmática del espermatozoide para favorecer la descondensación y formación pronuclear. Entre estos tratamientos se encuentre el Tritón X-100 (Tian et al., 2006), congelación-descongelación sin crioprotector (Kolbe y Holtz, 1999) o DTT (Suttner et al., 2000).

Una parte importante es la concerniente a las enzimas presentes dentro del acrosoma que, cuando son liberadas dentro del citoplasma del ovocito pueden afectar las actividades de proteínas celulares importantes (Williams, 2002), siendo potencialmente tóxico para el desarrollo embrionario. Un estudio realizado en ratones por Morozumi y Yanagimachi (2005), sugiere que el éxito de la ICSI podría mejorarse eliminando las membranas plasmáticas y acrosoma del espermatozoide antes del proceso de inyección, para que los procesos propios de la fecundación como la activación ovocitaria y la formación pronuclear sean más rápidos.

Por otra parte, los gránulos corticales que normalmente experimentan una exocitosis en el momento de la fertilización, pueden ser retenidos dentro del citoplasma del ovocito después de la ICSI. Aunque eventualmente se

pierdan o se degraden, aún no se conoce si la retención de estos componentes puede tener después efectos sobre el desarrollo.

Aún no se conoce exactamente muchos de los mecanismos de señalización de la activación del ovocito mediante esta técnica. El hallazgo más importante hasta ahora para la PT32 como un factor espermático potencial es que la proteína recombinante es capaz de inducir la activación ovocitaria en ovocitos porcinos, comprobándolo por marcadores fisiológicos incluyendo la formación pronuclear, cuando se inyecta dentro de los ovocitos en cantidades aproximadas a aquellas a las que se estima están presente en un solo espermatozoide (Sutovsky et al., 2001). Esta proteína recombinante induce oscilaciones de  $Ca^{2+}$  cuando es microinyectada dentro de los ovocitos, y aquella inhibición de su función previene la activación del ovocito inducida por el espermatozoide. Pero, el mecanismo por el cual PT32 puede iniciar la activación ovocitaria y la molécula(s) con las cuales interactúa dentro del ovocito, son todavía desconocidas (Williams, 2002).

## **4. MATERIAL Y METÓDOS**

## 4.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS

La mayoría de los reactivos utilizados en la realización de los experimentos fueron suministrados por Sigma (*Sigma-Aldrich*®, Madrid, España). Para aquellas experiencias en los que se hubieran utilizado productos de otra casa comercial, ésta se especificará en el apartado correspondiente.

### 4.1.1. Medios de dilución y de manipulación de espermatozoides

■ **Beltsville Thawing Solution (BTS):** Para la dilución y manipulación de los espermatozoides se utilizó el medio BTS (Tabla 4.1).

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

Tabla 4.1. Composición del medio BTS (Pursel y Johnson, 1975).

■ **Tampón de lavado para espermatozoides (*Phosphate Buffer Solution-PBS*):** Durante el proceso de extracción de membranas espermáticas se utilizó el medio PBS libre de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y proteínas (Tabla 4.2. Se conservó a 4° C durante un máximo de 4 semanas.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	2.70
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.62
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.09
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.47

Tabla 4.2. Composición del tampón de lavado: PBS sin Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y proteínas.

**Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (TALP):** La solución stock de TALP (Tabla 4.3) se elaboró en el laboratorio con agua ultra pura *Milli-Q* (Millipore, EE.UU.). Posteriormente, se esterilizó mediante filtros con un diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Se conservó bajo condiciones estériles a 4° C durante un máximo de 2 semanas.

El mismo día de su uso se suplementaron 100 ml de TALP stock con 0.3 gr de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) (según la experiencia) y 0.012 gr de piruvato sódico y se filtró de nuevo. Durante al menos 2 h antes de su uso se ajustó el pH del medio a 7.4 en un incubador (Heraeus Instruments, Alemania) con un 5% de  $\text{CO}_2$ , 38.5° C y atmósfera saturada de humedad.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	114.06
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
KCl	3.20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.35
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.50
Lactato Cálxico·5H <sub>2</sub> O	8.00
Lactato Sódico	10.00
Glucosa	5.00
Cafeína	2.00
Sulfato de Kanamicina	0.17
Rojo Fenol	0.003
PVA	1 mg/ml

**Tabla 4.3.** Composición del medio TALP (Rath et al., 1999).

**Buffer de lisis:** Para la extracción de la porción soluble de las membranas plasmáticas de los espermatozoides se utilizó el buffer de lisis cuya composición queda detallada en la Tabla 4.4.

Componentes	Concentración
Tris/HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón X-100	1%
Deoxicolato	1%
EGTA	1.0 mM
EDTA	0.4 mM
Pepstatina (Roche®)	10 µg/ml
Aprotinina (Roche®)	25 µg/ml
Leupeptina (Roche®)	25 µg/ml
PMSF (Roche®)	1.0 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Ortovanadato)	0.20 mM

Tabla 4.4. Composición del buffer de lisis.

■ **Soluciones de Percoll®:** El Percoll® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) se preparó a partir de una solución stock de sales 10x (Tabla 4.5). De esta solución se preparó una solución iso-osmótica estéril de Percoll® al 90% (Tabla 4.6). La cual se conservó a 4° C durante un máximo 2 semanas (Parrish et al., 1995).

Componentes	Concentración
KCl 1 (M)	3.1 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 (M)	2.9 ml
NaCl	4.675 gr
Hepes	2.38 gr
Agua	60 ml

Tabla 4.5. Composición de la solución Stock 10x de sales.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	0.97
HEPES	0.10
KCl	1.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10
NaHCO <sub>3</sub>	0.15
CaCl <sub>2</sub>	1.00
MgCl <sub>2</sub>	0.10
Lactato sódico	0.001
Percoll®	90 ml

**Tabla 4.6.** Composición de la solución para la preparación de Percoll® 90% (Parrish et al., 1995).

A partir de la solución de Percoll® al 90%, se prepararon las soluciones de Percoll® 45% (dilución de 1 ml de Percoll® 90% + 1 ml de BTS) y Percoll® 54% (dilución de 2.4 ml de Percoll® de 90% + 1.6 ml de BTS).

#### 4.1.2. Medio de transporte y lavado de ovarios y ovocitos

Los medios utilizados para el transporte y lavado de los ovarios, así como los medio utilizados durante la obtención de los ovocitos se detallan a continuación:

■ **Solución Salina (SS):** Los ovarios procedentes de matadero se transportaron en un termo con SS atemperada a 38° C compuesta de NaCl (0.9%) y sulfato de kanamicina 100 mg/l.

■ **Solución de cetrimida** (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio: *Cetab*) al 0.04% (w/v).

■ **Tampón Fosfato Salino de Dulbecco modificado (PBS):** Para la manipulación y el lavado de los ovocitos recién recolectados, se utilizó PBS suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinílico y 0.005 mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Este medio se conservó a 4° C hasta su uso.

El medio utilizado para el lavado de los ovocitos maduros, y durante la inyección (ICSI) fue **PBS suplementado** con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB; Biological Industries<sup>®</sup>, Haemek, Israel).

#### 4.1.3. Medios de cultivo

La preparación de todos los medios de cultivo empleados para este trabajo se realizó utilizando agua ultrapura *Milli-Q* (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.), añadiendo todos los componentes y los suplementos específicos. Tras la elaboración de los medios, se realizó la medición de osmolaridad (Automatic Micro-Osmometro Typ, Roebing, Berlín, Alemania) y el pH (Crison Micro pH 2002, Instruments Barcelona, España). Posteriormente, se procedió a la esterilización mediante un filtro de membrana con diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.), en cabina de flujo laminar. La conservación de los medios se realizó a 4° C en condiciones estériles y durante un tiempo máximo de 2 semanas.

■ **North Carolina State University 37 (NCSU-37)**: Se preparó en el laboratorio una solución stock de NCSU-37 con agua ultrapura (Tabla 4.7). Este medio fue suplementado con cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol, insulina, dibutil AMP-cíclico (dbAMPC), fluído folicular porcino (FFP), PMSG (*Foligón®*, *Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda*) y hCG (*Veterin Corion, Divasa Farmavic, Barcelona, España*) tal y como describen Funahashi et al. (1997) para la maduración *in vitro* de ovocitos (Tabla 4.8). Al menos 2 h antes de su uso se ajustó el pH del medio a 7.4 en un incubador (Heraeus Instruments, Alemania) con un 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5° C y atmósfera saturada de humedad.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
KCl	4.78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.19
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.0
Penicilina G Sódica	0.18
Sulfato de Estreptomicina	39.00 UI/ml

**Tabla 4.7.** Composición del medio NCSU-37 stock (Petters y Wells, 1993).

Componentes	Concentración
Cisteína	0.57 mM
β- Mercaptoetanol	50.00 μM
Insulina	5.00 mg/l
db AMPC	1.00 mM
FFP	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

**Tabla 4.8.** Composición del suplemento del medio NCSU-37 para maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (Funahashi et al., 1997).

El FFP se obtuvo por aspiración de folículos antrales (2-5 mm de Ø) de ovarios procedentes del sacrificio en matadero de hembras prepúberes; el contenido folicular aspirado se centrifugó a 1500g durante 30 min. El sobrenadante se esterilizó a través de una serie de filtros (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) con un poro de membrana de 0.8, 0.45 y 0.22 μm. Finalmente se dispusieron en alícuotas de 1 ml, para proceder a su almacenamiento a -20° C hasta su uso.

## 4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

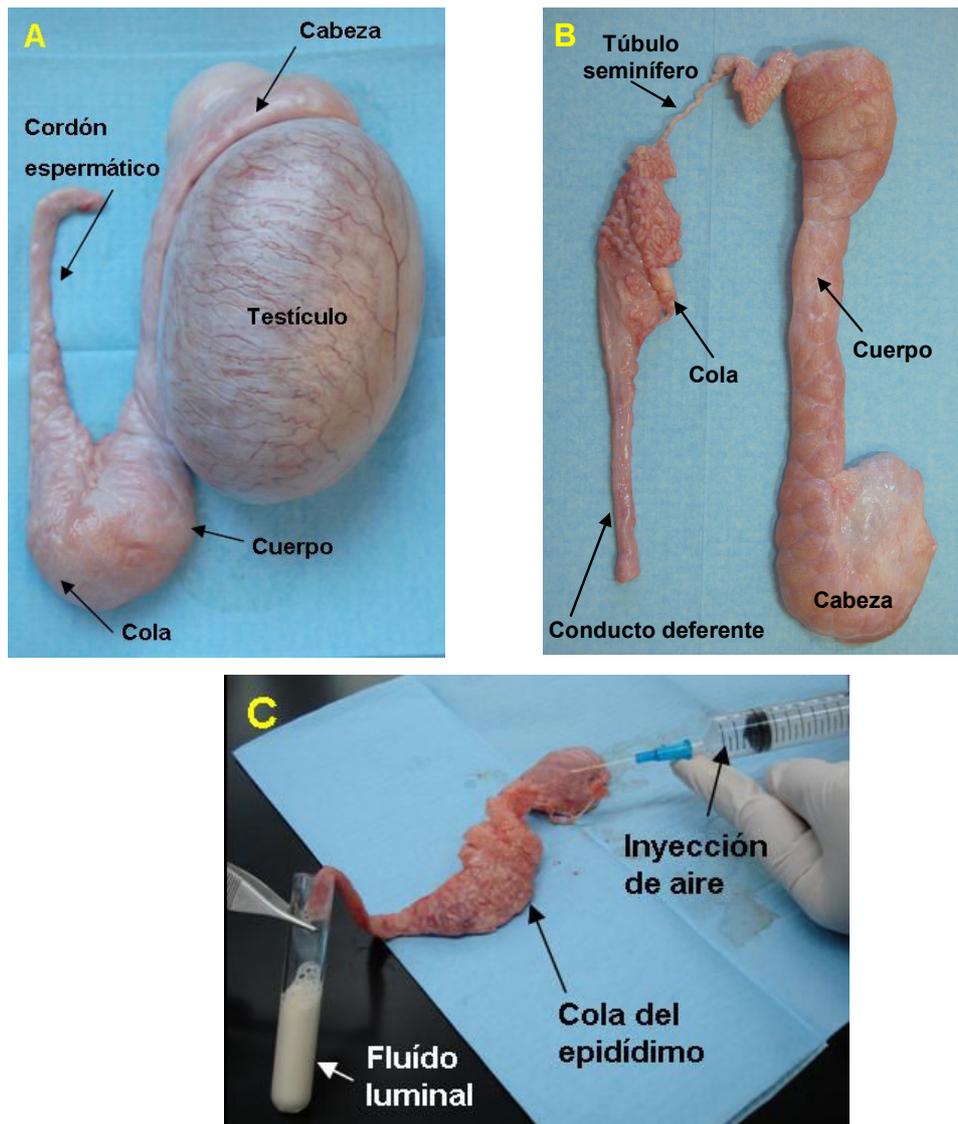
### 4.2.1. Obtención de espermatozoides

#### ■ Epididimarios

Para la obtención de espermatozoides procedentes de la porción caudal del epidídimo, se recolectaron testículos de verracos sanos sacrificados en el matadero “El Pozo” de la empresa *Fuertes S. A.* situado a 30 Km del laboratorio (Alhama de Murcia, Murcia). El transporte al laboratorio se realizó en un recipiente isoterma en un plazo máximo de 1 h desde el sacrificio de los animales hasta su llegada. Una vez en el laboratorio, se separaron los testículos de los epidídimos (Figura 4.1-A) y se lavaron con SS.

Se realizó una disección de la cola del epidídimo, eliminando la túnica albugínea, dejando de este modo una porción libre del conducto deferente recto (Figura 4.1-B). Posteriormente, se obtuvo la secreción del mismo introduciendo aire al tubo seminífero a través de un *introcan*® de 0,7 x 19 mm (Certo, Braun, Alemania) acoplado a una jeringuilla de 5 ml, (Figura 4.1-C).

Dado que la concentración de espermatozoides en el epidídimo es elevada y se hace difícil el conteo y su manipulación, se realizó una dilución 1:20 con BTS para alguna de las experiencias.



**Figura. 4.1.** A) Testículo y epidídimo de cerdo; B) Epidídimo diseccionado; C) Extracción de fluido luminal por medio de inyección de aire anterógrado.

## ■ Eyaculados

Los espermatozoides eyaculados se obtuvieron de diferentes verracos (Landrace x Pietrain) de fertilidad probada, procedentes del centro de inseminación artificial "Dalland S.A." (Murcia, España). La obtención del semen se realizó mediante el método manual (King y Macpherson, 1973). La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) se eliminó, y la segunda fracción (rica en espermatozoides) se recolectó en un termo estéril

precalentado a 37° C (para evitar el choque térmico) y filtrada mediante gasas estériles (Figura 4.2) para descartar las secreciones de la glándula de Cowper.



**Figura. 4.2.** Imagen de la obtención de espermatozoides de eyaculado de verraco mediante el método manual.

Inmediatamente tras la recolección el eyaculado se transportó al laboratorio y se sometió a una rápida evaluación. Para ello, se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles, motilidad progresiva y formas anormales. La motilidad se evaluó mediante la observación de una muestra en el microscopio de campo claro con objetivo 10X, depositando 10  $\mu$ l de la muestra sobre un portaobjetos precalentado en una placa térmica atemperada a 38° C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido en una escala de 0 a 5. Para el estudio de la morfología, se fijó una muestra de semen en SS formolada al 0.3% y se valoró en un microscopio de contraste de fases (Leica® modelo DMR, EE.UU.) con objetivo de inmersión (100X), los espermatozoides se clasificaron en: normales, colas en látigo, colas en ovillo, gotas citoplasmáticas proximales y distales.

Para este estudio, se seleccionaron aquellas muestras que tenían una motilidad > 65%, una motilidad progresiva superior a 2.5 y < 25% de formas anormales.

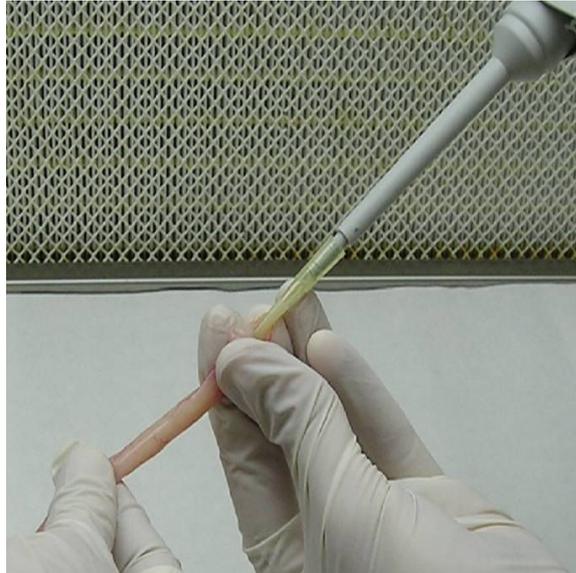
#### 4.2.2. Obtención del fluido oviductal porcino (FOP)

Los oviductos se recolectaron de cerdas sacrificadas en el matadero “El Pozo” y se transportaron en un termo manteniendo una temperatura de 38° C. Se utilizaron aquellos que procedían de ovarios con folículos recién ovulados (fase luteal temprana) (Figura 4.3). Previamente a la recolección del FOP, se realizó la disección de los oviductos en una placa de petri de 60 mm de diámetro sobre un baño de hielo. Desde el istmo hacia la ampolla e infundíbulo se fue liberando al oviducto de los tejidos adyacentes.



**Figura. 4.3.** Imagen de ovarios y oviductos de cerda en la fase luteal temprana.

El FOP se recolectó mediante aspiración con la ayuda de una pipeta automática de 200  $\mu$ l, la cual se acopló en la ampolla oviductal a la vez que se realizaba la presión manual de las paredes oviductales en dirección istmo-ampolla (Figura 4.4). Una vez obtenido el FOP se depositó en un tubo *eppendorf* el cual contenía 10  $\mu$ l de inhibidor de proteasas (Roche®, Madrid, España), se centrifugó a 7000g durante 10 min a 4° C para eliminar los restos celulares. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y posteriormente se determinó la concentración de proteínas con en Kit DCA (Bio-rad Laboratorios, CA, EEUU) (ver apartado 4.5.1.2). Finalmente, las muestras se almacenaron a -80° C para su posterior uso.



**Figura 4.4.** Imagen de la extracción manual de FOP mediante aspiración con pipeta automática.

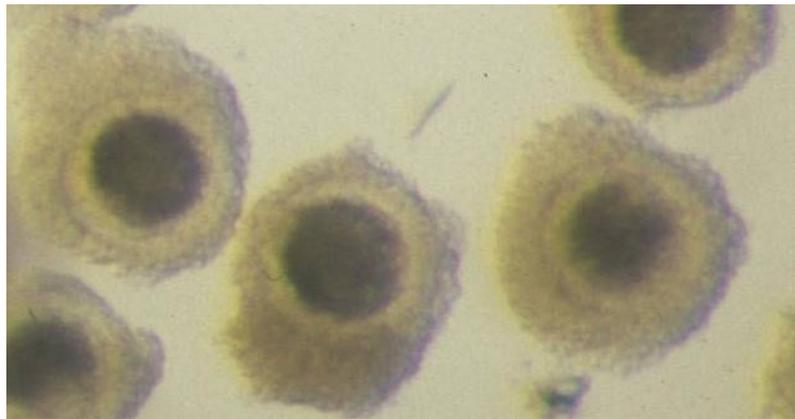
#### **4.2.3. Obtención de ovocitos**

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios procedentes de hembras prepúberes de entre 90-100 kg de peso, sacrificadas en el matadero “El Pozo”. El transporte hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isoterma con SS a 38° C en un plazo máximo de 1 h desde el sacrificio de los animales hasta la llegada de los mismos al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se retiraron los restos de oviducto y los ovarios se lavaron dos veces en solución cetab y dos veces con SS (apartado 4.1.2). Se seleccionaron los ovarios con buen desarrollo folicular y se desecharon aquellos que presentaban cuerpos lúteos, formaciones quísticas o alguna anomalía. Los ovarios seleccionados se mantuvieron inmersos en SS sobre una placa atemperada hasta su uso (máximo 2 h) (Matás et al., 1996).

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se obtuvieron de folículos no atrésicos y con un diámetro entre 2-5 mm, mediante aspiración con una aguja de 18G acoplada a una jeringuilla de 10 ml. El contenido folicular se recolectó en tubos estériles de 10 ml y se dejó sedimentar (sobre placa calefactada)

durante aproximadamente 10 min. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y el sedimento se depositó en placas de *petri* con medio PBS atemperado.

Bajo un estéreomicroscopio (*Nikon*® SMZ-10A) a 20X, se seleccionaron los COCs inmaduros con un citoplasma granuloso y homogéneo, rodeado de al menos 3-4 capas de células de *cumulus oophorus* para su posterior maduración (Figura 4.5).

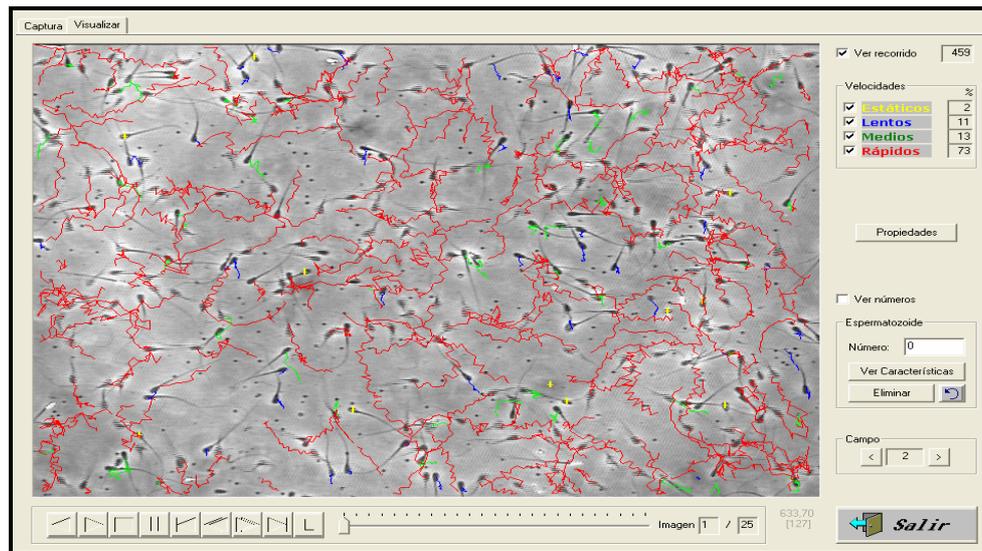


**Figura 4.5.** Imagen de complejos cúmulo-ovocito (COCs) inmaduros procedentes de ovarios de folículos no atrésicos de cerdas prepúberes.

### 4.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

#### 4.3.1. Evaluación de la motilidad espermática mediante el análisis computerizado de imágenes (CASA)

Para la valoración de los parámetros de motilidad se usó el programa de análisis de imagen *Sperm Class Analyzer* (SCA, Microptic, Barcelona) (Figura 4.6). Los parámetros estudiados fueron: motilidad progresiva (Mot Prog %), motilidad (Mot%), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud máxima de desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF). Las unidades de medición y la descripción de los parámetros se detallan en la Tabla 4.9.



**Figura 4.6.** Imagen del software empleado para la valoración de la motilidad de los espermatozoides mediante el análisis de imagen (SCA).

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

**Tabla 4.9.** Descripción de los parámetros de motilidad evaluados mediante el análisis de imagen (SCA).

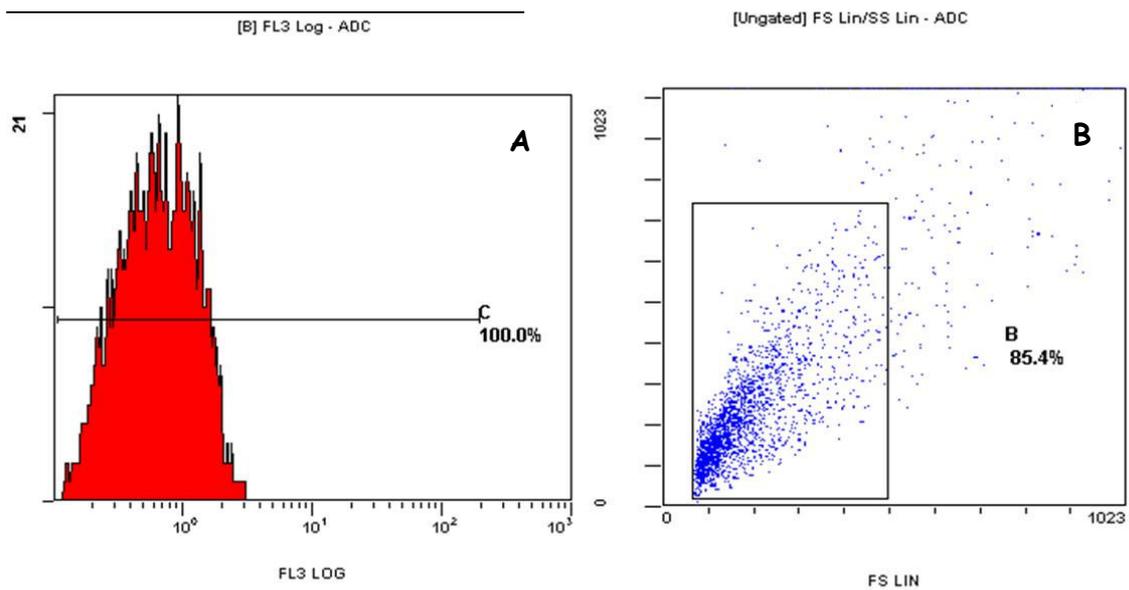
Para el análisis se dispusieron 7  $\mu\text{l}$  de la muestra en un portaobjetos (Superfrost Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) previamente atemperado sobre una placa térmica a 37° C, y finalmente se depositó un cubreobjetos (24x24 mm) encima de la muestra. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de contraste de fases (Leica® DMR, EE.UU.) con el objetivo de 20X.

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

#### **4.3.2 Análisis de la descondensación de la cromatina**

El grado de descondensación de la cromatina espermática se midió mediante la tinción del ADN con Ioduro de Propidio (IP) (Gadea et al., 2005). En primer lugar las muestras procesadas se centrifugaron a 1200g durante 3 min (previamente se ajustó a una concentración de  $1-5 \times 10^6$  spz/ml), el pellet se resuspendió en una solución de etanol en SS fisiológica 70/30 (v/v) durante 30 min a 4° C para la permeabilización de las membranas. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 1500g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 1 ml de BTS.

Finalmente, se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de una solución stock de IP (500  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron durante 1 h en oscuridad para su lectura en el citómetro de flujo *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, EE.UU.). La fluorescencia roja de IP fue recogida con el sensor de FL3 usando un filtro de banda de 650 nm (Figura 4.7). Las medidas fueron expresadas como la media de la intensidad en unidades de fluorescencia roja (media del canal FL3) lo que nos indica el estado de descondensación de la cromatina, directamente relacionado con la capacidad del ADN de adquirir IP.

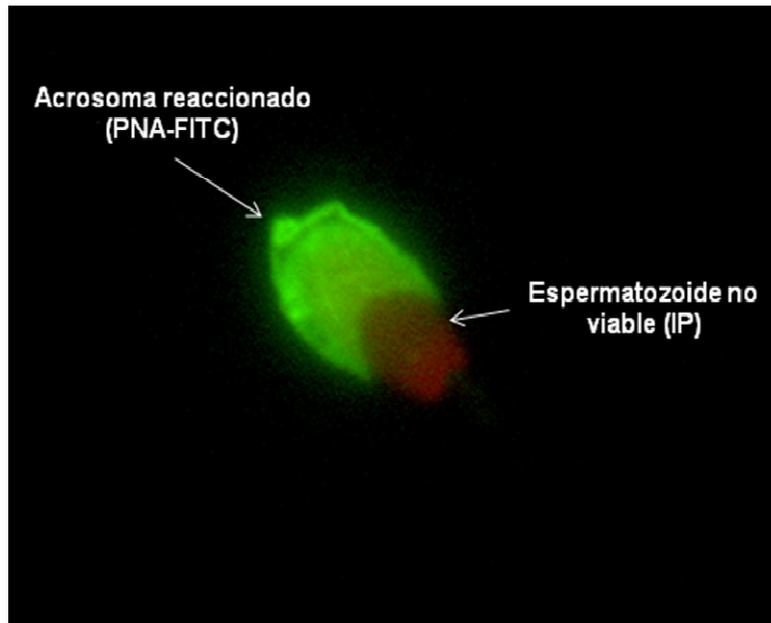


**Figura 4.7.** Imágenes tomadas del citómetro de flujo durante el análisis de la descondensación de la cromatina. A) Fluorescencia de IP colectada con el sensor FL3 a 650 nm de una de las muestras experimentales, B) Porcentaje de población de espermatozoides analizada.

#### 4.3.3 Evaluación de la reacción acrosómica

La reacción acrosómica se analizó mediante la tinción con la lectina *Arachis hypogaea agglutinin* conjugada a FITC (PNA-FITC). La lectina PNA se une selectivamente al contenido acrosomal valorando la reacción acrosómica emitiendo fluorescencia verde (ya que se encuentra conjugada a FITC). Además se utilizó IP que nos indica la viabilidad espermática (fluorescencia roja) (Figura 4.8.).

Las muestras espermáticas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  spz/ml, y se incubaron con una solución stock de 10  $\mu$ l de PNA-FITC (100 mg/ml) y 20  $\mu$ l de IP (500mg/ml) durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se evaluaron bajo un microscopio de fluorescencia (Leica® DMR, EE.UU.) con un filtro de excitación a 580 nm utilizando el objetivo 100X de aceite de inmersión.



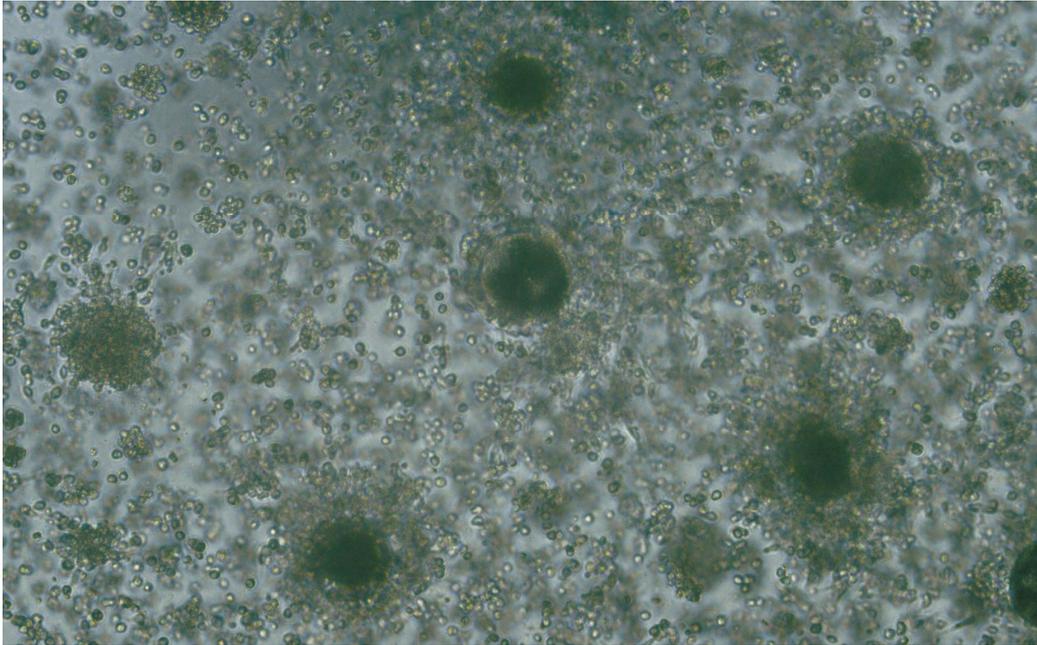
**Figura 4.8.** Imagen de espermatozoide teñido con PNA-FITC e IP evaluado mediante microscopio de fluorescencia.

#### **4.4. ANÁLISIS DE LA UNIÓN A LA ZONA PELÚCIDA (ZP) Y FECUNDACIÓN *IN VITRO* (ICSI)**

##### **4.4.1. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)**

Los ovocitos seleccionados para la MIV se lavaron una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37, equilibrado previamente (durante aproximadamente 2h antes de su uso) a 38.5° C en incubador (Heraeus Intruments, Alemania) con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad.

Se cultivaron grupos de 50 COCs en 500 µl de medio de maduración NCSU-37 suplementado (Tabla 4.7 y 4.8), durante un período de 20-22 h en un incubador a 38.5° C en atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el período de cultivo, los COC's se transfirieron a NCSU-37 libre de PMSG, hCG y dbAMPc donde previamente se lavaron dos veces y se cultivaron nuevamente durante 20-22 h (Funahashi y Day, 1993), para la obtención finalmente de ovocitos maduros (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Imagen de complejos ovocitos-cumulus oophurus (COCs) madurados *in vitro*.

#### **4.4.2 Unión espermatozoide-zona pelúcida**

Los ovocitos madurados *in vitro* se desnudaron mecánicamente mediante sucesivos pases a través de una pipeta automática y se lavaron 3 veces en medio NCSU-37 previamente atemperado y equilibrado. Se dividieron en grupos de 30-35 ovocitos siendo depositados en placas Nunc® de 4 pocillos con 250 µl de medio TALP suplementado. Se añadieron 250 µl de las suspensiones espermáticas correspondientes las cuales se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  spz/ml mediante espectofotometría (SpermaCue, Minitüb®, Tiefenbach, Alemania). Los espermatozoides y ovocitos se co-cultivaron durante 30 min en el incubador.

##### **4.4.2.1 Valoración microscópica de la unión espermatozoide-zona pelúcida**

Transcurridos los 30 min de co-cultivo, los ovocitos se lavaron 2 veces con una pipeta automática en PBS a 37° C. Para el primer lavado se hicieron 10 repeticiones y para el segundo 5, de esta manera se elimina de forma

mecánica el exceso de espermatozoides adheridos. Después de los lavados, los ovocitos se fijaron en glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 30 min. Transcurrido este tiempo los ovocitos se lavaron en PBS y posteriormente se tiñeron en oscuridad con una solución de Hoechst (33342) al 1%. Para el montaje de los ovocitos se adicionaron 20  $\mu$ l de una solución de montaje compuesta de Hoechst (1mg/ml), PBS (6.25 ml) y glicerol (6.25 ml). Finalmente, los ovocitos se transfirieron a un portaobjetos y sobre ellos se depositó un cubre objetos para su posterior evaluación.

Los ovocitos se evaluaron en un microscopio de fluorescencia (Leica® DMR, EE.UU.) y filtro UV de 495 nm de longitud de onda, con los objetivos de 20X, 40X y de 63.2X.

#### **4.4.3. Fecundación *in vitro*: Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)**

Tras la maduración de los ovocitos se procedió a la eliminación de las células del *cumulus* mediante sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática. A continuación, los ovocitos desnudos se lavaron 3 veces en una solución de PBS suplementado con suero fetal bovino (10%), y finalmente se colocaron en las placas de microinyección (Falcon® petri dish 50x9 mm).

Sobre las placas donde se realizó la microinyección se dispusieron varias gotas centrales de 4  $\mu$ l de la solución de PBS suplementado con 1  $\mu$ l de semen, rodeadas por un número variable de gotas del medio con los ovocitos. Cada gota de 4  $\mu$ l contenía un ovocito. Las microgotas se recubrieron con aceite mineral (testado para cultivo celular) distribuido por toda la placa de microinyección.

La ICSI se realizó con un microscopio invertido Nikon® Diaphot 300 con los correspondientes micromanipuladores TransferMan® NK (Eppendorf®) y microinyectores CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf®) (Figura 4.10-A y B).

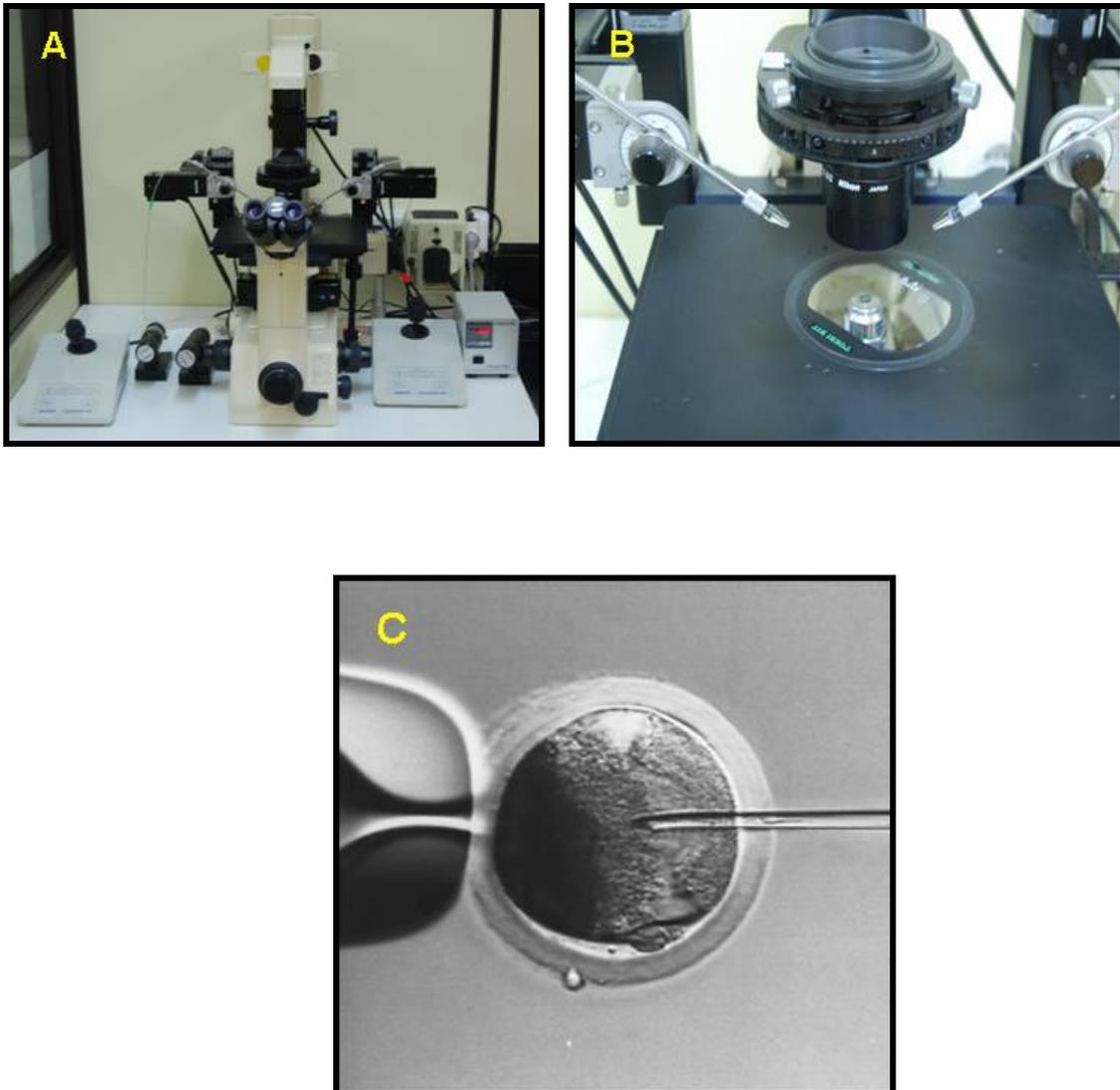
Una vez preparada la placa se procedió a la microinyección, mediante una pipeta Eppendorf® Custom Tip sterile (diámetro interno 8  $\mu\text{m}$ ) se aspiró un pequeño volumen del medio libre de espermatozoides, y a continuación se dispuso en una gota que contenía espermatozoides dónde se seleccionó e inmovilizó al espermatozoide que se microinyectó, aspirando desde la cola de forma que la cabeza espermática quedaba más cerca de la entrada de la pipeta. Una vez capturado el espermatozoide se procedió a la fijación del ovocito mediante la pipeta de sujeción (Eppendorf® Sterile VacuTips), colocando el ovocito previamente madurado y desnudo con el corpúsculo polar en posición 6 ó 12 horarias (Figura 4.10-C).

A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática. Se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que se había atravesado la membrana plasmática del ovocito, y el espermatozoide se inyectó en el interior del citoplasma (Figura 4.10-C).

Por último, se retiró la pipeta de microinyección y se liberó al ovocito. Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en el medio TALP y se dispusieron en el incubador en unas condiciones de 38.5° C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad durante 4 h. Tras lo cual se fijaron para su evaluación.

#### **4.4.3.1. Valoración microscópica de los ovocitos fecundados por ICSI**

Los ovocitos se prepararon tal como se describe en el apartado 4.4.2.1., y se evaluaron en un microscopio de fluorescencia (Leica® DMR, EE.UU.), y filtro UV de 495 nm de longitud de onda con los objetivos de 20X, 40X y 63.2X.



**Figura 4.10.** A) Microscopio invertido Nikon® Diaphot 300 con micromanipuladores TransferMan® NK (Eppendorf®), B) Microinyectores CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf®), C) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide con pipeta de sujeción y pipeta de inyección, ovocito con corpúsculo polar visible a las 6 horarias.

---

---

## 4.5. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA

La fosforilación de la tirosina se estudió mediante Western blot, e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

### 4.5.1. Análisis mediante Western blot

#### 4.5.1.1. Extracción de membranas celulares mediante sonicación

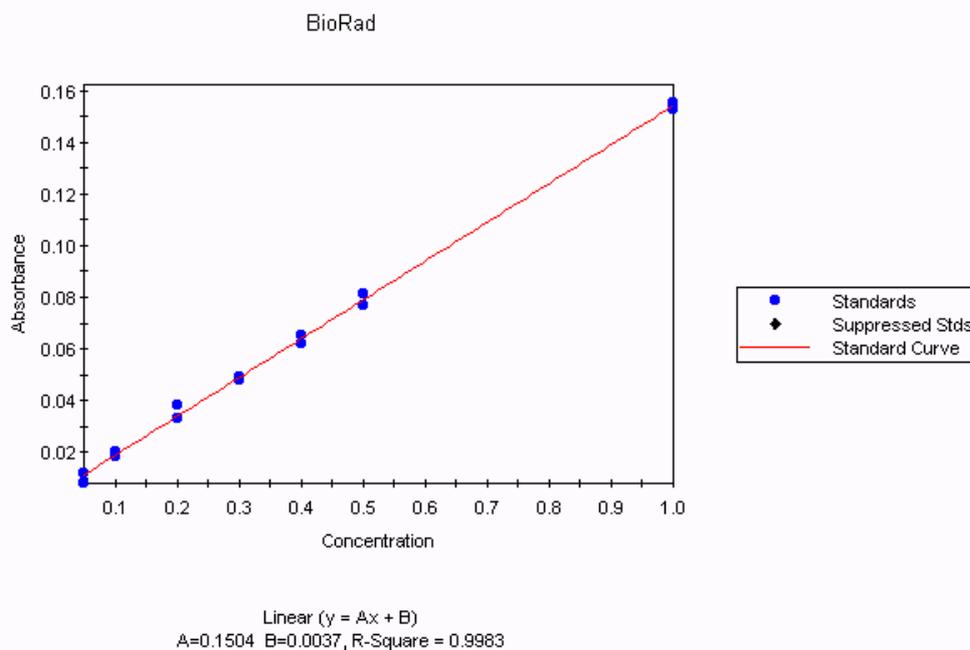
Para la extracción de membranas espermáticas se siguió el protocolo previamente descrito por Tapia et al., (2006). A partir de una concentración de  $250 \times 10^6$  spz/ml se realizaron 2 lavados con PBS a 7200g durante 15 seg a 4° C, resuspendiendo el pellet en 1 ml de PBS libre de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (apartado 4.1.1) Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en 300  $\mu$ l de buffer de lisis (Tabla 4.4).

Para la obtención de las membranas espermáticas la muestra se procesó mediante un sonicador digital (Branson Ultrasonics, Danbury, EE.UU.) a una amplitud de 20% durante 20 seg con la inclusión de la muestra en hielo durante este proceso para evitar el calentamiento de la misma. Tras la sonicación, las muestras se dejaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 10000g durante 15 min a 4° C y el sobrenadante de la muestra se almacenó a -20° C hasta su utilización.

#### 4.5.1.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas totales de las muestras de membranas plasmáticas y de fluido oviductal, se utilizó el ensayo de proteínas Kit II DCA de Bio-Rad (CA, EE.UU.). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Biotek Power Wave XS Instruments, Inc., EE.UU.) a una longitud de onda de 750 nm. Para la lectura se utilizaron micro-placas de ELISA con capacidad de almacenamiento de 200  $\mu$ l.

Previamente a la determinación de la concentración de proteínas, se realizó una curva estándar de albúmina con una concentración inicial de 1.44 mg/ml, obteniendo soluciones estándar con un rango de concentración de entre 0.05 a 1 mg/ml. Se consideraron valores fiables cuando se obtuvo un valor de  $r^2 \geq 0.998$  (Figura 4.11). Para la medición de la concentración de membranas plasmáticas, se utilizó como blanco buffer de lisis. En el caso de la medición de la concentración de proteínas totales del FOP, se trabajó con una dilución inicial de 1:200 y sobre esta dilución se calculó la concentración de proteínas, a diferencia del caso anterior se utilizó como blanco medio TALP. Para ambos casos la absorbancia del buffer de lisis o del medio TALP se restó al valor de la absorbancia de las muestras problema.



**Figura 4.11.** Recta patrón para la medición de proteínas totales de la muestra.

En los pocillos de la placa de ELISA se colocaron 5  $\mu$ l de cada una de las muestras para su medición. Seguidamente se agregaron 25  $\mu$ l de Reactivo A' (20  $\mu$ l Reactivo S + 1 ml Reactivo A) y por último 200  $\mu$ l Reactivo B según las indicaciones del fabricante. La placa se mantuvo en agitación durante 15 min a temperatura ambiente y se realizó la medición en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Para la medición del FOP únicamente se realizó la medición con el reactivo A y el reactivo B tal como se indica en las

especificaciones del kit ya que la muestra no contiene ningún tipo de detergente.

#### 4.5.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En primer lugar las muestras (10 µg de proteína total) se diluyeron hasta un volumen final de 30 µl en tampón de carga (Laemmli, 1970), (Tabla 4.10) para la separación de las proteínas por medio de electroforesis.

Componentes	Concentración
Tris HCl (pH 6.8)	0.2 M
Glicerol (v/v)	10.0 %
SDS (dodecilsulfato de sodio)	4.0 %
Azul de bromofenol	0.01 %
2β-Mercaptoetanol	5.0 %
DTT (ditiotreitól)	0.2 M

**Tabla 4.10.** Composición del tampón desnaturizante Laemmli (Laemmli, 1970).

Las muestras se calentaron a 95° C en un termobloque (Biosan CH-100, Biogen, Letonia) durante 5 min para desnaturizar las proteínas. Posteriormente, las proteínas se separaron en geles discontinuos de poliacrilamida siendo la primera parte de gel concentrador al 4% (Tabla 4.11) y la segunda parte el gel separador al 12% (Tabla 4.12).

La electroforesis se realizó a 4° C entre 45 y 60 min en tampón de recorrido para electroforesis compuesto por Tris-Base (0.025 M), Glicina (0.192 M) y SDS (0,1%) p/v en agua y sometidos a un campo eléctrico con un voltaje constante de 90 mV para el gel concentrador, y 150 mV para el gel separador. Al menos en una de las calles se cargó un estándar de proteínas con peso molecular conocido (Precision Plus Protein Standards Dual Color de Bio-Rad CA, EE.UU.) con un rango entre 10 y 250 kDa.

Componentes	Concentración
Agua Destilada	3.05 ml
Tris HCl 1.5 M (pH 6.5)	1.25 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
Acrilamida-Poliacrilamida al 30%	0.65 ml
Persulfato Amónico 10%	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

**Tabla 4.11.** Composición del gel concentrador acrilamida-bis acrilamida al 4%.

Componentes	Concentración
Agua Destilada	3.3 ml
Tris HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
Acrilamida-Poliacrilamida al 30%	4.0 ml
Persulfato Amónico 10%	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

**Tabla 4.12.** Composición del gel separador acrilamida bis-acrilamida al 12%.

#### 4.5.1.4. Western blot

El gel obtenido tras la electroforesis en el apartado 4.5.1.3, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa PVDF (polivinilideno-difluoruro) (Millipore corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m. Previamente dicha membrana se activó en metanol puro durante 15 seg, seguida de un lavado en agua destilada y por último equilibrada durante 5 min en buffer de transferencia que contenía 2.5 mM de Tris/HCl (pH 8.3), 19.2 mM de glicina y 20% de metanol. Las proteínas se transfirieron en una cámara húmeda (Bio-Rad CA, EE.UU.) sumergidas en buffer de transferencia durante 1 h a 380 mA, en agitación constante y a 4° C.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF se realizó un lavado en tampón TBS-T que contenía: 0.5 M de Tris/HCl (pH 7.4), 1.5 M de NaCl y 1% de Tween 20®. Para bloquear las uniones inespecíficas de la membrana, se realizó un bloqueo con TBST- BSA al 5% toda la noche a 4° C. Tras el bloqueo se realizó un lavado de la membrana con TBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo (Ac) primario (Anti-fosfotirosina 4G10-UBI; Millipore, Temecula, CA, EE.UU.) diluído 1:20000 en TBS-T-BSA 1% (p/v) durante 60 min. Transcurrida la incubación con el Ac primario, la membrana se lavó dos veces durante un período de 4 min con TBS-T a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente, se incubó la membrana con el Ac secundario [anti-ratón producido en cabra (Bio-Rad, CA, EE.UU.)] conjugado con peroxidasa (*HRP*) diluído 1:20000 en TBS-T durante 45 min en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 4 min cada uno con TBST a temperatura ambiente y con agitación fuerte.

Para la visualización de las bandas inmunorreactivas a fosfotirosina, la membrana se incubó con la solución de revelado kit ECL+Plus (GE Healthcare, Amersham, Biosciences, Alemania) durante 5 min a temperatura ambiente, para posteriormente, proceder al escaneado de la misma mediante el Typhon 9410 (Amersham, Biosciences, Alemania) a una longitud de onda de 457 nm.

Los geles se escanearon y analizaron mediante el programa Gel-Pro® analyzer v.3, obteniendo el valor en kDa de cada banda visible con respecto del marcador de peso molecular.

#### **4.5.2. Inmunocitoquímica: Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Las muestras espermáticas una vez procesadas se centrifugaron a 270g durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de una solución de formaldehído al 2% (v/v) diluído en agua Milli-Q durante 1 h. Transcurrido este tiempo se centrifugaron nuevamente y el pellet resultante se resuspendió en una solución de BSA-H<sub>2</sub>O al 5% (p/v) durante toda la noche a 4° C. Posterior a esto, la muestra se centrifugó nuevamente y se resuspendió

en 500  $\mu$ l de PBS. A partir de ésta solución se realizaron extensiones sobre portaobjetos y se secaron al aire.

Seguidamente, se incubó con el Ac primario [anti fosfotirosina (4G10) de Millipore, Temecula, CA, EEUU], durante 1 h a una dilución 1:200. Tras esto se realizaron dos lavados con PBS libre de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Tabla 4.2), y a continuación se incubaron con el Ac secundario anti-ratón producido en cabra conjugado con fluoresceína (FITC) (Upstate Millipore, Temecula, CA, EEUU) a una dilución de 1:400 durante 1 h a temperatura ambiente. Se colocó una gota de medio de montaje fluorescente (Dako®, CA, EEUU), para su posterior análisis bajo el microscopio de fluorescencia.

Para cada una de las muestras se realizó un control negativo incubando únicamente con el Ac secundario. Las muestras se evaluaron bajo un microscopio de contraste de fases (Leica® DMR, EE.UU.) con el objetivo de inmersión (100X) y bajo la luz de fluorescencia (filtro I3 excitación azul BP 450-490; emisión LP 515).

## **4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

---

---

## 4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio se diseñó para analizar la capacitación en espermatozoides de porcino **epididimarios (EP)** vs. **eyaculados (EY)** bajo diferentes condiciones. Para ello, los espermatozoides se clasificaron en 6 grupos experimentales dependiendo del origen espermático y del tratamiento al que fueron sometidos (Figura 4.12):

### 1) Espermatozoides **control (C)**:

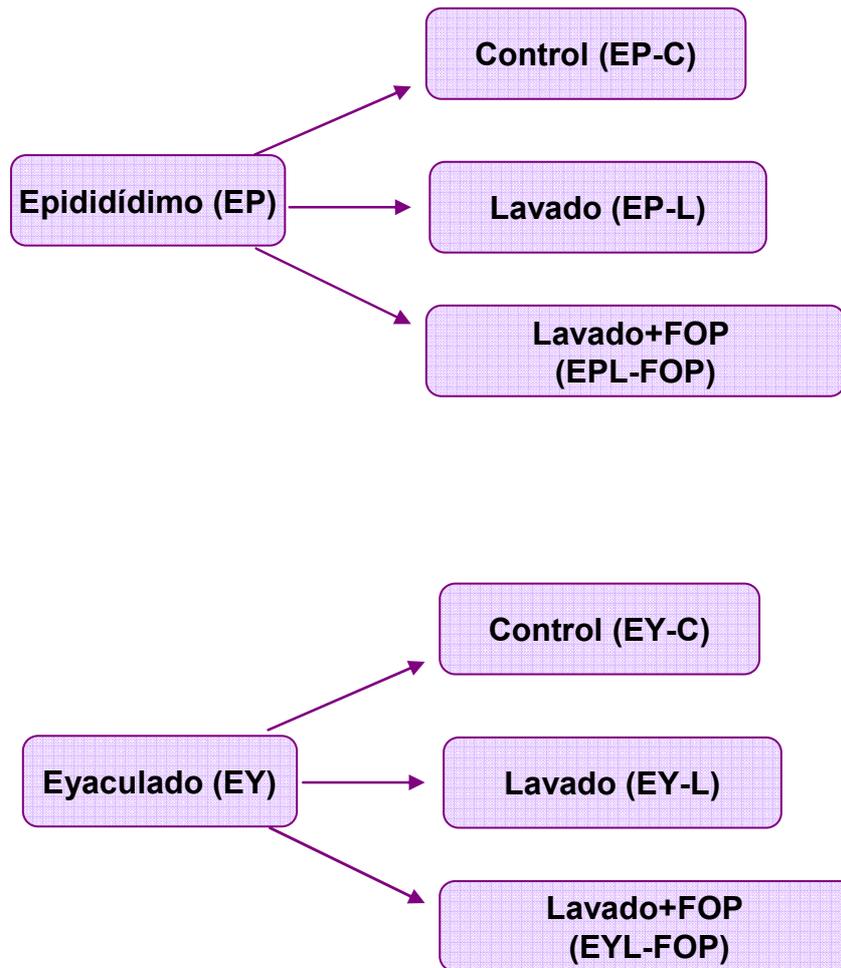
- EP-C: espermatozoides de epidídimo que no se sometieron a ningún tratamiento
- EY-C: espermatozoides de eyaculado que no se sometieron a ningún tratamiento.

### 2) Espermatozoides **lavados con Percoll® (L)**:

- EP-L: espermatozoides de epidídimo lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio de capacitación TALP.
- EY-L: espermatozoides eyaculados lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio de capacitación TALP.

### 3) Espermatozoides **lavados con Percoll® e incubados en FOP (L-FOP)**:

- EP-L-FOP: espermatozoides de epidídimo lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio de capacitación TALP suplementado con fluido oviductal obtenido en fase folicular temprana.
- EY-L-FOP: espermatozoides de eyaculado lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio de capacitación TALP suplementado con fluido oviductal obtenido en fase folicular temprana.



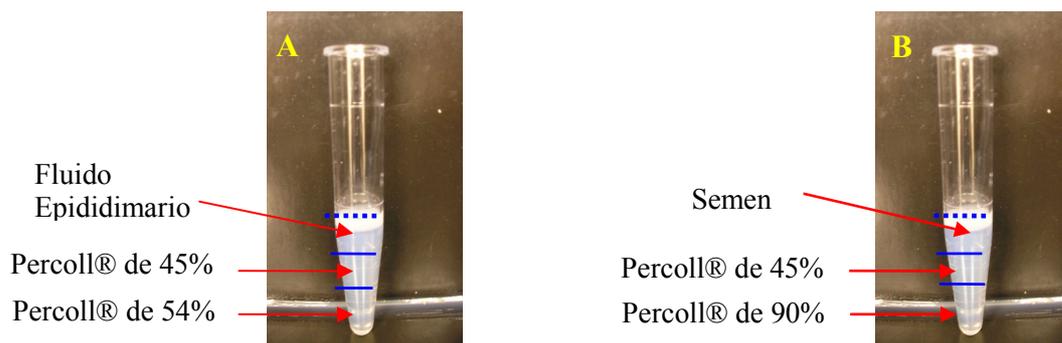
**Figura 4.12.** Esquema de los diferentes grupos experimentales.

El procesado de las muestras espermáticas según el tratamiento al que fueron sometidos se detalla a continuación:

■ **Espermatozoides Control (C):** para todas las experiencias, el grupo control no recibió ningún tipo de tratamiento, únicamente se ajustó la concentración a  $250 \times 10^6$  y/o  $1 \times 10^5$  spz/ml con BTS, PBS o TALP según la experiencia.

■ **Espermatozoides lavados a través de un gradiente de Percoll® (L):** para la preparación de los espermatozoides epididimarios se depositaron 500  $\mu$ l de fluido epididimario sobre una columna de 2 ml de Percoll® 45%, que fue depositado a su vez sobre 2 ml de la solución de Percoll® 54%. En el caso de los espermatozoides eyaculados se depositaron 0.5 ml de la muestra sobre una

columna de Percoll® de doble banda, constituida por 2 ml de la solución osmótica de Percoll® 45%, que a su vez se depositó sobre 2 ml de la solución de Percoll® 90%, (Figura 4.13 A y B). Seguidamente, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 714 g durante 30 min. El precipitado resultante se resuspendió en medio TALP previamente equilibrado y se centrifugó de nuevo a 714 g durante 10 min. La concentración se ajustó de acuerdo al experimento a desarrollar.



**Figura 4.13.** Imagen de los gradientes de Percoll® para el procesamiento de espermatozoides: epididimarios (A) y eyaculados (B).

#### █ Espermatozoides incubados en Fluido Oviductal Porcino (L-FOP):

Tras el lavado en Percoll®, tal como se ha mencionado en el apartado anterior, los espermatozoides de epidídimo y eyaculado se incubaron en medio TALP suplementado con 50 µg/ml de proteína de FOP. La incubación se realizó durante 30 min y/o 3 y 4 h (según la experiencia). Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 714 g durante 10 min para eliminar el medio TALP.

Todas las incubaciones se realizaron en un incubador a 38.5° C, 5% de CO<sub>2</sub> y con una atmósfera saturada de humedad.

## **Experiencia 1. Análisis espermático**

### **Experimento 1-1. Evaluación de la motilidad espermática (CASA)**

Este experimento se diseñó con el objetivo de evaluar las diferencias en los parámetros de motilidad entre espermatozoides epididimarios y eyaculados sometidos a diferentes condiciones de capacitación. Para evaluar los parámetros de motilidad espermática en los diferentes grupos experimentales (Figura 4.12) se utilizó el sistema de análisis computerizado (CASA) (ver apartado 4.3) Se evaluaron de 3 a 6 campos por muestra contando como mínimo 200 espermatozoides por campo para cada uno de los grupos experimentales. Se realizaron un total de 8 replicados.

### **Experimento 1-2. Evaluación de la descondensación de cromatina mediante citometría de flujo**

Este experimento se diseñó para evaluar cómo afecta el origen y las diferentes condiciones de capacitación espermática sobre el grado de descondensación de la cromatina en espermatozoides. Los espermatozoides en los diferentes grupos experimentales (Figura 4.12) se fijaron en metanol y se tiñeron con IP siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3.2. Para su evaluación se utilizó el citómetro de flujo *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, EE.UU.). Se realizaron 4 mediciones contabilizando el valor medio de fluorescencia de 10000 células por muestra en un total de 6 replicados. Las mediciones se realizaron a una longitud de 650nm recogiendo la fluorescencia roja con el sensor FL3. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia arbitrarias. Un índice elevado de fluorescencia indica un mayor grado de descondensación de la cromatina.

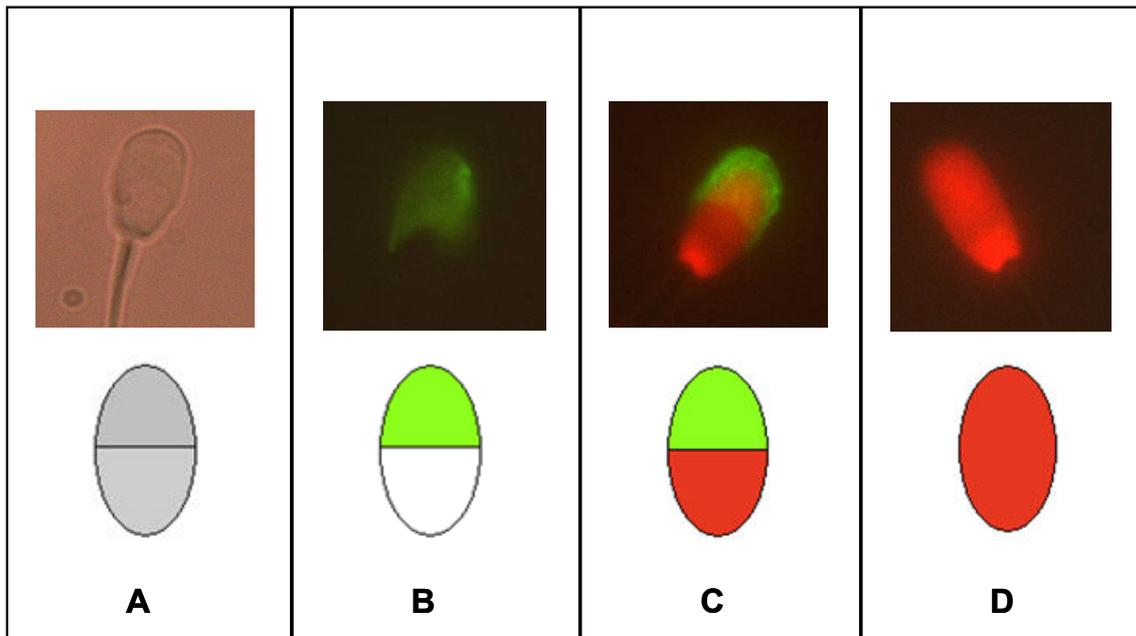
### **Experimento 1-3. Evaluación de la reacción acrosómica**

La reacción acrosómica se evaluó tanto en espermatozoides de EP como de EY, en los diferentes grupos experimentales que se describen a continuación:

- a) Control (C): espermatozoides no sometidos a ningún tratamiento.
- b) Lavados a través de un gradiente de Percoll® no incubados en medio TALP (L-0h).
- c) Lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio TALP durante 3 y/o 4h (L-3h; L-4h).
- d) Lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio de capacitación TALP suplementado con fluido oviductal durante 3 y/o 4h (L-FOP-3h; L-FOP-4h) (Ver Figura 4.21)

Se hicieron 4 replicados donde se analizaron 800 espermatozoides por grupo. Estos espermatozoides fueron clasificados según el patrón de fluorescencia (Figura 4.14) en:

- Espermatozoides vivos no reaccionados (sin fluorescencia).
- Espermatozoides reaccionados (fluorescencia verde en el acrosoma).
- Espermatozoides no viables (con fluorescencia roja).



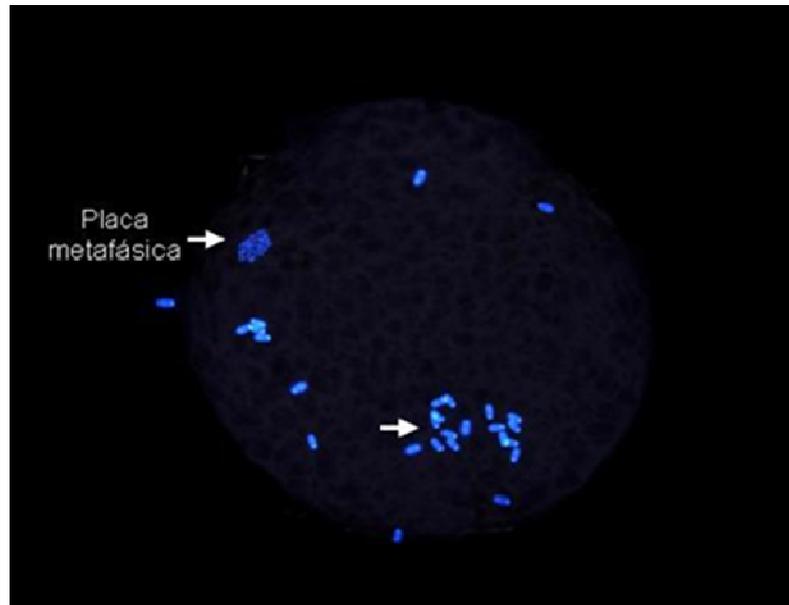
**Figura 4.14.** Imagen de las cuatro posibles combinaciones del status acrosomal (PNA-FITC) y viabilidad (IP) en espermatozoides de verraco. **A:** Espermatozoide intacto no teñido, **B:** Espermatozoide vivo reaccionado, **C:** Espermatozoide muerto reaccionado y **D:** Espermatozoide muerto sin reaccionar.

## ***Experiencia 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación***

### **Experimento 2-1. Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida**

Para evaluar el efecto del origen espermático y las diferentes condiciones de capacitación sobre la unión del espermatozoide a la ZP, se realizó el cocultivo en grupos de 35 ovocitos MIV con los espermatozoides ( $1 \times 10^5$  spz/ml) durante 30 min. Transcurrido este tiempo, los ovocitos fueron lavados 15 veces mecánicamente con una pipeta (ver apartado 4.4.2.1). Se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33342 al 1% para su posterior análisis bajo el microscopio de epifluorescencia. Se realizaron 8 replicados (donde se utilizaron un total de 1.135 ovocitos). Para su evaluación se contabilizó el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida por ovocito (Figura 4.15). Sólo se evaluaron los espermatozoides unidos a ovocitos maduros (metafase II), los

ovocitos inmaduros (vesícula germinal) y aquellos que no presentaban un citoplasma regular fueron excluidos del estudio.



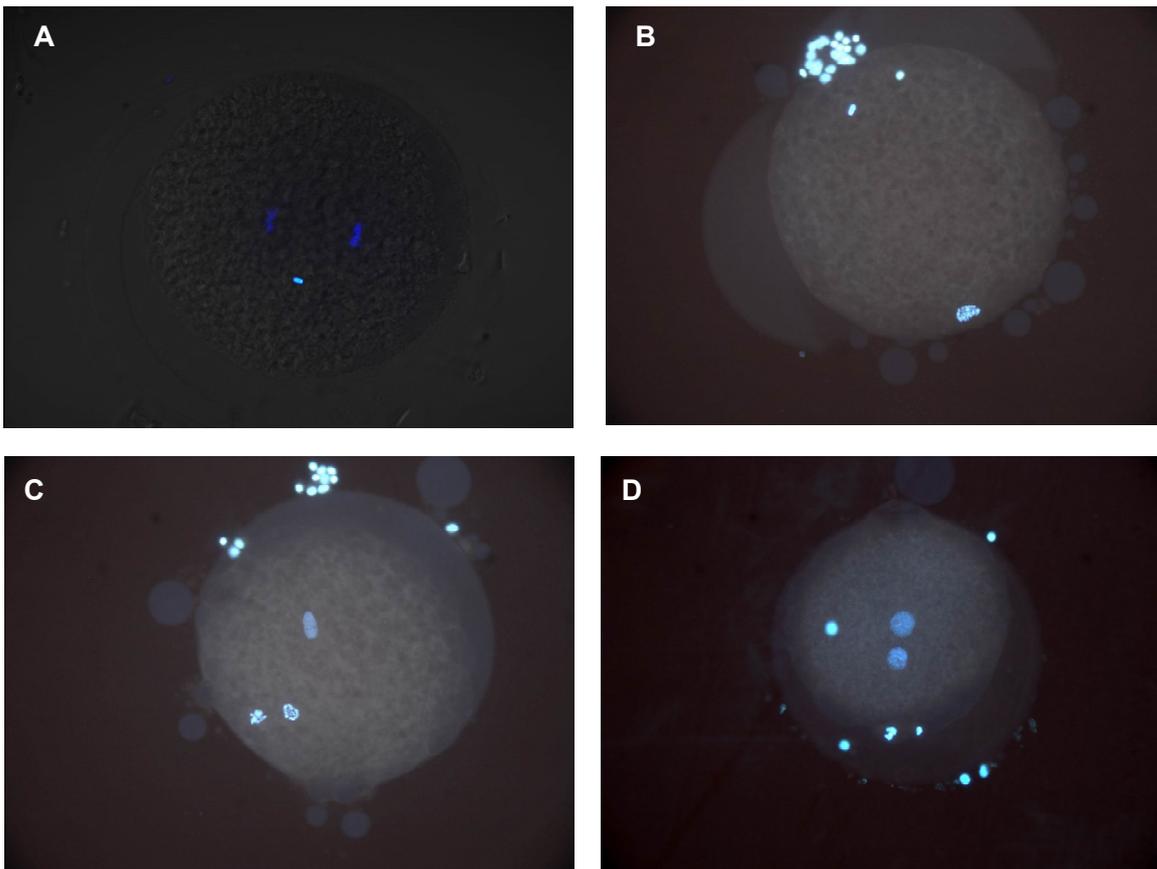
**Figura 4.15.** Imagen de espermatozoides unidos a la zona pelúcida de un ovocito. Muestra teñida con Hoechst (33342) analizada microscopio de fluorescencia a 400 aumentos.

### **Experimento 2-2. Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear.**

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento espermático sobre la activación y formación de pronúcleos, los ovocitos porcinos madurados *in vitro* fueron microinyectados (ICSI) con un espermatozoide procedente de cada grupo experimental. Una vez inyectados fueron cultivados en TALP durante 4 h en un incubador a 38°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad. Transcurrido ese tiempo los supuestos cigotos se tiñeron con Hoechst 33342 y se fijaron para su evaluación bajo un microscopio de epifluorescencia. Los parámetros evaluados en el núcleo femenino y masculino fueron:

- 1) **Núcleo femenino** se clasificó en: a) *Grupo activados*: los cuales se encuentran en anafase, telofase (Figura 4.16-A) o han dado lugar a la formación de pronúcleo; b) *Grupo no activados*: aquellos ovocitos que se encuentran en metafase II (Figura 4.16-B).

- 2) **Núcleo masculino** se clasificó en: **A) Grupo no descondensado:** espermatozoides sin descondensar que tienen la cabeza compacta (Figura 4.16-A); **B) Grupo descondensación baja-media:** espermatozoides cuyas cabezas se encontraban ligeramente descondensadas o descondensadas (Figura 4.16-B y C); **C) Grupo descondensación alta:** espermatozoides con las cabezas muy descondensadas o que habían formado pronúcleo (Figura 4.16-D).



**Figura 4.16.** Imágenes de ovocitos fecundados mediante ICSI con distinto grado de activación nuclear y descondensación de la cabeza espermática. Se considera que el núcleo femenino se ha activado en las imágenes, A (núcleo en estadio en anafase) y D (núcleo en estadio pronuclear). El núcleo masculino aparece compacto en la imagen A, ligeramente descondensado en la imagen B, descondensado en C y en estadio pronuclear en D. Muestra teñida con Hoechst (33342) analizada microscopio de fluorescencia a 200 aumentos.

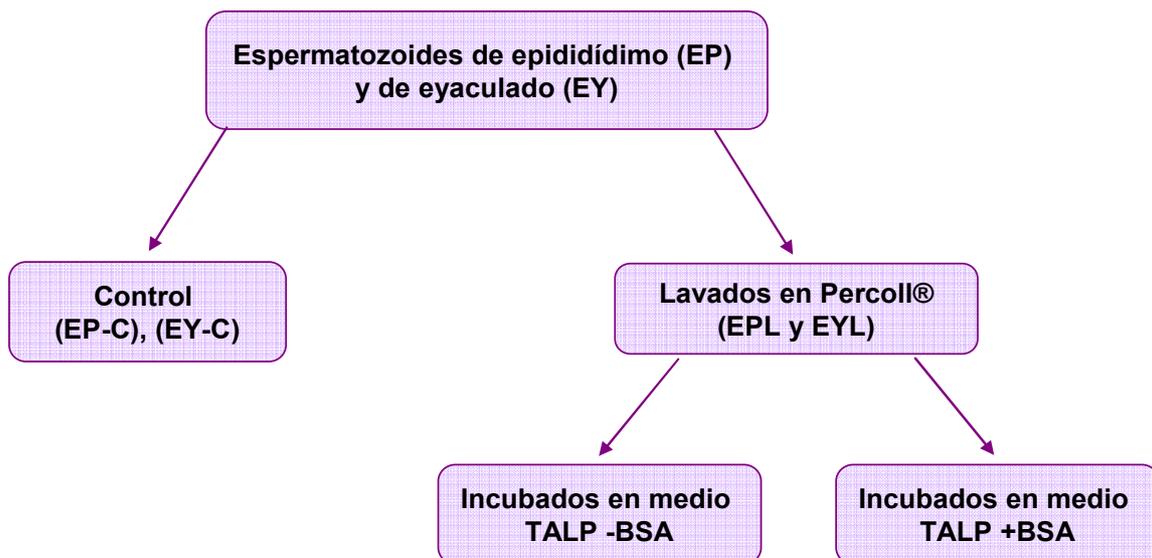
Los ovocitos degenerados o con citoplasma irregular y aquellos que se encontraban en estado de vesícula germinal se eliminaron del estudio. Para esta experiencia se realizaron 8 replicados con un total de 461 ovocitos inyectados.

### **Experiencia 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante Western blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

El diseño de esta experiencia se realizó con el propósito de determinar como el origen espermático y las diferentes condiciones de capacitación espermática afectan a los patrones de fosforilación de la tirosina y su localización.

#### **Experimento 3-1. Efecto de la incubación espermática con BSA sobre la fosforilación de la tirosina evaluados mediante WB**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la BSA sobre el patrón de fosforilación de la tirosina en espermatozoides. Para ello se utilizaron espermatozoides de EP y EY que a su vez se dividieron en: 1) grupo control (C); 2) grupo lavado (L): tras el lavado en Percoll®, los espermatozoides se incubaron en medio TALP suplementado o no con BSA durante 30 min (Figura 4.17). Los pasos siguientes se realizaron del mismo modo que en el experimento 3-2. Para esta experiencia se realizaron un total de 4 replicados.



**Figura 4.17.** Esquema del experimento 3-1.

### Experimento 3-2. Efecto de la incubación espermática con FOP sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la incubación de espermatozoides de EP y EY en un medio fisiológico como es el FOP sobre la fosforilación de la tirosina. Para ello los espermatozoides se dividieron en los 6 grupos experimentales descritos al inicio del diseño experimental (Figura 4.18). Para esta experiencia se realizaron 4 replicados.

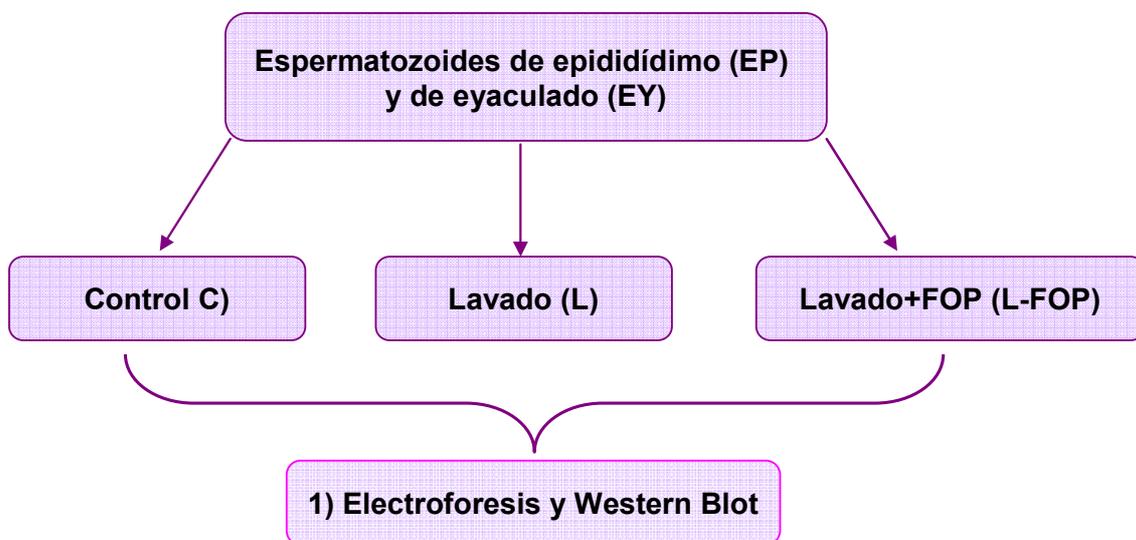


Figura 4.18 Esquema del experimento 3-2.

### Experimento 3-3. Efecto del tiempo de incubación espermática sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB

Para la evaluación del patrón de fosforilación de la tirosina en espermatozoides a lo largo del tiempo, tanto espermatozoides eyaculados como de epidídimo lavados y no lavados, fueron incubados hasta 3 horas en medio TALP.

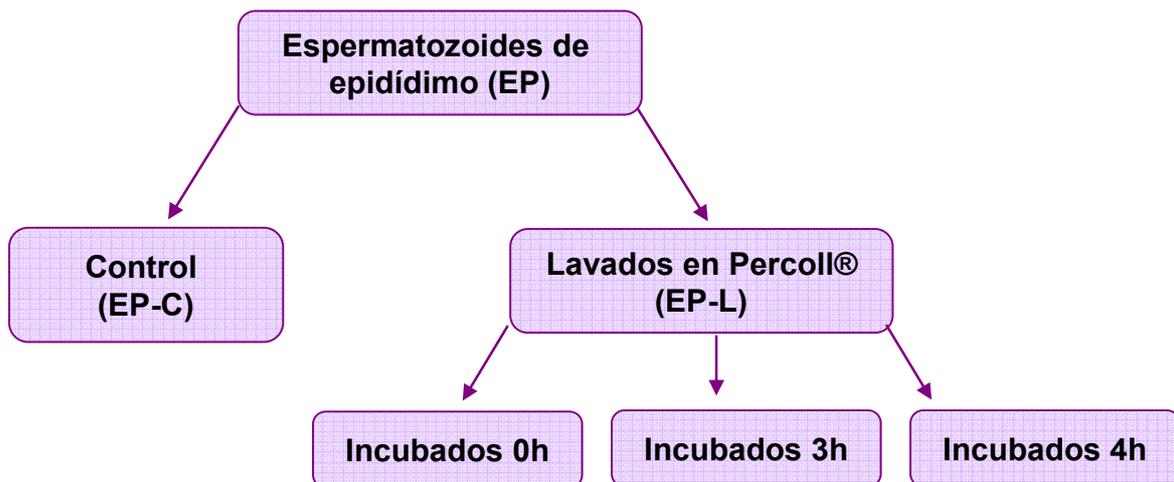
Los **espermatozoides** de **EP** se dividieron en 4 grupos experimentales (Figura 4.19):

- a) Control (EP-C): espermatozoides no sometidos a ningún tratamiento.

b) Lavados a través de un gradiente de Percoll® no incubados en medio TALP (EP-L-0h).

c) Lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio TALP durante 3 h (EP-L-3h).

d) Lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio TALP durante 4 h (EP-L-4h).



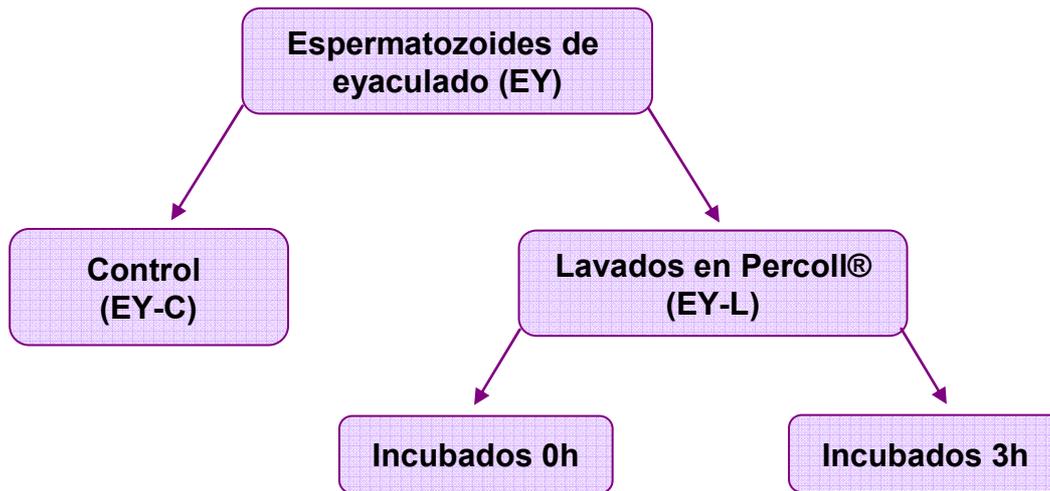
**Figura 4.19.** Esquema del experimento 3-3 para espermatozoides de epidídimo.

Los **espermatozoides** de **EY** se dividieron en 3 grupos experimentales (Figura 4.20):

a) Control (EY-C): espermatozoides no sometidos a ningún tratamiento.

b) Lavados a través de un gradiente de Percoll® no incubados en medio TALP (EY-L-0h).

c) Lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio TALP durante 3 h (EY-L-3h). El número de replicados fue de 6.

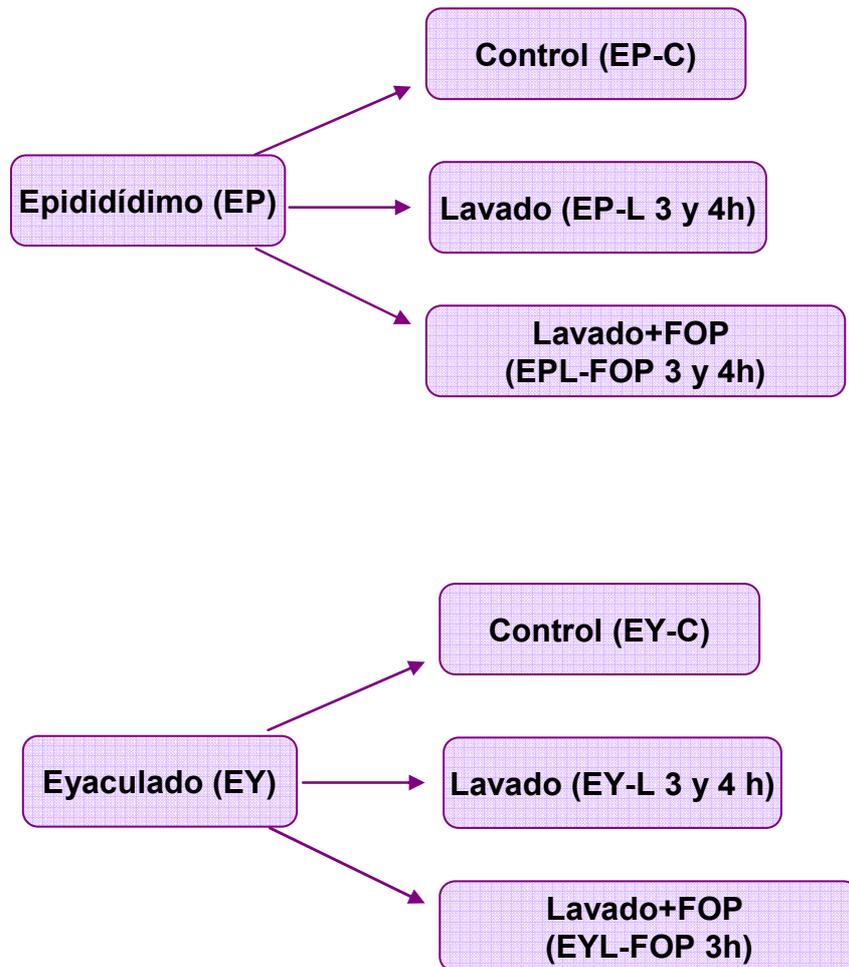


**Figura 4.20.** Esquema de los grupos experimentales analizados en los experimentos 3-3 para espermatozoides eyaculados.

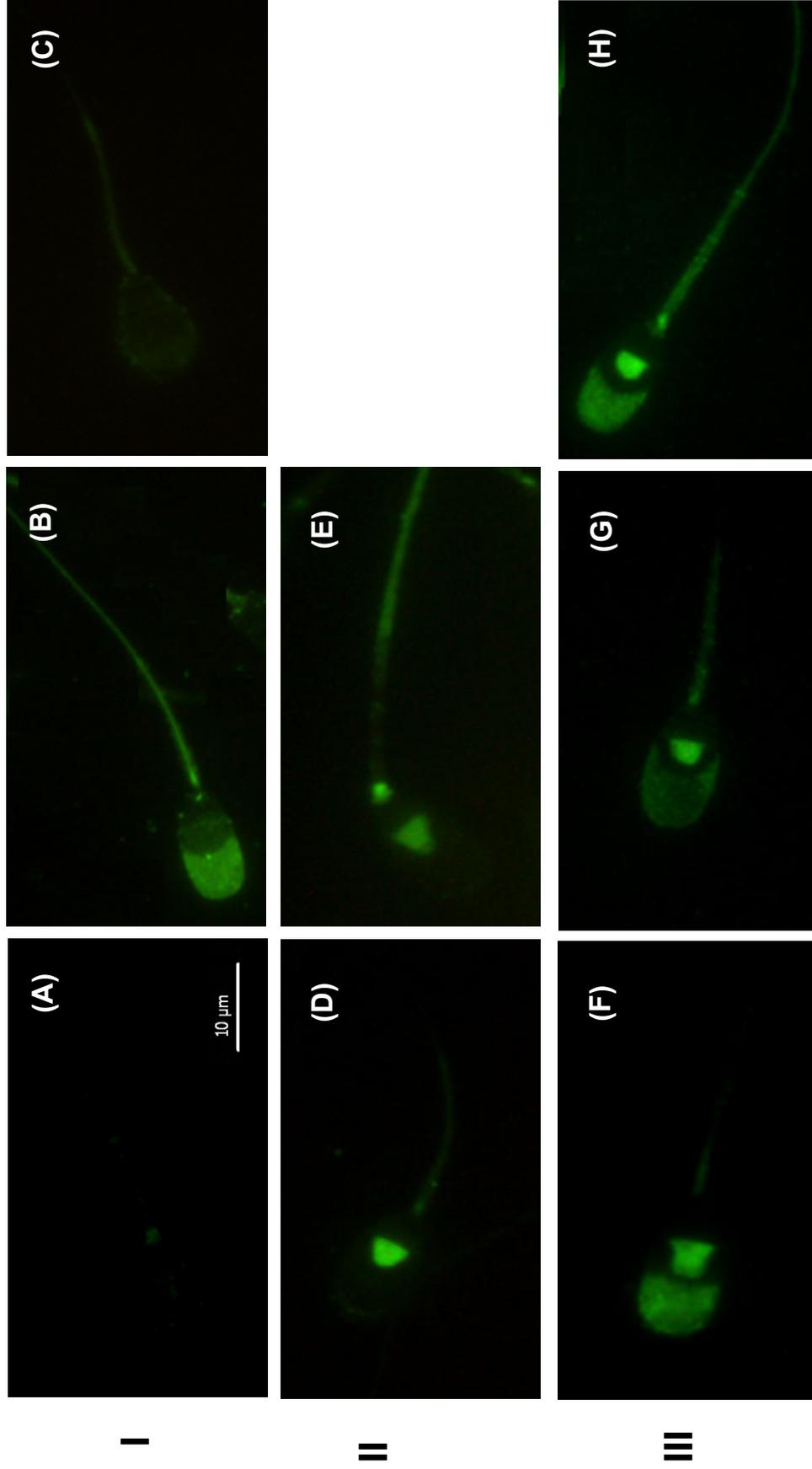
#### **Experimento 3-4. Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides mediante (IFI)**

Para el estudio de la localización de las proteínas de membrana fosforiladas en tirosina en los diferentes grupos experimentales, se realizó una inmunofluorescencia indirecta *in situ* de las muestras sin permeabilizar. Las muestras se analizaron bajo el microscopio de epifluorescencia a 1000 aumentos y se evaluaron 200 espermatozoides por muestra. Los grupos analizados se encuentran reflejados en la figura 4.21. Las incubaciones se realizaron tal como se indica en el apartado 4.6.

Se realizaron 5 replicados. Los patrones encontrados en este experimento se encuentran reflejados en la Figura 4.22. Para su análisis se distribuyeron en 3 grupos: I) Espermatozoides **no capacitados**: espermatozoides sin ninguna fluorescencia, fluorescencia baja o en región acrosomal y cola (suma de los grupos A, B y C); II) Espermatozoides **capitados fosforilados en región sub-ecuatorial y/o cola** (suma de los grupos D y E) y por último, III) Espermatozoides **capitados fosforilados en las regiones sub-ecuatorial, acrosoma y/o cola** (suma de los grupos F, G y H).



**Figura 4.21.** Esquema de los grupos experimentales analizados en los experimentos 1-3 y 3-4 para espermatozoides de epidídimo y eyaculados.



**Figura 4.22.** Imagen de fosforilación de espermatozoides porcinos de epidídimo y eyaculado no permeabilizados por medio de inmunofluorescencia indirecta (FI). **(I)** Espermatozoides no capacitados: espermatozoides sin ninguna fluorescencia, fluorescencia baja o en región acrosomal y cola (A, B, C), **(II)** Espermatozoides capacitados fosforilados en región sub-ecuatorial y cola (D y E), **(III)** Espermatozoides capacitados fosforilados en las regiones subecuatorial, acrosoma y/o cola (F, G y H).

#### **4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa estadístico SPSS v15.0.

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

En todos los análisis estadísticos se utilizó el modelo lineal general.

Todas las experiencias fueron analizadas por ANOVA de una vía, excepto en aquellas en donde se evaluaron dos factores (origen espermático y condiciones de capacitación), para lo cual se utilizó un ANOVA de dos vías. Cuando el ANOVA señaló efecto significativo, los valores fueron comparados por una prueba post hoc de 3 medias de Tukey.

## **5. RESULTADOS**

---

---

## Experiencia 1. Análisis espermático

### Experimento 1-1. Evaluación de la motilidad espermática (CASA)

Los resultados del análisis de los parámetros de motilidad de los espermatozoides de EP (Tabla 5.1) indicaron que tanto el % de motilidad y motilidad progresiva en el grupo C era significativamente menor que en los grupos experimentales L y L-FOP ( $p < 0.05$ ), y a su vez, estos eran estadísticamente iguales entre sí. Para las variables VSL, VAP, LIN, STR y WOB los valores más elevados correspondieron al grupo L, siendo estadísticamente similar al grupo FOP en el caso de VAP y LIN. En el caso de BCF el grupo C y FOP se diferenciaron estadísticamente, obteniendo en el grupo L valores similares a ambos grupos (C y FOP). Para las variables de VCL y ALH no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Los resultados obtenidos del análisis de los parámetros de la motilidad en los espermatozoides de EY quedan reflejados en la Tabla 5.1. En este análisis se observó que para el grupo C los valores de motilidad progresiva, VSL, VAP, LIN, WOB, BCF y WOB, eran estadísticamente mayores que en los grupos L y L-FOP ( $p < 0.05$ ), siendo estos dos últimos iguales entre sí. En el caso del % de motilidad, todos los grupos experimentales eran significativamente diferentes entre sí (C:  $80.12 \pm 2.04$ ; L:  $66.68 \pm 2.11$ ; L-FOP:  $58.93 \pm 2.39$ ,  $p < 0.05$ ). Al analizar ALH, los grupos C y FOP eran similares estadísticamente y diferentes respecto al grupo L. No se encontraron diferencias para los parámetros VCL y STR.

Cuando analizamos los parámetros de motilidad comparando todos los grupos experimentales (tanto de EP como de EY) observamos que:

- **Mot prog (%)**: todos los grupos eran similares excepto el EY-C, en el cual se obtuvo el valor más alto.

- 
- 
- **Motilidad (%)**: también en este parámetro el valor estadístico más alto correspondió al grupo EY-C, el resto de grupos eran similares entre sí, con excepción del EP-C que obtuvo el menor % de motilidad.
  
  - **VCL**: no hubo diferencias significativas.
  
  - **VSL**: sólo se observó diferencias en el grupo EYC, que presentó el valor más alto.
  
  - **VAP**: sólo se observó diferencias en el grupo EYC, que presentó el valor más alto.
  
  - **LIN y WOB**: las diferencias estadísticas entre grupos fueron similares en ambos parámetros. Del mismo modo, se obtuvo el mayor valor en el caso de EY-C. Los demás grupos eran similares entre si, a excepción del EP-C donde se obtuvo el % más bajo, a su vez este grupo era estadísticamente similar a los otros 2 grupos epididimarios.
  
  - **STR**: el valor más alto correspondió al grupo EY-C y EP-L, y el más bajo al EP-C. El resto de grupos eran estadísticamente similares a los grupos anteriormente citados.
  
  - **ALH**: los valores menores fueron para los grupos EY-C, EY-FOP y EP-L, siendo este ultimo igual estadísticamente al resto de grupos.
  
  - **BCF**: sólo se observaron diferencias en el grupo EYC, que presentó el valor más alto.

Tratamiento (# campos evaluados)		Mot Prog (%)	Motilidad (%)	VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VSL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
E P	C (42)	23.90 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup> x	52.50 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup> x	73.43 $\pm$ 1.30	19.45 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup> x	34.55 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup> x	26.43 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup> x	56.12 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup> x	46.81 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup> x	3.83 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup> x
	L (47)	30.68 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup> y	61.98 $\pm$ 2.44 <sup>b</sup> y	75.89 $\pm$ 1.87	23.91 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup> y	39.28 $\pm$ 1.50 <sup>a</sup> y	30.94 $\pm$ 1.04 <sup>ab</sup> y	59.89 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup> y	51.04 $\pm$ 0.86 <sup>ab</sup> y	3.62 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	4.66 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup> xy
	L-FOP (41)	29.17 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup> xy	63.56 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup> y	73.73 $\pm$ 1.63	20.44 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup> x	36.15 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup> xy	27.85 $\pm$ 0.99 <sup>ab</sup> xy	56.46 $\pm$ 1.06 <sup>ab</sup> x	48.29 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup> x	3.66 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	4.27 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> y
E Y	C (43)	43.21 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup> $\alpha$	80.12 $\pm$ 2.04 <sup>c</sup> $\alpha$	76.19 $\pm$ 2.32	29.98 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup> $\alpha$	46.63 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup> $\alpha$	38.86 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup> $\alpha$	62.35 $\pm$ 1.38 <sup>b</sup>	60.58 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup> $\alpha$	3.30 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup> $\alpha$	5.93 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup> $\alpha$
	L (38)	30.45 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup> $\beta$	66.68 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup> $\beta$	73.21 $\pm$ 1.98	23.82 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup> $\beta$	38.95 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup> $\beta$	31.58 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup> $\beta$	58.89 $\pm$ 1.62 <sup>ab</sup>	51.24 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup> $\beta$	3.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> $\beta$	4.68 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> $\beta$
	L-FOP (41)	27.02 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup> $\beta$	58.93 $\pm$ 2.39 <sup>ab</sup> y	71.07 $\pm$ 1.95	23.85 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup> $\beta$	37.51 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup> $\beta$	32.44 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup> $\beta$	60.95 $\pm$ 1.77 <sup>ab</sup>	51.95 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup> $\beta$	3.27 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> $\alpha$	4.63 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> $\beta$

**Tabla 5.1.** Resultados obtenidos mediante el análisis computarizado de imágenes (CASA) de la motilidad de espermatozoides de epidídimo (EP) y eyaculado (EY) divididos en 3 grupos experimentales: C, L y L-FOP. Los subíndices a, b, c, en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los subíndices x, y, z en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides epididimarios. Los subíndices  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides eyaculados.

### Experimento 1-2. Evaluación de la descondensación de cromatina mediante citometría de flujo

Al analizar los datos de descondensación de la cromatina espermática, observamos en los espermatozoides EP del grupo C una baja descondensación y diferente estadísticamente de los otros dos grupos experimentales (Tabla 5.2). Se observó el mismo patrón al comparar entre sí los 3 grupos de espermatozoides EY (C, L y L-FOP), donde en el grupo EY-C se obtuvieron los valores más bajos ( $1.32 \pm 0.50$ ) (Tabla 5.2).

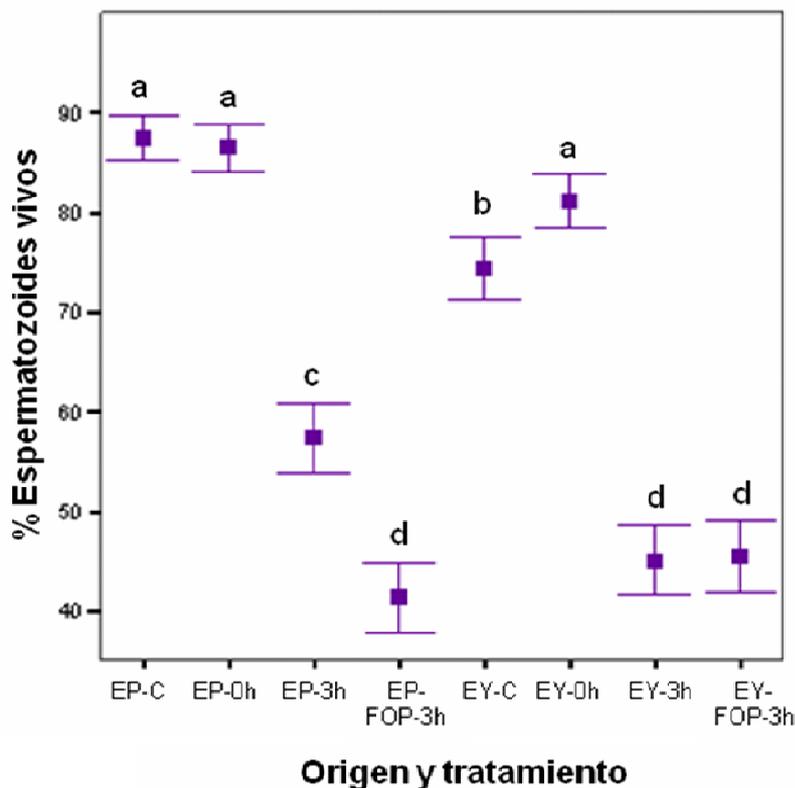
Cuando analizamos estadísticamente los 6 grupos experimentales, los grupos L, tanto en espermatozoides EP como EY, se comportaron de la misma manera ante el tratamiento, siendo similares a los grupos FOP, aunque estos eran significativamente distintos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5.2).

Origen	Tratamiento	Unidades de fluorescencia (media $\pm$ sem)
EP	C	$18.73 \pm 0.50^a$ x
	L	$24.36 \pm 0.48^{cd}$ y
	L-FOP	$24.93 \pm 0.50^d$ y
EY	C	$1.32 \pm 0.50^b$ $\alpha$
	L	$23.70 \pm 0.51^{cd}$ $\beta$
	L-FOP	$22.62 \pm 0.48^c$ $\beta$

**Tabla 5.2.** Resultados de la descondensación de la cromatina (media  $\pm$  sem) expresados en unidades de fluorescencia arbitrarias. Los subíndices (a,b,c,d) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los subíndices x, y indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides epididimarios. Los subíndices  $\alpha$ ,  $\beta$  indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides eyaculados.

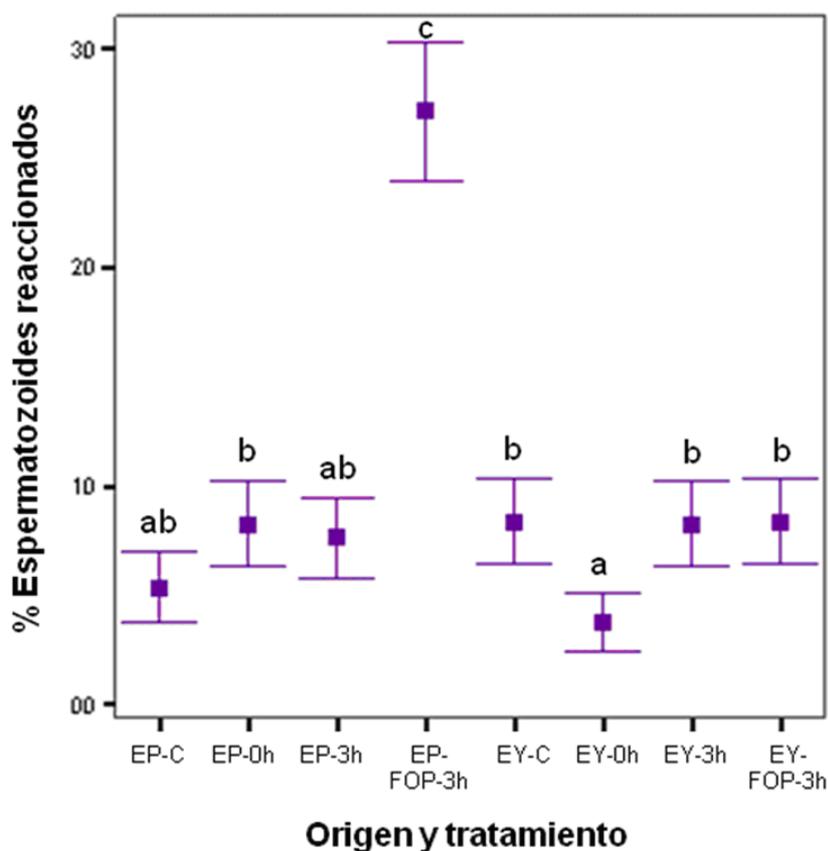
### Experimento 1-3. Evaluación de la reacción acrosómica

En la figura 5.1 queda representado el % de espermatozoides vivos en los diferentes grupos experimentales (EP: C, L-0h, 3 y FOP-3h; EY: C, L-0h y FOP-3h). Donde los valores más altos correspondieron a los grupos EP-C y EP- L-0h y EY-L-0h ( $87.5\pm 1.1$ ;  $86.5\pm 1.2$ ;  $81.1\pm 1.3$ ), y los menores a los grupos FOP y EY-3h.



**Figura 5.1.** Espermatozoides vivos (%) en espermatozoides EP y EY control y lavados (0h, 3h e incubados con FOP-3h). Las letras a, b, c y d, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En relación a los espermatozoides reaccionados observamos (Figura 5.2), que el mayor % de reacción acrosómica correspondió al grupo EP-FOP-3h ( $27.3\pm 1.5$ ), el resto de grupos presentaron resultados similares entre sí.

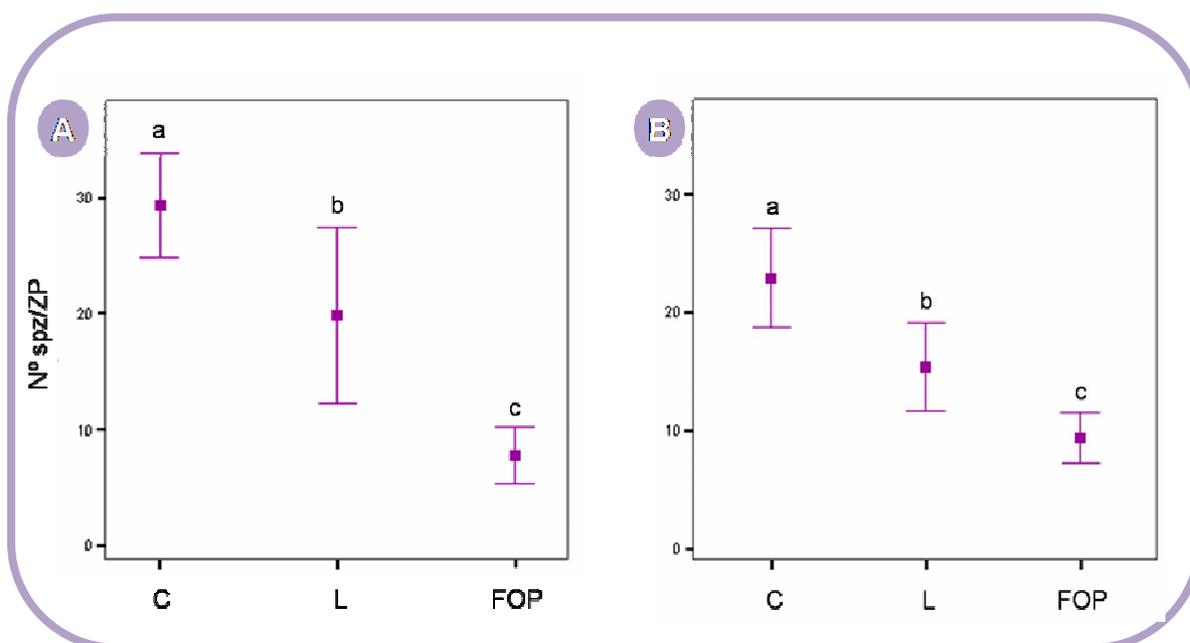


**Figura 5.2.** Espermatozoides reaccionados (%) en espermatozoides EP y EY control y lavados (0h, 3h e incubados con FOP-3h). Las letras a, b y c, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## Experiencia 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación

### Experimento 2-1. Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida

Cuando analizamos como afectaban los diferentes tratamientos espermáticos sobre los espermatozoides de EP en su unión con la ZP, observamos que el número de espermatozoides unidos a la ZP era menor en el grupo FOP que en los otros dos grupos experimentales y éstos a su vez eran distintos entre sí (C:  $29.35 \pm 2.30$ ; L:  $19.86 \pm 3.80$ ; FOP:  $7.80 \pm 1.25$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 5.3 A). La misma tendencia se observó en los espermatozoides EY (C:  $22.90 \pm 2.12$ ; L:  $15.36 \pm 1.85$ ; FOP:  $9.32 \pm 1.10$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 5.3 B).



**Figura 5.3.** Gráfico de los resultados de la evaluación de unión spz/ZP de espermatozoides de EP (A) y EY (B) sometidos a diferentes tratamientos (C, L y L-FOP). Spz/ZP: Número de espermatozoides unidos a la ZP. Las letras a, b y c indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando comparamos estadísticamente todos los grupos entre sí (tanto de espermatozoides EP como de EY), se observó que los grupos C eran estadísticamente similares, al igual al igual que los grupos L de ambos tipos espermáticos y los grupos FOP (Tabla 5.3).

Origen	Tratamiento	Nº ovocitos	Spz / ZP
EP	C	141	29.35±2.30 <sup>a</sup>
	L	124	19.86±3.80 <sup>b</sup>
	L- FOP	123	7.80±1.25 <sup>c</sup>
EY	C	151	22.90±2.12 <sup>ab</sup>
	L	128	15.36±1.85 <sup>bc</sup>
	L-FOP	139	9.32±1.10 <sup>c</sup>

**Tabla 5.3.** Resultados de la evaluación de unión spz/ZP de espermatozoides de EP y EY (C, L y L-FOP). Spz/ZP: Número de espermatozoides unidos a la ZP. Los subíndices a, b y c indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

---

---

## Experimento 2-2. Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear

Los resultados obtenidos en esta experiencia se detallan en la Tabla 5.4. Al evaluar los datos de activación del **núcleo femenino** observamos que para el *grupo EP* no hubo diferencias significativas según el tratamiento utilizado (C:  $13.41 \pm 4.8\%$ , L:  $10.67 \pm 5.0\%$  y L-FOP:  $26.32 \pm 5.0\%$ ,  $p > 0.05$ ). En el *grupo EY* observamos un aumento significativo del grado de activación en el grupo L-FOP ( $57.33 \pm 5.0\%$ ) con respecto al grupo C ( $32.88 \pm 5.1\%$ ), mientras que el grupo L ( $52.20 \pm 4.9\%$ ) no difiere de ambos. Si analizamos los 2 grupos de espermatozoides (EP y EY) conjuntamente, observamos que el grado de activación aumentó estadísticamente cuando se utilizaron espermatozoides EY L y L-FOP con respecto a todos los grupos de EP, mientras que el grupo EY-C permaneció en una situación intermedia.

Al analizar el grado de descondensación del **núcleo masculino** en los diferentes tratamientos espermáticos del grupo EP, observamos que no existieron diferencias significativas en los 3 tratamientos con respecto al grado de *descondensación media-baja y alta*. Sin embargo, se obtuvo un mayor % de espermatozoides *no descondensados* en el grupo C ( $21.95 \pm 3.4$ ) que en L-FOP ( $6.58 \pm 3.6$ ), mientras que el grupo L ( $16.00 \pm 3.6$ ) era estadísticamente similar a ambos grupos. En relación al grupo EY, no se encontraron diferencias significativas entre los 3 tratamientos espermáticos utilizados en los apartados de espermatozoides *no descondensados* y con una *descondensación baja-media*. Sin embargo, en los grupos L y L-FOP se obtuvo el nivel más alto de espermatozoides con un alto grado de descondensación o que habían formado PN (*descondensación alta*). Al evaluar conjuntamente espermatozoides EP y EY, observamos que el mayor grado de descondensación se obtuvo en los grupos EY-L y EY-L-FOP, mientras que el grupo EY-C era similar estadísticamente a los grupos EY-L, EP-L y EP-FOP, siendo estos dos últimos grupos diferentes respecto al EY-C. Al comparar los grupos experimentales entre sí en los espermatozoides EP, en el grupo L-FOP se logró la máxima descondensación. La misma tendencia se manifestó en los espermatozoides EY.

Origen	Tratamiento	N° ovocitos	NÚCLEO FEMENINO		NÚCLEO MASCULINO		
			Activación (%)	No desc. (%)	Desc. baja-media (%)	Desc. alta (%)	
EP	C	82	13.41±4.8 <sup>ab</sup> xy	21.95±3.4 <sup>a</sup> x	67.07±5.4 <sup>a</sup>	10.98±4.9 <sup>a</sup> x	
	L	75	10.67±5.0 <sup>a</sup> x	16.00±3.6 <sup>ab</sup> xy	64.00±5.6 <sup>a</sup>	20.00±5.2 <sup>ab</sup> xy	
	L-FOP	76	26.32±5.0 <sup>ab</sup> y	6.58±3.6 <sup>b</sup> y	61.84±5.6 <sup>a</sup>	31.58±5.1 <sup>ab</sup> y	
EY	C	73	32.88±5.1 <sup>bc</sup> α	12.33±3.7 <sup>ab</sup>	49.32±5.7 <sup>ab</sup>	38.36±5.2 <sup>bc</sup> α	
	L	80	52.50±4.9 <sup>cd</sup> β	5.00±3.5 <sup>b</sup>	38.75±5.4 <sup>b</sup>	56.25±5.0 <sup>cd</sup> αβ	
	L-FOP	75	57.33±5.0 <sup>d</sup> β	5.33±3.6 <sup>b</sup>	32.00±5.6 <sup>b</sup>	62.67±5.2 <sup>d</sup> β	

**Tabla 5.4.** Resultados de la activación y descondensación nuclear de espermatozoides de epidídimo y eyaculado en ovocitos microinyectados (ICSI) tras 4 horas de cultivo. Los subíndices a, b, c y d en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los subíndices x, y en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides epididimarios. Los subíndices α, β en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de espermatozoides eyaculados.

**Abreviaturas:** **No desc.:** espermatozoides con la cabeza compacta (no descondensada). **Desc. media-baja:** sumatorio de los espermatozoides ligeramente descondensados y descondensados ( $\sum$  Lig + Desc). **Desc. alta:** sumatorio de los espermatozoides muy descondensados y en estadio pronuclear ( $\sum$  Muy Desc + PN).

---

---

### **Experiencia 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante western-blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

#### **Experimento 3-1. Efecto de la incubación espermática con BSA sobre la fosforilación de la tirosina evaluados mediante WB**

La incubación con BSA no interfiere en el patrón de la fosforilación de la tirosina. Ambos tipos de espermatozoides (EP y EY) bajo los diferentes tratamientos presentan las mismas bandas fosforiladas en presencia o ausencia de BSA en el medio durante la incubación.

#### **Experimento 3-2. Efecto de la incubación espermática con FOP sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB**

Los resultados del patrón de inmunorreactividad a fosfotirosina para los espermatozoides de EP y EY indicaron que la incubación en FOP (grupo L-FOP) no produce ningún cambio en el patrón de fosforilación de la tirosina cuando los espermatozoides se someten únicamente a un lavado con Percoll® (grupo L) (Figura 5.4).

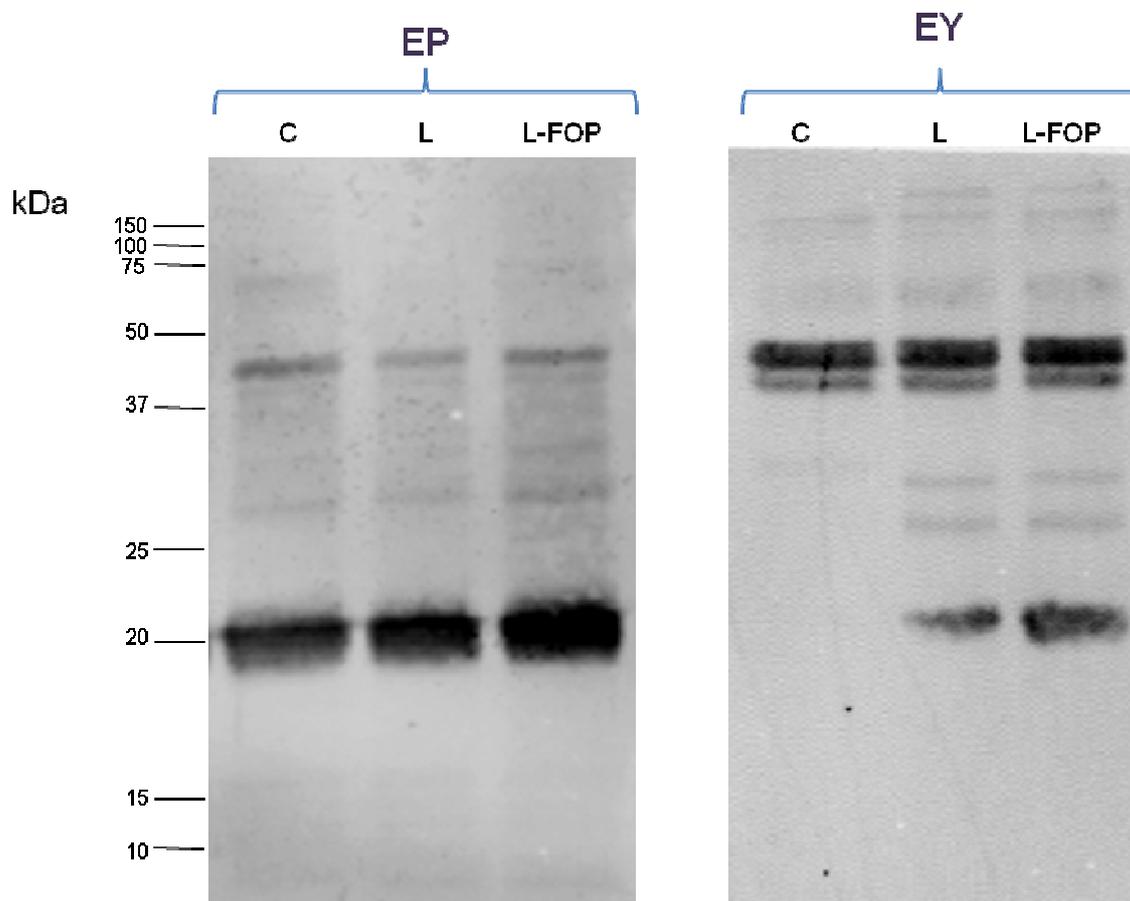
En caso de los espermatozoides epididimarios (EP) observamos (Figura 5.4):

- Banda de **60 kDa** poco fosforilada en todos los grupos experimentales.
- Banda de **44 y 42 kDa** menos fosforilada que en eyaculado, e igualmente fosforilada, independientemente de los grupos experimentales epididimarios.
- Banda de **32 y 25 kDa**, en todos los grupos aunque de baja intensidad.
- Banda de **20 kDa** por igual en todos los grupos y con una mayor reactividad con respecto a los grupos de eyaculado.

En caso de los espermatozoides eyaculados (EY) observamos (Figura 5.4):

- Banda de **60 kDa** poco fosforilada en el control.

- Banda de **44 y 42 kDa** igualmente fosforiladas en todos los grupos
- Banda de **32 y 25 kDa** que no aparece en el grupo C.
- Banda de **20 kDa** que no aparece en el C, pero si en los grupos L y L-FOP.

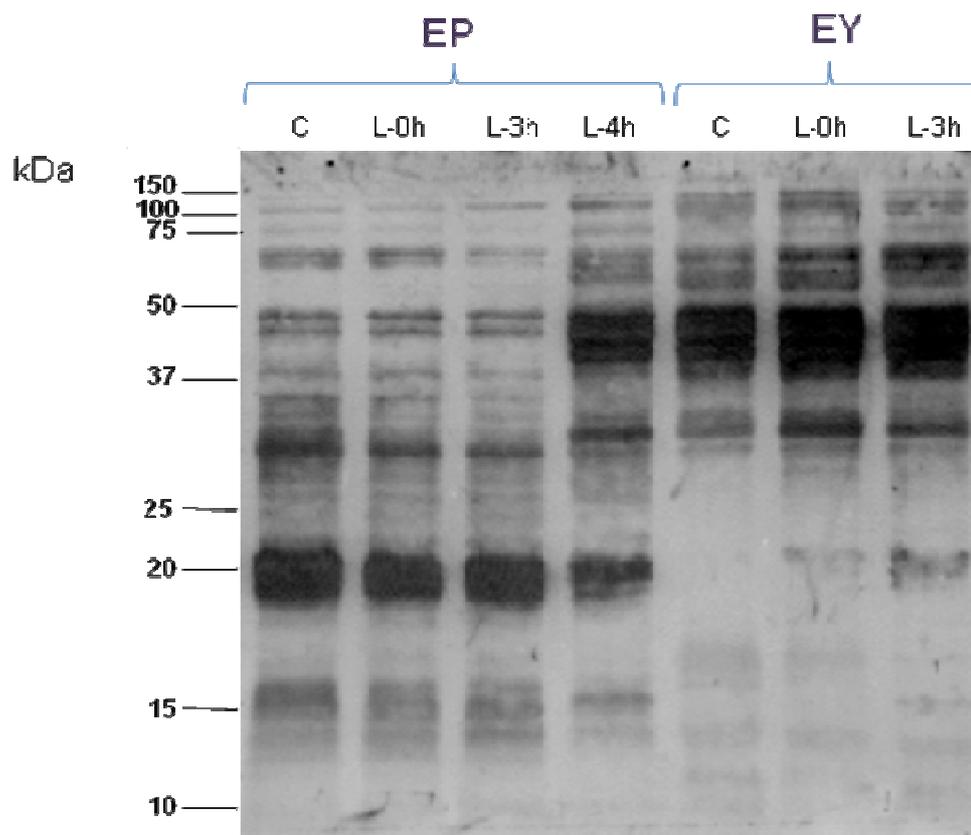


**Figura 5.4.** Inmunodetección de la fosforilación de la tirosina mediante western blot en espermatozoides de epidídimo (EP) y eyaculado (EY) lavados a través de un gradiente de Percoll® e incubados en medio TALP suplementado o no con FOP (50µg/ml) (L-FOP y L, respectivamente).

### Experimento 3-3. Efecto del tiempo de incubación espermática sobre la fosforilación de la tirosina evaluada mediante WB

En los espermatozoides de EP se han identificado, un grupo de bandas similares en los diferentes tiempos de incubación (C, 0 y 3h) (Figura 5.5). Sin embargo, en el caso del grupo 4h vemos que el patrón de fosforilación es diferente, siendo más parecido al grupo EY-C que a los grupos EP, donde las bandas de 42 y 40 kDa aparecen más fosforiladas que en los otros grupos epididimarios, y a su vez, la banda de 20 kDa disminuye su intensidad.

Para el grupo experimental de espermatozoides EY, contrariamente a lo que ocurre en los espermatozoides de EP, en el EY-C la banda de 20 kDa no aparece fosforilada en el grupo C y esta fosforilación es menor en los grupos L-0 y 3h. Se observa a su vez que las bandas de 42 y 40 kDa aumentan su intensidad de fosforilación con respecto a los grupos epididimarios (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Western Blot de membranas espermáticas de espermatozoides de epidídimo (EP) y eyaculado (EY) incubados a distintos tiempos en medio capacitante TALP.

---

---

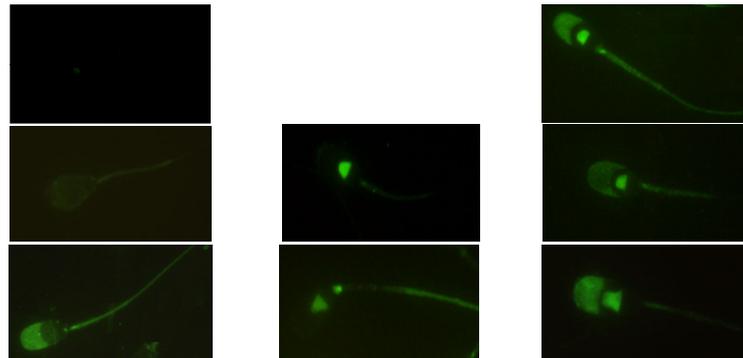
### Experimento 3-4. Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides mediante (IFI)

Para la localización de las proteínas fosforiladas en los espermatozoides de los diferentes grupos experimentales, se realizó la inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides de EP y de EY, lavados a través de un gradiente de Percoll® y bajo diferentes tiempos de incubación con o sin FOP. Los resultados que se obtuvieron se detallan a continuación y quedan reflejados en la Tabla 5.5.

El sumatorio de los grupos A, B y C (grupo I) (ver figura 4.20) en los espermatozoides de EP y EY fueron considerados como **no capacitados**. Observamos que los grupos C, presentaban el % más alto de espermatozoides con una baja fosforilación o ausencia de la misma ( $32.13 \pm 16.52$  para EP y  $73.63 \pm 15.59$  para EY).

En el caso de los espermatozoides considerados como capacitados (grupo II y III, menor y mayor estado de capacitación respectivamente), los patrones de fosforilación del **grupo II** en los espermatozoides EP fueron mayores en los grupos incubados con FOP (3h:  $76.31 \pm 15.02$ ; 4h:  $73.63 \pm 15.59$ ), siendo los valores más bajos encontrados en los grupos L (0h:  $5.38 \pm 0.79^b$ ; 3h:  $0.75 \pm 0.30$ ; 4h: 0) (ver tabla 5.5). Si observamos el patrón de fosforilación del grupo III, los valores se invierten con respecto a patrón del grupo II, siendo los valores de fosforilación en los grupos FOP iguales entre sí aunque con valores más bajos que en los grupos L (ver tabla 5.5).

En el caso de los espermatozoides de EY, el grupo C presenta menor % de espermatozoides con los patrones de fosforilación D y E (grupo II) con un  $16.00 \pm 12.97^d$  en comparación con el grupo EYL-3h ( $53.75 \pm 17.64$ ) y los grupos EYL-0h y L-FOP-3h ( $80.38 \pm 14.05$ ;  $77.50 \pm 14.34$ , respectivamente); siendo, de esta manera, estos tres grupos experimentales estadísticamente diferentes entre sí. Mientras que en el **grupo III** (considerando a dichos patrones como los de mayor grado de capacitación), los valores más elevados se encontraron en el grupo L-3h.

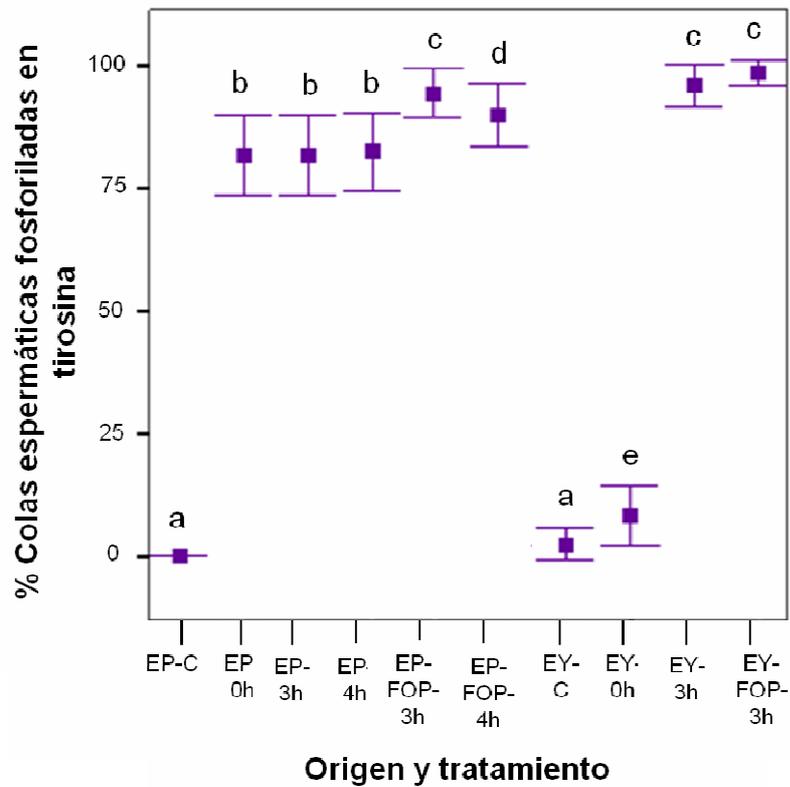


Origen	Tratamiento	Grupo I (%)	Grupo II (%)	Grupo III (%)
EP	C	32.13±16.52 <sup>a</sup>	67.88±16.52 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	L-0h	12.88±11.85 <sup>bc</sup>	5.38±0.79 <sup>b</sup>	81.75±13.60 <sup>b</sup>
	L-3h	17.63±13.48 <sup>c</sup>	0.75±0.30 <sup>b</sup>	81.63±13.70 <sup>b</sup>
	L-4h	19.50±14.02 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	80.50±14.02 <sup>b</sup>
	L+FOP-3h	5.11±0.77 <sup>f</sup>	76.31±15.02 <sup>c</sup>	15.58±13.74 <sup>c</sup>
	L+FOP-4h	9.50±10.37 <sup>bf</sup>	73.63±15.59 <sup>c</sup>	16.50±13.73 <sup>c</sup>
EY	C	73.63±15.59 <sup>g</sup>	16.00±12.97 <sup>d</sup>	10.38±10.79 <sup>d</sup>
	L-0h	11.25±11.18 <sup>b</sup>	80.38±14.05 <sup>e</sup>	8.38±0.98 <sup>d</sup>
	L-3 h	4.13±0.70 <sup>e</sup>	53.75±17.64 <sup>f</sup>	42.13±17.47 <sup>e</sup>
	L+FOP-3h	1.53±0.43 <sup>e</sup>	77.50±14.34 <sup>e</sup>	20.27±13.98 <sup>c</sup>

**Tabla 5.5.** Porcentaje de espermatozoides de EP y EY inmunorreactivos a fosfotirosina evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los subíndices a, b, c, d, e y f en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, la fosforilación de tirosina en la **cola espermática** es signo de hiperactivación flagelar. En la figura 5.6 podemos observar que en todos los grupos espermáticos estudiados, excepto para los grupos C y el grupo EY-0h, la fosforilación de la cola tiene lugar en más del 80% de los espermatozoides,

aproximándose incluso en los grupos EY-L-3h y FOP al 100% de los mismos ( $95.88 \pm 0.70$  y  $98.47 \pm 0.42$ , respectivamente).



**Figura 5.6.** Porcentaje de colas espermáticas fosforiladas en tirosina evaluadas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los subíndices a, b, c, d y e indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## **6. DISCUSIÓN**

Los espermatozoides de mamíferos cuando abandonan el testículo no son capaces de interactuar con el ovocito y fecundarlo (Yanagimachi, 1994a). Las células espermáticas comienzan a adquirir esa función a través de su paso por el epidídimo. El epidídimo es un tejido con una actividad muy alta de absorción y secreción de fluidos, estos fluidos contienen entre otros componentes iones, aminoácidos, pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, glicoproteínas y enzimas (revisado por Manásková et al., 2011). Debido a que no se conoce actividad sintética alguna de los espermatozoides en el testículo, estos cambios en la superficie espermática se deben a la interacción con el fluido luminal en el epidídimo. La superficie del espermatozoide está expuesta directamente al fluido epididimal y por tanto, la membrana plasmática sufre diversos cambios durante su paso por esta estructura. Este proceso es denominado maduración epididimaria e incluye cambios en la distribución de proteínas intramembranas o glicoproteínas de origen testicular, pero algunas de estas proteínas testiculares también se alteran, enmascaran o son reemplazadas por proteínas de origen epididimario (Yanagimachi, 1994b; Hinton et al., 1995; Kirchhoff et al., 1997; Gatti et al., 2004). Como resultado de estas modificaciones, los espermatozoides comienzan a moverse y ser células capaces de capacitarse y unirse a la zona pelúcida. Las proteínas epididimarias asociadas con la superficie espermática durante la maduración se cree que tiene su rol en pasos posteriores durante la fecundación. Sin embargo, el rol exacto de estas no se ha clarificado.

La membrana plasmática del espermatozoide no solo sufre cambios durante la maduración epididimaria, si no también durante la eyaculación y la capacitación espermática en el genital femenino. En todos estos eventos la superficie espermática está expuesta a componentes secretados tanto por el tracto reproductivo del macho como de la hembra (fluido epididimario, plasma seminal y fluido oviductal). Las proteínas secretadas por el epidídimo y las glándulas accesorias pueden unirse a la superficie espermática y pueden jugar un papel como capa protectora del ambiente hostil que se encontrará en el tracto reproductor femenino. Muchas proteínas del plasma seminal sirven como

factores decapacitantes y durante el proceso de capacitación espermática abandonan la superficie de los espermatozoides (Calvete y Sanz, 2007). La disociación de dichas proteínas se lleva a cabo mediante proteoglicanos presentes en el fluido oviductal, especialmente los glicosaminoglicanos de heparina y condroitinsulfato (Tienthai et al., 2000b). También se ha descrito que el hialuronato tiene un efecto beneficioso en la capacitación espermática en el cerdo (Tienthai et al., 2000a).

En este trabajo hemos analizado diferentes parámetros que nos permiten evaluar los cambios funcionales derivados de la capacitación en espermatozoides epididimarios y eyaculados lavados a través de un gradiente discontinuo de Percoll® e incubados durante diferentes intervalos de tiempo en un medio capacitante (TALP) suplementado o no con fluido oviductal.

## **Experiencia 1. Análisis espermático**

### **Experimento 1-1. Evaluación de la motilidad espermática (CASA)**

El análisis de la motilidad mediante sistemas computerizados (CASA) es una poderosa herramienta de uso frecuente en la evaluación de la calidad del semen (Verstegen et al., 2002). Este tipo de análisis nos permite tener una clasificación objetiva de los parámetros de motilidad de una población espermática usando imágenes digitales (García Herreros et al., 2005).

Como hemos mencionado en diversas ocasiones a lo largo de este trabajo, la hiperactividad espermática es uno de los procesos que acontecen durante la capacitación. Las características de motilidad hiperactiva son específicas de especie, pero parece ser que existen elementos comunes entre ellas el batido flagelar, que se vuelve menos simétrico y se describe una curva más pronunciada por el flagelo. Además, esta forma de motilidad ha sido observada en el lugar y momento de la fecundación y parece, por tanto, ser esencial para que ésta se lleve a cabo con éxito (Suárez y Ho, 2003). Sin embargo, el estudio realizado por Hirano et al., 2001 en la especie humana con

---

pacientes fértiles e infértiles demostró que ciertos parámetros pueden tener valor predictivo sobre la FIV antes de la capacitación espermática, tales como ALH, % motilidad, VCL y VSL, pero que éstos mismos parámetros tras la capacitación perdían el valor predictivo asumiéndolo otros como el % de motilidad y STR. Estos autores concluyeron diciendo que solo tenían valor predictivo de fecundación el % de motilidad y STR, y por tanto, el resto de parámetros CASA no son útiles para valorar capacitación.

Los espermatozoides adquieren la capacidad para expresar la motilidad durante su tránsito por el epidídimo. Sin embargo, ésta solo es observada cuando se ponen en contacto con la secreción de las glándulas accesorias durante la eyaculación. En la composición del plasma seminal se encuentran azúcares (glucosa y fructosa) que son las responsables de proporcionar el ATP necesario para mantener la motilidad durante horas. Por otro lado, el bicarbonato también presente en el plasma seminal, activa multitud de funciones espermáticas algunas de las cuales son esenciales para el inicio de la motilidad. A nivel bioquímico, el bicarbonato eleva el pH intracelular, estimula la actividad respiratoria, facilita la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y activa la adenilato ciclasa soluble de membrana, lo que resulta en un incremento del AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  que estimulan la motilidad espermática (Vadnais et al., 2007).

Al observar los resultados de este trabajo cuando comparamos espermatozoides procedentes de EP respecto de los EY comprobamos, en términos generales, que los espermatozoides de EP presentaban unos valores motiles menores (excepto ALH) que los EY. Este resultado era esperado y está en concordancia con lo descrito en la bibliografía. No obstante, los datos reflejados en la mayoría de trabajos en cuanto a espermatozoides EP hacen referencia a la evaluación de la motilidad mediante una observación subjetiva. Matás et al., (2010) realizaron un estudio de motilidad espermática mediante CASA en espermatozoides EY y EP. Las diferencias encontradas entre los espermatozoides de ambos grupos espermáticos fueron similares al presente trabajo. Por tanto, podemos confirmar, que los espermatozoides que han

estado en contacto con el plasma seminal presentan unos valores de motilidad superiores a aquellos que no lo han estado.

La hiperactivación es un patrón de movimiento que el espermatozoide presenta en el lugar y momento de la fecundación. Es una etapa crítica para el éxito de la fecundación, ya que mejora la capacidad de los espermatozoides para desprenderse de la pared del oviducto y finalmente, penetrar la ZP del ovocito (Ho y Suárez, 2001). Este tipo de movimiento, aparentemente, es inducido durante la capacitación espermática en el tracto genital femenino aunque el desencadenante extracelular o la vía de transducción de señales no son del todo conocidos. Estudios *in vitro* han demostrado que el resultado final de estas señales consiste en la interacción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (que incrementan su concentración en el citoplasma) con el axonema del flagelo, lo que provoca este tipo especial de movimiento (Cook et al., 1994). En el proceso de hiperactivación están implicados diversos sistemas de señalización celular (Marquez y Suárez, 2004) como la protein kinasa C (Harayama y Miyake, 2006) y está relacionado con el metabolismo energético de la célula por la vía del piruvato y lactato (Mollova et al., 2006). La expresión de la motilidad también va a depender del nivel de fosforilación de ciertas proteínas específicas, bajo la influencia positiva de protein kinasas (sobre todo la PKA) y la influencia negativa de protein fosfatasas (Lindemann y Kanous, 1989; Tash, 1989; Si y Okuno, 1999).

La actividad de la PKA a su vez, está controlada por la modulación de las variaciones en la concentración intracelular del AMPc, regulado principalmente por cambios en la actividad adenilato ciclasa (AC). Durante el proceso de capacitación *in vitro*, cuando se ponen en contacto los espermatozoides con el medio de capacitación (con altos niveles de bicarbonato y  $\text{Ca}^{2+}$ ), se produce el cambio de un movimiento progresivo y más o menos lineal a otro no progresivo pero si muy vigoroso, similar a un fuerte latigazo de gran amplitud (Ho y Suárez, 2001).

En nuestro trabajo al capacitar los espermatozoides (EY y EP), observamos que se modifican los parámetros de motilidad respecto al control

(no capacitado). Sin embargo, la respuesta fue diferente según el origen espermático. Para los espermatozoides de EP se produjo un incremento en todos los parámetros (excepto ALH y BCF), y para los EY un descenso de los mismos, excepto para ALH (en el que se produce un incremento). En relación a los trabajos publicados sobre la medición de los parámetros motiles tras la hiperactivación, como podemos observar en la tabla 6.1, existe cierta discrepancia entre las distintas publicaciones, sobre todo para el caso de espermatozoides EY.

Autor (Especie)	MP	Mot	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Chamberly et al., 2001 (Bovino)									+	+
McCann y Chantler, 2000 (Humano)	-	+	+	-	+					+
Schmidt y Kamp, 2004 (Porcino)			+	-	+	-	-	-		+
García Herreros et al., 2005 (Porcino)			-	+		+	+			
Buffone et al., 2005 (Humano)		-	+	+	+	+				+
Yeste et al., 2009 (Porcino)	+					+	+			
Matás et al., 2010 (Eyaculado Porcino)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
Matás et al., 2010 (Epidídimo Porcino)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Presente trabajo (Epidídimo)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>		<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
<b>Presente trabajo (Eyaculado)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>		<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>		<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

**Tabla 6.1.** Modificaciones (aumento y disminución indicado por los signos + y -) en los parámetros de motilidad evaluados mediante el análisis computerizado de imágenes (CASA) de espermatozoides obtenidos por diversos autores después de la capacitación. Las casillas en blanco no tienen variación respecto de los espermatozoides sin capacitar o no realizaron el estudio de esos parámetros.

Algunas de las posibles explicaciones a esta situación se comentan a continuación:

- Por un lado, sería importante considerar si la capacitación es un factor intrínseco al espermatozoide o si hay primeros mensajeros en el genital de la hembra involucrados en la inducción de la capacitación, o ambas situaciones a la vez. Se ha observado que ciertos compuestos

---

aislados de oviducto, pueden ser el soporte de la capacitación (Killian, 2004). Sin embargo, el hecho de que el espermatozoide pueda capacitarse *in vitro* en un medio definido, podría ser un argumento en contra de que el factor femenino sea el responsable de inducir la capacitación. Si la capacitación fuese intrínseca al espermatozoide hay dos posibilidades para analizar. Primera, la capacitación espermática puede ser inducida por modificaciones del medio en el que se encuentra inmerso como cambios en la concentración de bicarbonato o aceptores de colesterol (tanto *in vivo* como *in vitro*). Segundo, es posible que además de estos cambios, el espermatozoide secrete un factor que sea el de la capacitación, lo cual explicaría que este proceso no se diese al mismo tiempo en todas las células debido a la heterogeneidad en un eyaculado (Katska-Ksiazkiewicz, 2007; Yoshida et al., 2008; Bi et al., 2009)

- La mayoría de investigadores que evalúan la motilidad espermática mediante CASA opinan que es un sistema objetivo y reproducible. Sin embargo, De Geyter et al., 1998 observaron una variabilidad en los resultados obtenidos del 4-6% entre el análisis realizado por un mismo técnico o entre varios.
- Otro aspecto importante a tener en cuenta son las condiciones de lavado y los medios que se utilizan para capacitar a los espermatozoides. Generalmente, cada laboratorio posee una técnica y/o un medio para inducir la capacitación y esto da lugar a la obtención de diferentes valores en los parámetros de motilidad hiperactiva. Benon y Linet (2005), estudiaron los parámetros de motilidad utilizando dos medios de capacitación diferentes y observaron que el comportamiento espermático no fue el mismo, por lo que el valor diagnóstico de la cinética espermática de la hiperactivación es indisociable de las condiciones de preparación.
- El análisis cuantitativo del semen mediante CASA está basado sobre parámetros cinéticos de espermatozoides individuales que sólo se

reconstruyen a partir de los movimientos de su cabeza, ya que por lo general, este sistema no permite el análisis directo de los movimientos flagelares que genera la hiperactividad espermática. Por tanto, para la valoración precisa de los espermatozoides hiperactivos por CASA, el conjunto de parámetros deben ser definidos para una especie en particular, teniendo en cuenta la frecuencia de muestreo de la imagen (Mortimer y Maxwell, 1999). También es necesario recordar que como consecuencia de los cambios en la estructura de la membrana durante la capacitación y que la sialoproteína de membrana procedente de la secreción del epidídimo es eliminada favoreciendo la aglutinación (Harayama et al., 2000) los espermatozoides tienden a agregarse cabeza con cabeza, especialmente en los verracos (Harayama et al., 1998), y la motilidad de los espermatozoides agregados, no puede ser analizada por CASA.

El umbral de parámetros cinéticos para diferenciar entre los espermatozoides hiperactivos y no hiperactivos ha sido descrito en el ratón (Neill y Oldsclarke, 1987), el hombre (revisado por Mortimer, 1997), morueco (Mortimer y Maxwell, 1999) y la rata (Cancel et al., 2000) y son patrones de movimiento diferentes y específicos de especie. No obstante, los parámetros comúnmente usados para identificar espermatozoides hiperactivados son el descenso en VCL y LIN y el incremento en ALH (García Herreros et al., 2005).

Schmidt y Kamp (2004) trataron de establecer un método de inducción de la hiperactivación espermática *in vitro* en el verraco y definir los valores para diferenciar entre espermatozoides hiperactivos y no mediante CASA. Compararon dos parámetros característicos del movimiento flagelar de los espermatozoides porcinos, el ángulo de batido y el radio de curvatura, con los parámetros cinéticos de CASA. La transición de movimiento normal a movimiento hiperactivo se caracterizó por un aumento en el ángulo del batido y de una disminución en el radio de curvatura. Resultados similares los obtuvieron previamente Suárez et al., (1992) en espermatozoides hiperactivos de porcino donde observaron un descenso significativo en el radio de curvatura del flagelo. Finalmente, la conclusión a la que llegaron Schmidt y Kamp (2004)

fue que los análisis estadísticos evaluados mediante ROC de los espermatozoides seleccionados sugirieron que el valor medio de ALH por sí solo era suficiente para discriminar entre espermatozoides no hiperactivos de los hiperactivados.

Sin embargo, en nuestro trabajo el único parámetro que coincidió con los obtenidos por estos autores fue el descenso de LIN. Por tanto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo en relación a los espermatozoides EY coinciden con los parámetros que indican una hiperactivación ya que los valores de LIN fueron menores en el grupo lavado y el valor de ALH fue mayor en el grupo lavado que el control. Matás et al., (2010) utilizando el mismo sistema de lavado y medio de capacitación obtuvieron valores similares a los obtenidos en este estudio, además de obtener una correlación de los parámetros CASA con ciertos parámetros de fecundación *in vitro*.

Cuando analizamos el efecto del lavado espermático a través de un gradiente de Percoll® y su posterior resuspensión en un medio enriquecido con  $Ca^{2+}$  y bicarbonato observamos que las modificaciones producidas en los espermatozoides de EP no eran iguales a las producidas con los espermatozoides EY. En cierto modo este resultado era previsible ya que los espermatozoides EY adsorben ciertos componentes de las glándulas accesorias (factores decapacitantes) y que a pesar de que son lavados, estos componentes no son eliminados en su totalidad. Schmidt y Kamp (2005) comprobaron que al adicionar un 25% del plasma seminal a espermatozoides EY lavados, requerían una mayor concentración de  $Ca^{2+}$  para inducir la hiperactividad. Sin embargo, en los trabajos revisados en relación a este tema no explican los motivos de la diferente respuesta presentada entre estos tipos de espermatozoides.

Sansegundo et al., (2007) sugiere que los espermatozoides EP estarían en mejores condiciones que los del eyaculado para desarrollar los procesos funcionales necesarios para alcanzar la fecundación *in vitro* del ovocito, como previamente pusieron de manifiesto Rath y Niemann (1997) utilizando semen congelado de ambos tipos de espermatozoides procedentes del mismo animal.

---

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

En la mayoría de los mamíferos, después de la cópula los espermatozoides se van liberando de gran parte del plasma seminal durante su trayecto por el genital femenino. Finalmente al llegar al oviducto, se unen al epitelio del istmo en el denominado reservorio espermático (revisado por Suárez y Pacey, 2006) y esta unión prolonga su vida mótil (Pollard et al., 1991; Gwathmey et al., 2006b). A medida que se acerca la ovulación, estos espermatozoides adquieren el movimiento hiperactivo descrito anteriormente. Durante el proceso de capacitación, este tipo de movimiento va a permitir a los espermatozoides salir de las criptas del epitelio del oviducto. En este lugar la capacitación y la hiperactivación se producen de forma gradual, lo que reduce las probabilidades de una fecundación polispérmica. Al parecer esta liberación se encuentra modulada por las secreciones del oviducto, las células del *cumulus* y/o el ovocito. Además, la hiperactivación ayuda a los espermatozoides a penetrar la matriz de las células del *cumulus* y es absolutamente necesaria para penetrar la ZP del ovocito y lograr la fecundación (revisado por Suárez, 2008).

Al incubar los espermatozoides capacitados en fluido oviductal observamos que para el caso de los espermatozoides de EP disminuían los parámetros VSL, STR, WOB y BCF, mientras que en los espermatozoides EY el fluido oviductal solo afectó al % de motilidad y ALH, donde se observaron valores más bajos. Como observamos el efecto del fluido oviductal fue diferente en ambos tipos de espermatozoides. Gwathmey et al., (2003) observaron que los espermatozoides bovinos de EP se unen al epitelio oviductal en menor

---

medida que los EY, al parecer debido a la proteína PDC109, ya que al incubar los espermatozoides de EP con dicha proteína, estos se unían al epitelio oviductal de la misma forma que los espermatozoides EY.

En el oviducto los espermatozoides se encuentran en un ambiente viscoso, ya sea por el epitelio oviductal o por el contacto con la matriz de las células de la granulosa del ovocito las cuales presentan un alto nivel de ácido hialurónico (Dandekar et al., 1992). Aunque la penetración de la matriz es facilitada por el enzima hialuronidasa presente en la superficie de la cabeza del espermatozoide (Kim et al., 2005), la hiperactivación es sin duda la que realmente ayuda a los espermatozoides a avanzar por este medio. Estudios sobre motilidad en espermatozoides en oviductos previamente “transiluminados” sugirieron que la hiperactivación también permite a los espermatozoides moverse con eficacia en el lumen del oviducto (Kölle et al., 2010).

Cuando los espermatozoides hiperactivos se colocan sobre un portaobjetos, a menudo presentan movimientos circulares, y puede que este tipo de movimiento en el oviducto cubra el espacio oviductal de forma que se incrementa la probabilidad de encontrar el complejo *cumulus*-ovocito (Suárez y Ho, 2003). En el ratón se ha observado este movimiento en espermatozoides que se encontraban en las zonas más profundas de las criptas del epitelio oviductal para migrar hacia la luz del canal central (Suárez y Osman, 1987). En muchas especies de mamíferos, se forma un depósito o reservorio de espermatozoides unidos al epitelio de la mucosa del istmo del oviducto (revisado por Suárez y Pacey, 2006) y esta unión prolonga su vida mótil (Pollard et al., 1991; Gwathmey et al., 2006a). En algunas especies, esta interacción implica el reconocimiento de hidratos de carbono, es decir, la proteína en la superficie de los espermatozoides se une específicamente a un receptor glicosilado en el epitelio (Suárez y Pacey, 2006).

En el ganado vacuno, las proteínas de los espermatozoides que se unen al epitelio han sido identificadas como miembros de la familia de las BSP (*Bovine Seminal Plasma Proteins*) (Gwathmey et al., 2003; Gwathmey et al.,

---

2006a). Los espermatozoides de toro al ser capacitados pierden parte de estas proteínas, reducen su unión al epitelio oviductal y la hiperactivación podría ayudar a salir fuera del epitelio. En el ratón, los espermatozoides que exhiben el movimiento hiperactivo son aquellos que se desprenden del epitelio oviductal (Demott y Suárez, 1992). El componente que hace que los espermatozoides unidos al epitelio se liberen no está claro, no obstante algún/os factor/es del fluido oviductal que se modifica durante el proceso de la ovulación puede ser el responsable.

Cuando los espermatozoides capacitados, se incubaron con FOP observamos, en espermatozoides de EP, que los parámetros VSL, STR y WOB se modifican y su valor es similar al control. En cuanto al EY es el parámetro ALH el que adquiere un valor similar al control, no viéndose modificados el resto exceptuando el % de motilidad progresiva que, contrariamente a lo que describen el resto de autores, disminuye. En base a estos resultados podríamos pensar que el fluido oviductal presenta un efecto que revierte la capacitación. Suárez et al., (1992) observaron que espermatozoides obtenidos de oviducto (los cuales se asumen que están en parte capacitados) seguían una trayectoria lineal, que es el tipo de movimiento de espermatozoides sin capacitar. Por otro lado, también se ha descrito que las condiciones en que se encuentran los espermatozoides en el oviducto hacen que los niveles de  $Ca^{2+}$  en el citosol sean bajos lo cual explica que se mantenga una mayor viabilidad, una menor motilidad y un menor estado de capacitación.

Tienthai et al., 2004, observaron que el fluido oviductal modula la capacitación espermática en el cerdo y su efecto dependía si era obtenido en fase próxima a la ovulación (menor capacitación) o post-ovulación (mayor capacitación). Este estudio lo realizó analizando el desorden lipídico de la membrana espermática. Aunque en este trabajo no se evaluó la capacitación mediante el estudio de los parámetros de motilidad, concluyó diciendo que el fluido oviductal periovulatorio mantiene la viabilidad espermática y no induce la capacitación; sin embargo, el fluido post-ovulatorio si que favorecía la inducción de la capacitación. Además, la exposición de los espermatozoides capacitados al fluido oviductal periovulatorio revertía el efecto del bicarbonato sobre la

capacitación mientras que con el fluido post-ovulatorio incrementaba sinérgicamente la capacitación.

Estos datos son similares a los obtenidos en nuestro estudio ya que utilizamos el fluido oviductal periovulatorio. En esta misma línea, Coy et al., 2010, utilizando una fracción de bajo peso molecular (<100kDa) de fluido oviductal preovulatorio sobre espermatozoides capacitados observaron que disminuía VCL, VAP, VSL, BCF, ALH y LIN y además protegía la viabilidad. Sin embargo no observaron ningún cambio cuando utilizaba la fracción de alto peso molecular (>100kDa). Zumoffen et al., 2010 no obtuvieron diferencias en cuanto a los patrones de motilidad pero sí un menor grado de fosforilación de tirosina de las proteínas, por lo que también podría decirse que previene la capacitación.

En diversos trabajos se ha descrito que la motilidad espermática se encuentra afectada por el fluido oviductal. Los espermatozoides que se encuentran unidos al epitelio juegan un importante papel en la preservación de la fertilidad, almacenamiento y en la reducción de la fertilización polispérmica.

En nuestro estudio determinamos el efecto del fluido oviductal (de cerdas que se encontraban en el momento de la ovulación o muy próximo a él) sobre los parámetros de motilidad en espermatozoides porcinos EP y EY capacitados *in vitro*. Durante el ciclo, la composición del fluido se ve modificada: el contenido en progesterona, la salida del líquido folicular durante la ovulación o la secreción de ciertas macromoléculas por parte del epitelio del fluido oviductal. Además, se produce un cambio en el ambiente iónico, en particular un aumento en el pH que activa los canales CatSper y eleva el pH intracelular para iniciar la hiperactivación. Maas et al., en 1977, determinaron un incremento en el pH del lumen del oviducto de mono rhesus de 7,1 hasta 7,3 durante la fase folicular. En la ovulación se produjo un aumento repentino de 7.5 a 7.8, que se mantuvo durante toda la fase lútea. Este aumento de pH podría ser el factor principal para inducir hiperactivación en el oviducto.

Con esta experiencia hemos demostrado mediante la evaluación de la motilidad a través de un sistema computerizado (CASA) que los espermatozoides EY y EP, después de ser sometidos a un proceso de capacitación espermática, cambian su patrón de movimiento. Sin embargo, este sistema, al menos en la especie porcina y bajo nuestras condiciones de estudio, no permite determinar que parámetros son los más fiables para discriminar espermatozoides hiperactivos ni a partir de qué valor se considera que un espermatozoide está capacitado.

### **Experimento 1-2. Evaluación de la descondensación de cromatina mediante citometría de flujo**

**L**a cromatina del núcleo espermático presenta una organización muy particular que difiere de la que se encuentra en el núcleo de las células somáticas. Durante la espermatogénesis alrededor de 85 % de las histonas, proteínas clásicas de la cromatina de las células somáticas, son reemplazadas por proteínas de transición y posteriormente por proteínas más pequeñas, denominadas protaminas. Estas protaminas presentan uniones disulfuro e interactúan fuertemente con el ADN compactándolo de manera que forman una cromatina altamente condensada y muy resistente tanto desde el punto de vista físico como químico. Además, la compactación de la cromatina espermática, está mediada por dos procesos: fosforilación y defosforilación de residuos de serina y treonina de las protaminas. Por otro lado, se ha comprobado en la especie humana que cada protamina une un átomo de  $Zn^{2+}$ , el cual estabiliza la estructura de la cromatina previniendo la formación en exceso de puentes disulfuro mediante un mecanismo simple: el  $Zn^{2+}$  forma puentes entre los grupos tioles de la cisteína y con los grupos imidazol de la histidina (Björndahl y Kvist, 2010).

La condensación y estabilización de la cromatina está regulada durante diferentes estadios en la elongación de la espermátida (Huret, 1986), en el transporte epididimario (Calvin y Bedford, 1971), así como por plasma seminal tras la eyaculación (Björndahl et al., 1986).

Esta organización de la cromatina protege la integridad del genoma paterno durante el transporte del espermatozoide por el tracto reproductor masculino y femenino frente a agentes que pudieran modificar la información genética (Lipitz et al., 1992). La capacidad de los espermatozoides para fecundar al ovocito depende de una serie de eventos secuenciales cuyo fin es la descondensación de la cromatina espermática. Esta estructura debe permitir que el ADN esté disponible rápidamente en el ooplasma del ovocito una vez que éste ha sido fecundado. Por tanto, una deficiente compactación facilita el acceso al ADN de sustancias nocivas mientras que, un incremento exagerado de la compactación pondría en peligro el momento de la liberación del ADN espermático en el ooplasma. Consecuentemente, todos los factores que afectan a la compactación de la cromatina deben considerarse para comprender la fisiología normal y las diferentes alteraciones derivadas de ellos (Nikolettos et al., 1999; Khalifa et al., 2008).

En nuestro trabajo hemos estudiado el efecto que tiene el tratamiento de capacitación espermática sobre la descondensación de la cromatina y hemos querido determinar si el fluido oviductal ayuda a estabilizar su estructura una vez que los espermatozoides han sido lavados a través de gradientes de Percoll®. Los resultados de descondensación para el grupo control de EY y EP resultaron ser muy distintos entre sí (1.32 vs. 18.73, respectivamente), donde los espermatozoides EY presentaron una cromatina con un mayor grado de compactación que los de EP. Este resultado coincide con lo descrito en la bibliografía, ya que la secreción de las glándulas accesorias aporta diversas sustancias que favorecen la compactación y la estabilidad de la cromatina. Entre estas sustancias destaca el  $Zn^{2+}$ , el cual ha demostrado tener un importante papel estabilizador de la cromatina como hemos mencionado anteriormente (Björndahl y Kvist, 2010). Además, el plasma seminal contiene antioxidantes que previenen de la acción de los radicales libres que desestabilizan la estructura de la cromatina. Existen estudios que evidencian que el plasma seminal procedente de donantes puede influir de forma distinta sobre la calidad del ADN (Caballero-Peregrín et al., 2008). Los espermatozoides de la cola del epidídimo son maduros y capaces de fecundar, sin embargo no poseen la estabilidad que proporciona el plasma seminal.

Al someter a los espermatozoides al tratamiento de capacitación comprobamos que provocaba, tanto en espermatozoides de EP como EY, un aumento en la descondensación de la cromatina. Además, la procedencia de los espermatozoides no tuvo ningún efecto ya que se consiguieron valores muy similares. En la bibliografía no hemos encontrado estudios que correlacionen tratamientos de capacitación en espermatozoides EP con la estabilidad de su cromatina. Para el caso de espermatozoides EY nuestros resultados coinciden con los obtenidos en espermatozoides de bovino (Recková et al., 2008) y humano (Royere et al., 1991; Caballero-Peregrín et al., 2008) aunque no hay demasiadas referencias en relación a ello. La descondensación de la cromatina en los grupos lavado podría deberse tanto al sistema de capacitación, como a la composición del medio y del tiempo que transcurre durante la realización de este proceso.

Royere et al., (1991) comprobaron que el proceso de la capacitación alteraba la estabilidad de la cromatina en espermatozoides humanos; sin embargo, no se producía de la misma manera cuando utilizaban distintos medios. En relación al tiempo transcurrido desde que se inicia la capacitación, Caballero-Peregrín et al. (2008) determinaron que se producía un incremento de la descondensación de la cromatina a lo largo del tiempo y que esto podría afectar el posterior desarrollo embrionario cuando se realizan técnicas de reproducción asistida. Durante los tratamientos de capacitación, generalmente los espermatozoides son centrifugados (a través de gradientes de densidad) o depositados en medios donde permanecen durante un periodo de tiempo más o menos largo (técnicas de swim-up) para proceder a su selección y eliminación del medio donde se encuentran inmersos (plasma seminal, diluyentes o medio de congelación). Este proceso produce daños en el ADN (Silva y Gadella, 2006) ya que, entre otras consecuencias, induce la generación de radicales libres que afectan al ADN celular (Aitken y Curry, 2011). No obstante, también se ha demostrado que ciertos niveles de ROS participan en el proceso de capacitación (Leclerc et al., 1997; Awda et al., 2009).

Con todo lo expuesto anteriormente podríamos pensar que los tratamientos de capacitación alteran el ADN de todos los espermatozoides, (lo cual nos llevaría a un fracaso en la producción de embriones y en la obtención de descendencia viva mediante técnicas de reproducción asistida), lo cual es falso. En realidad, y como ya hemos mencionado en alguna ocasión a lo largo del trabajo, existe una selección espermática previa y el proceso de capacitación no afecta por igual a todos los espermatozoides [recordemos que la población espermática en un eyaculado no es homogénea (Harrison, 1996)] de forma que finalmente obtendríamos una población con una cromatina lo suficientemente estable para que se lleve con éxito la fecundación y el posterior desarrollo embrionario. Recková et al., (2008) demostraron que espermatozoides provenientes de machos con la misma fertilidad *in vivo*, con similares características seminales y con resultados similares de fecundación *in vitro*, presentaban distinta estabilidad de cromatina frente a los procesos de capacitación espermática *in vitro*. Esto les sirvió para explicar las diferencias en la obtención de embriones *in vitro*, donde sí que correlacionaron la calidad embrionaria con el grado de estabilidad de la cromatina.

Para intentar acercarnos a las condiciones en las que se encuentra un espermatozoide *in vivo*, los espermatozoides que habían sido lavados los incubamos en fluido oviductal. Transcurridos 30 minutos estudiamos el estado de descondensación de la cromatina. En cierto modo esperábamos obtener algún efecto ya que en la composición del fluido oviductal aparecen distintas sustancias que participan en el proceso de capacitación (Rodríguez-Martínez, 2007). No haber encontrado ningún efecto puede tener varias explicaciones.

Cabe la posibilidad, aunque deberíamos realizar otros estudios, que realmente no tenga ningún efecto, bien es cierto que parece ser más plausible el hecho de que las condiciones en las que se hizo la experiencia no sean las adecuadas para poder observarlo ya que cuando incubamos los espermatozoides con el fluido oviductal, éstos estaban capacitados (y ya habían alcanzado la descondensación) y por otro lado, también es posible que el tiempo de incubación no fuera lo suficientemente largo como para que se

obtuviera algún efecto, ya que como se ha demostrado el proceso de descondensación es en cierto grado reversible (Björndahl y Kvist, 2010).

Entre los diversos estudios analizados sobre estos aspectos, hemos comprobado que, en términos generales, las secreciones procedentes del genital de la hembra, bien sean del oviducto, útero o del folículo, favorecen la desestabilización de la cromatina. No obstante, en algunos casos los resultados podían ser contradictorios.

Nicolle et al., (1985) no obtuvieron un descenso en la estabilidad de la cromatina en espermatozoides de morueco incubados en fluido procedente de la sección uterina de esta especie. Sin embargo, estos mismos autores en años anteriores observaron un incremento en la desestabilización de la cromatina después del paso de los espermatozoides por el tracto genital en esta misma especie (Courtens y Fournierdelpesch, 1979). En el ratón, (Porcelli et al., 1987), determinaron un incremento en la desestabilización de la cromatina durante el tránsito de los espermatozoides por el útero y oviducto.

Royere et al., (1991) comprobaron en la especie humana que el fluido oviductal incrementaba la desestabilización de la cromatina. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el acceso a la estructura de la cromatina con las distintas tecnologías no siempre es el adecuado ni comparable entre laboratorios puesto que esta estructura presenta un elevado número de puentes disulfuro que dificultan la detección de roturas en el ADN por diferentes ensayos (cometa, TUNEL, técnicas de SCSA) y pueden llegar a dar resultados falsos negativos (Björk et al., 2009; Pettersson et al., 2009). Sin embargo, ha pasado tiempo desde que se realizaron los primeros estudios sobre el efecto de las secreciones procedentes del genital femenino sobre la funcionalidad espermática y han aparecido nuevas técnicas que podrían discriminar mucho mejor el efecto estas secreciones sobre la estabilidad de la cromatina y el efecto que tiene sobre la fertilidad.

---

### Experimento 1-3. Evaluación de la reacción acrosómica

La reacción acrosómica (RA) es el resultado de la fusión progresiva de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide capacitado en respuesta a un agonista (progesterona y/o zona pelúcida) (Flesch y Gadella, 2000). La RA se puede inducir *in vitro* en espermatozoides capacitados, mediante la incubación con ZP solubilizadas, o mediante el empleo de ciertos ligandos como: progesterona, EGF, péptido natriurético atrial o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Breitbart et al., 1997). La cascada de eventos que acontecen, no es del todo conocida, pero es un hecho demostrado que se activan ciertas protein kinasas y aumenta la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida por un aumento del pH intracelular (Florman et al., 1998). Al igual que sucede en otros eventos, para que la RA tenga lugar se necesita de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Darszon et al., 2001).

Para determinar la RA en este trabajo hemos usado la lectina PNA que se une a residuos de  $\beta$ -galactosa de la membrana acrosomal externa. La PNA va a detectar los primeros signos de la exocitosis acrosómica, tan pronto como empieza a producirse la fusión entre los poros de la membrana plasmática y la membrana acrosomal (Gadella y Harrison, 2000). Además, hemos realizado el estudio junto con la determinación de la viabilidad espermática utilizando para ello una molécula con afinidad por el ADN como es el caso del yoduro de propidio (IP). Ésta es una tinción nuclear y se emplea como tinción espermática de contraste. En combinación permiten una evaluación rápida y simple de la presencia o ausencia del acrosoma.

Los resultados de RA obtenidos en este estudio se encontraban por debajo del 9% en todos los grupos excepto para el caso de los espermatozoides de EP incubados durante 3 horas con FOP, en el que se observó un marcado incremento (27.13%). Estos datos son similares a lo descrito en la bibliografía (Coy et al., 2010; Matás et al., 2010) ya que, si exceptuamos los grupos incubados en FOP, los espermatozoides al no estar en contacto con ningún agonista que induzca la RA, no deben experimentar

---

este proceso. Los valores de RA obtenidos pueden ser consecuencia de células que presentaron algún daño o vulnerabilidad en su membrana al inicio de la experiencia o bien durante el transcurso de la misma. En este sentido, se ha demostrado que, los lavados, el proceso de centrifugación, así como el tiempo de incubación alteran la membrana plasmática del espermatozoide, y por tanto, aunque no fuese una RA fisiológica, la lectina PNA marcaría el interior del acrosoma de estas células dañadas.

Por otro lado, al analizar los resultados de mortalidad celular, observamos que ésta se incrementaba con el tiempo de incubación y que era mayor para los espermatozoides EY. Sin embargo, ni el tratamiento de capacitación (lavados vs. control) ni la incubación en FOP tuvieron influencia en éste parámetro. El incremento de la mortalidad celular a lo largo del tiempo se debe a que los espermatozoides que han sido liberados de los factores estabilizadores (producidos por la secreción del genital masculino) e incubados en un medio rico en bicarbonato y  $\text{Ca}^{2+}$  les induce a presentar una alta actividad metabólica que les lleva al agotamiento y a la muerte celular (Gadella y Van Gestel, 2004)

Un resultado curioso de RA fue el observado para los grupos EY-C y EY-0h donde aparece mayor RA en el control que en los tratados. Consideramos que este hecho no tiene gran relevancia desde el punto de vista de la evaluación de la capacitación a través de la RA. El grupo EY-C presentaba menor número de células viables que el grupo lavado 0h, por lo que presumiblemente sus membranas estaban dañadas y por ello el marcaje con la lectina fue mayor, al centrifugar la muestra a través de un gradiente de densidad, que selecciona las células morfológicamente normales, la mayoría de células dañadas fueron eliminadas. Hay que tener presente que los espermatozoides EY, presentan una mayor manipulación que los EP. Los espermatozoides EY son recogidos mediante método manual con un filtro para que durante este proceso se evite la aglutinación que produce las secreciones de las glándulas bulbouretrales.

Posteriormente, se diluyen y transportan al laboratorio donde pasan un tiempo más o menos largo con ciertas variaciones de temperatura (pasan de

---

38.5°C a 15°C en la mayoría de los casos para su correcta conservación). Todo ello, a pesar de que sean espermatozoides de calidad y procedentes de animales de fertilidad probada, hace que exista una mayor mortalidad celular que en espermatozoides de EP.

En principio, esperábamos que los resultados de RA para espermatozoides lavados e incubados en FOP fuesen similares independientemente de su origen (EY o EP). Sin embargo, la RA solo se incrementó en el caso de espermatozoides EPL-FOP-3h. Se ha propuesto que la eliminación de factores decapacitantes (de las secreciones epididimarias y/o del plasma seminal) inducen la actividad tirosin kinasa de las proteínas transmembranales (Töpfer-Petersen et al., 1998) permitiendo la interacción con la ZP lo cual conduce a una mayor actividad de estas kinasas. Este mismo mecanismo se puede aplicar a los receptores de progesterona de manera que los espermatozoides que exponen receptores funcionales a progesterona son los que inician la reacción acrosómica cuando son expuestos a ésta hormona. Como se ha mencionado, en la composición del fluido oviductal aparecen entre otros componentes hormonas, factores de crecimiento, glicosaminoglicanos e incluso células del folículo, y todo ello tiene influencia en la fisiología espermática (revisado por Tollner et al., 2009). Además, la composición del fluido folicular varía según el momento del ciclo (revisado por Avilés et al., 2010) por lo que su efecto sobre el espermatozoide variará en función del momento en que dicho fluido se haya obtenido. En este trabajo hemos incubado durante tres horas espermatozoides lavados, por tanto libres de factores decapacitantes, con fluido oviductal de cerdas que se encontraban muy próximas al momento de la ovulación, y por ello, con concentraciones elevadas de progesterona [6 µg/ml en el fluido oviductal (Libersky y Boatman, 1995)] lo que podría explicar los resultados de RA en espermatozoides epididimarios. Sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre los espermatozoides eyaculados.

En la especie canina se ha demostrado que más del 90% de los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo tienen afinidad por la progesterona (P4) mientras que los espermatozoides eyaculados no presentan

---

tal afinidad debido a que se encuentran enmascarados o recubiertos (*coating*) por diversos factores secretados por la próstata. Cuando estos factores son liberados del espermatozoide, bien durante el proceso de capacitación o bien por lavados a través de gradientes de densidad, vuelven a presentar dicha afinidad (Sirivaidyapong et al., 1999). En nuestro caso, y con espermatozoides EY de porcino, es posible que el lavado a través del gradiente de Percoll® no sea suficiente para eliminar los factores que recubren los receptores de progesterona y que por este motivo no haya una respuesta frente a ella o también podría ser para que éste tipo de espermatozoide presente una RA sería necesario la acción combinada de los dos agonistas fisiológicos, la P4 y la ZP. Wu et al. (2006), realizaron un estudio sobre las receptores de progesterona durante la capacitación y la incidencia de la RA inducida por progesterona y ZP en espermatozoides de verraco. Comprobaron que tanto la progesterona como la ZP eran capaces de inducir la RA de forma similar pero al inducirla con los dos agonistas a la vez se producía un incremento significativo de ésta.

## **Experiencia 2. Análisis de la interacción de gametos y fecundación**

### **Experimento 2-1. Evaluación de la unión espermatozoide-zona pelúcida**

**D**urante la capacitación, la superficie de la cabeza espermática sufre una remodelación, primero para unirse a la ZP, y posteriormente para poder experimentar la RA. Durante esta fase de remodelación, las proteínas espermáticas de unión a la ZP son modificadas funcionalmente de forma que solo emergen las de la zona apical de la membrana plasmática de la cabeza, siendo esta zona la única que está involucrada en la unión primaria a la ZP.

Las moléculas implicadas en la adhesión espermatozoide a la ZP no son del todo conocidas (Dean, 2004), pero parece ser específica de especie (Yanagimachi, 1994a). Entre las moléculas identificadas se encuentran

proteínas pertenecientes a la familia de las espermadhesinas (Töpfer-Petersen et al. 1998) y las proteínas del plasma seminal, como las descritas en la especie bovina (BSP) (Desnoyers y Manjunath, 1992). Estas proteínas presentan capacidad de unión a carbohidratos y heparina los cuales están implicados en la adhesión de los espermatozoides a las células del epitelio oviductal (Manásková et al., 2007).

Para que un espermatozoide *in vitro*, se pueda adherir a la ZP tiene que estar capacitado siendo necesaria, en la mayoría de los casos, la participación de bicarbonato/ $\text{Ca}^{2+}$ /albúmina durante la capacitación. Estas sustancias remodelan parte de la cubierta del espermatozoide (incluidos factores de decapitación) de forma que algunos factores son eliminados y otros factores de activación espermáticos son adsorbidos (revisado por Boerke et al., 2008). Por todo ello, nos planteamos utilizar la unión a la ZP como herramienta para evaluar la capacitación espermática. Además, pretendíamos estudiar solamente la unión primaria por lo que decidimos realizar un periodo de incubación corto (30 min) para evitar evaluar una unión secundaria, que en la mayoría de circunstancias necesita un periodo de cocultivo más largo (Harkema et al., 2004; Wu et al., 2006), y que culmina con la reacción acrosómica.

Al observar los resultados de unión de EP y EY a la ZP observamos que el número de espermatozoides unidos fue independiente del origen de los espermatozoides y solo se vio afectado si estos habían sido lavados e incubados en FOP. En cierto modo, que la unión a ZP sea prácticamente la misma independientemente del origen (EP y EY), es lógico y coincide con los datos previamente descritos en la bibliografía ya que la capacidad del espermatozoide para unirse a la ZP es adquirida durante el proceso de maduración en epidídimo. Entre los cambios más evidentes que acompaña a la maduración se encuentra la remodelación de la membrana plasmática del espermatozoide a través del intercambio y/o modificación de una gran cantidad de lípidos y proteínas.

La base molecular de estos eventos y su contribución a la adquisición de la afinidad de unión con la ZP aún no se han esclarecido totalmente, pero parece ser que, están temporalmente correlacionados con la aparición de estructuras macromoleculares en el lumen del epidídimo como son la unión a la membrana de epididimosomas y cuerpos densos cargados de moléculas chaperonas. Existen nuevas evidencias que sugieren que estas entidades se yuxtaponen o se acoplan con la membrana plasmática del espermatozoide y potencian la transferencia masiva de proteínas a la superficie de los espermatozoides incluyendo a aquellas implicadas en las interacciones espermatozoide-ovocito (revisado por Reid et al., 2011). Sin embargo, aunque no fuese estadísticamente significativo, resultó llamativo que los espermatozoides de EP se unieran en mayor medida que los EY. Creemos que esta situación se debe a la mayor viabilidad de los espermatozoides epididimarios, que como se ha descrito en experiencias anteriores poseen mayor estabilidad a lo largo del tiempo.

Se ha sugerido que la mayor unión de los espermatozoides a la ZP puede ser por la exposición, por la activación o por el incremento de la afinidad de estructuras existentes en la membrana plasmática del espermatozoide por las glicoproteínas de la ZP lo que en cierta medida explica que, los espermatozoides que previamente han estado en contacto con el plasma seminal y después son lavados en un medio capacitante, posean mayor capacidad de unión a la zona. Sin embargo, en nuestra experiencia los resultados son contrarios a los de la mayoría. Harkema et al. (2004) al estudiar la unión a ZP con espermatozoides de EP y EY observaron que la unión es mayor en EY, sin embargo a las 6 horas de cocultivo los resultados entre ambos tipos de espermatozoides se igualaban. Estos resultados no coinciden con los nuestros, no obstante hay que tener en cuenta que la metodología utilizada no era exactamente igual a la desarrollada en este trabajo ya que ellos utilizaron ZP solubilizadas, mientras que en nuestro caso fueron ovocitos con la ZP sin tratar. Lo que sí parece coincidir con nuestros resultados fue su conclusión final pues opina que los factores de la membrana plasmática del espermatozoide involucrados en la unión a la ZP no provienen del plasma seminal y que éstos no son un requisito para el éxito de la capacitación *in vitro*

---

que permita la unión posterior a la zona. Por otro lado, observó que el proceso de unión de los espermatozoides a la zona se acelera cuando los espermatozoides han estado en contacto con el plasma seminal. Este hecho podría ser debido a que factores del plasma como las proteínas del tipo BSP o el péptido promotor de la fertilidad (FPP), así como otros componentes que facilitan la capacitación e inhiben al RA espontánea (Green, 1993).

La interacción proteína-carbohidrato es considerada el principal mecanismo en la unión espermatozoide-ZP. Las proteínas de la ZP se encuentran glicosiladas por lo que las uniones tipo O o N de los oligosacáridos a las glicoproteínas es de gran importancia para esta unión. Además, se ha determinado un gran número de glicoenzimas (glicotransferasas y glicosidasas) involucradas en la unión con la ZP. Las espermadhesinas AWN y AQN-3 así como la P47 (lactaderina) SED-1 y la proteína de unión a fibronectina tipo II pB1 (pAIF) son las principales proteínas de unión a la zona (Ensslin et al., 1995). Estas proteínas tienen capacidad de unión con diferentes ligandos entre los que se encuentran los fosfolípidos y son producidas por el epitelio epididimario y por las glándulas accesorias, uniéndose a los fosfolípidos de la membrana plasmática. Esta unión sirve como factor estabilizador y preventivo de la RA de forma que, serán liberadas de la superficie del espermatozoide durante la capacitación (Dostálová et al., 1994).

AWN y AQN-3 actúan como moléculas de unión en la unión primaria a la ZP y se localizan sobre la membrana plasmática (región apical) del espermatozoide, por donde se une a la ZP. La P47, también participa en esta unión exponiéndose sobre la superficie que cubre el acrosoma pero solamente después de que el espermatozoide esté capacitado. No obstante, el tipo de interacción de esta proteína con la ZP aun no está totalmente demostrado (revisado por Töpfer-Petersen et al., 2008). En este trabajo observamos que la mayor unión a la zona se presentó en espermatozoides (tanto EY como EP) que no habían sido sometidos a lavados, por lo que mantienen todas las proteínas adsorbidas procedentes de las secreciones de las distintas regiones del epidídimo y glándulas accesorias. Por ello pensamos que simplemente al introducirlos en medio TALP (capacitante) debe ser suficiente para modificar

los fosfolípidos de membrana de manera que estas proteínas se pueden exponer y unirse a la ZP. Gadella y Harrison (2000) demostraron que tan solo 90 segundos de contacto de los espermatozoides con el bicarbonato eran suficientes para que se produjese el movimiento entre los fosfolípidos de la cara externa e interna de la membrana plasmática del espermatozoide. Además, hay que tener presente que en la interacción espermatozoide-ZP también participan los glicolípidos. El sulfogalactosilglicerolípido (SGG) es el principal sulfoglicolípidos en los espermatozoides de mamíferos. Se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática y se ha determinado que se encuentra involucrado en la unión del espermatozoide con la ZP (Weerachayanukul et al., 2001) y en la unión de la membrana plasmática del ovocito (White et al., 2000).

Un resultado interesante fue que al incubar los espermatozoides lavados con el FOP se produjese una disminución en el número de espermatozoides unidos a la ZP tanto para el caso de EY como de EP. En un estudio en la especie humana, Chiu et al. (2003), observaron que glicoproteínas presentes en el fluido folicular humano reducían la unión de los espermatozoides a la ZP. Concretamente fue una glicoproteína muy similar a la glicodelina-A a la que denominó ZIF-1. El plasma seminal también contiene un tipo específico de glicodelina, denominada como glicodelina-S. La glicodelina S y A son inmunológicamente similares, con idéntica estructura primaria, pero con diferente glicosilación. La glicodelina-S parece ser que no tiene actividad inhibitoria sobre la unión a la ZP (Seppälä et al., 2002), lo que sugiere que la glicosilación determina la actividad inhibitoria de las glicodelinas. Tanto la glicodelina ZIF-1 como la glicodelina-A se unen a la región del acrosoma del espermatozoide, lo cual dificulta la unión posterior del espermatozoide a la ZP. Sin embargo, el significado fisiológico de estas uniones e inhibiciones de unión a la zona es especulativo.

Por un lado, podría servir para reducir la incidencia de la fecundación polispermica y por otro para seleccionar espermatozoides con la mayor capacidad de unión a la zona para la fecundación. Otra posible explicación de la función de la ZIF-1 sería la de proteger al espermatozoide de una RA

---

prematura antes de la unión a la ZP. Aunque también podría ser que otros componentes del FOP se unan a la ZP y por ello dejan menos receptores para unión de los espermatozoides.

Funahashi y Day (1993) obtuvieron resultados similares a los nuestros con el uso del FOP. Ellos utilizaron FOP para estudiar distintos parámetros relacionados con la fecundación en porcino (unión a ZP, penetración y RA) y observaron que tanto la unión a ZP como la penetración disminuía al incubar los espermatozoides en el FOP. Sin embargo, lo atribuyeron a que se incrementaba la RA y, como se ha determinado espermatozoides con acrosoma intacto son capaces de unirse a la ZP más que los reaccionados (Funahashi y Day, 1993; Li et al., 2006). En nuestra experiencia en cambio, la RA no se vio afectada por la incubación de los espermatozoides en el FOP. Como hemos mencionado anteriormente, que el FOP no induzca la RA podría deberse al momento en el que se obtuvo el fluido. Se ha demostrado que la composición del FOP varía a lo largo del ciclo estral y sus efectos por lo tanto serán diferentes. Munuce et al. (2009) realizaron una experiencia bastante similar a la nuestra en la especie humana con la diferencia que ellos utilizaron las secreciones del cultivo *in vitro* de las células oviductales. Además, estudió los sitios de unión a manosa en el espermatozoide y la RA. Observaron que los espermatozoides disminuían su capacidad de unión a la ZP si eran incubados en este medio condicionado y era debido a una disminución de la expresión de los sitios de unión sobre la superficie espermática correlacionándose positivamente con la concentración de proteína en el medio, sin embargo la RA no se vio afectada (Munuce et al., 2009).

Se ha sugerido que como el bicarbonato estimula la motilidad a través de una vía de transducción de señales que implica la activación de la sAC, y la posterior fosforilación de proteínas (Holt y Harrison, 2002; Wennemuth et al., 2003; Harrison, 2004), puede que el fluido oviductal contenga componentes capaces de suprimir esta vía en una proporción considerable de espermatozoides. A Coy et al., 2010, la incubación de los espermatozoides en FOP incrementaba la unión a la zona a pesar que le disminuía la motilidad. Estos resultados podrían atribuirse a que estos autores utilizaron FOP

---

procedente de cerdas prepúberes en fases ovulatorias diferentes a la nuestra y a que la unión de los espermatozoides a la zona la evaluaron a las 16-18 horas del cocultivo.

### **Experimento 2-2. Evaluación de la fecundación (ICSI): activación y formación pronuclear**

Una vez que comprobamos que el tratamiento espermático modificaba la unión de los espermatozoides a la zona, nos planteamos estudiar si el origen de los espermatozoides y los lavados e incubación de éstos en el fluido oviductal era importante para los procesos que ocurren tras la fecundación, la activación del ovocito, la descondensación de la cromatina del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino. Por ello, decidimos utilizar la ICSI de manera que obviáramos aquellos eventos que se tienen que producir previamente (RA, atravesar la ZP y fusión de membranas) y que de alguna forma nos podrían modificar el efecto que deseábamos estudiar.

En condiciones fisiológicas la fusión de las membranas de ambos gametos desencadena la activación del ovocito mediante una cascada de señales de transducción que darán lugar al cigoto diploide (Yanagimachi, 1994a). La activación se puede definir como una serie de cambios celulares que son inducidos por el espermatozoide en el ovocito que producen la reanudación de la meiosis y la posterior transformación del ovocito en un embrión capaz de desarrollarse (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). Entre los segundos mensajeros y proteínas efectoras responsables de la activación del ovocito encontramos el  $\text{Ca}^{2+}$ , Inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) y sn-1,2 diacylglycerol (DAG).

El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocurre entre los tres primeros min de la fusión de membranas y se presenta como en oleadas desde la entrada espermática (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). La primera entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es seguida por una serie de cortas entradas de elevada amplitud. Este

---

aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la reanudación de la meiosis. El  $\text{IP}_3$  también se conoce como segundo mensajero en la activación del ovocito. La hidrólisis de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) gracias a la acción de una fosfolipasa específica (PLC) da lugar a la formación de  $\text{IP}_3$  y DAG y éste último activa una proteína kinasa C (PKC) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La generación de  $\text{IP}_3$  es fundamental para el inicio de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , mecanismo por el cual se producirá la activación del ovocito tras la fecundación. En el espermatozoide ha sido determinado un factor que penetra en el ovocito durante la fecundación (sensible a calor y proteasas) responsable de la generación de  $\text{IP}_3$  y de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este factor parece ser una isoforma de fosfolipasa C a la que se le denominó PLCz (Yoneda et al., 2006).

Al evaluar los datos de activación del núcleo femenino observamos que para el grupo EP no hubo diferencias significativas según el tratamiento utilizado. En el grupo EY observamos un aumento significativo del grado de activación en el grupo L-FOP con respecto al grupo C, mientras que el grupo L no difiere de ambos. Cuando analizamos los 2 grupos de espermatozoides (EP y EY) conjuntamente, observamos que el grado de activación aumentó estadísticamente cuando se utilizaron espermatozoides EY-L y L-FOP con respecto a todos los grupos de EP, mientras que el grupo EY-C permaneció en una situación intermedia.

Esta aceptado que la PLCz es un factor activador del ovocito (Kashir et al., 2010). Por otro lado los espermatozoides lavados a través de gradientes de densidad como el de Percoll® incrementan la cantidad de PLCz al eliminar aquellas células con membranas dañadas y restos de detritus celulares, por esta razón cuando los espermatozoides son congelados y descongelados (proceso que daña las membranas espermáticas), la cantidad de esta proteína desciende (Kashir et al., 2011). En este trabajo, los espermatozoides fueron seleccionados mediante un gradiente de Percoll® (elimina espermatozoides dañados) y posteriormente los incubamos en FOP (mantiene la viabilidad) y por tanto podría ser que estas células presentaran mayor cantidad de PLCz y por ello en la activación de los ovocitos inyectados con espermatozoides lavados

fuese mayor respecto del control. Sin embargo, otros estudios en los que también utilizaron espermatozoides congelados/descongelados, lavados en Percoll o incubados en PBS con suero fetal bovino no encontraron diferencias en cuanto a la activación del ovocito entre los distintos grupos experimentales (García-Roselló et al., 2006). Esta discrepancia en los resultados podría deberse a que estos autores analizaban la activación y formación del pronúcleo a las 16-18 horas tras la inyección del espermatozoide y puede que las diferencias posibles de activación entre grupos se hubiesen enmascarado por el tiempo de incubación en el medio (TALP) el cual posee elevadas cantidades de  $Ca^{2+}$ .

Nakai et al. (2011) trataron los espermatozoides antes de la ICSI por diversos métodos para romper sus membranas (sonicación, Triton-X100 y tres ciclos de congelación y descongelación) y estudiar el efecto que ello tenía sobre la formación de los pronúcleos. Observaron que los ovocitos inyectados con el espermatozoide completo presentan mayores tasas de formación de pronúcleos que los ovocitos inyectados con espermatozoides rotos. La explicación la encontraron en que la cantidad PLCz era menor en los espermatozoides tratados. Además, determinaron que esta fosfolipasa se encontraba en la región postacrosomal y en la cola por lo que, en la especie porcina podría ser beneficiosa la inyección de espermatozoides completos para la activación del ovocito. No obstante, estos autores no estudiaron el posible efecto que puede tener la capacitación espermática sobre la activación ovocitaria.

Una vez que el espermatozoide se encuentra en el interior del ovocito, se produce la separación de la cola de la cabeza espermática y se inicia la formación del pronúcleo masculino. Seguidamente comienza la desintegración de la membrana nuclear del espermatozoide de forma que la cromatina queda expuesta directamente al citoplasma del ovocito. Esta cromatina sufre un proceso de descondensación mediante la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas y es llevado a cabo por el glutatión reducido presente en el ooplasma del ovocito (Yanagimachi, 1994c). Posteriormente comienza la

sustitución de protaminas por histonas y se forma una nueva envoltura nuclear dando lugar al pronúcleo masculino (revisado por García-Roselló, 2005).

En estudios sobre FIV en la especie porcina se ha demostrado que los tratamientos espermáticos previos a la FIV, aceleran la descondensación espermática, la formación del pronúcleo y mejoran la formación de blastocistos (Matás et al., 2003). Este hecho parece deberse a que el tratamiento espermático acorta el tiempo requerido para que un espermatozoide sea capaz de penetrar al ovocito y por ello, la formación del pronúcleo se adelanta respecto de aquellos espermatozoides no tratados. Matás et al. (2003) observaron que espermatozoides lavados en gradientes de Percoll® eran capaces de formar el pronúcleo masculino con 4 horas de cocultivo frente a las 8 horas necesarias con espermatozoides sin lavar.

Posteriormente, estos autores también estudiaron el efecto del lavado en espermatozoides de EP y EY sobre el tiempo necesario para que se produzca la penetración, pero redujeron aún más el tiempo de cocultivo (2 y 4 horas). Observaron también que los lavados espermáticos no afectaban a la velocidad de penetración de los ovocitos con espermatozoides epididimarios y que los eyaculados lavados en Percoll eran más rápidos en penetrar (Matás et al, 2010). En el presente trabajo nos planteamos si, además de acelerar la penetración espermática en el ovocito, los tratamientos y/o el origen de los espermatozoides tenían influencia en la descondensación de la cromatina y en la formación del pronúcleo tras la ICSI.

Nuestros resultados nos mostraron que el tratamiento espermático (lavado e incubación en FOP) mejoraba la descondensación espermática tanto en espermatozoides de EP como de EY. No obstante, el grado de descondensación de éstos últimos fue siempre superior al de los del grupo EP.

Los lavados espermáticos modifican las membranas del espermatozoide haciéndolas menos estables y las preparan para que se produzca la fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa experimentando así la reacción acrosómica. Por otra parte, el FOP es un

modulador de la capacitación (Rodríguez-Martínez et al., 2001), en su composición aparecen sustancias que regulan y facilitan la capacitación, encontrándose presentes durante la fecundación. Por tanto, parece lógico que también regule ciertos procesos bioquímicos en los espermatozoides que afecten posteriormente a la descondensación de la cromatina y la formación del pronúcleo, aunque por vías aún no determinadas. El mayor grado de descondensación que encontramos en los espermatozoides eyaculados lavados (EY-L), podría deberse por un lado, a la eliminación de ciertos componentes del plasma seminal proporcionado por la glándulas accesorias como es el caso del  $Zn^{2+}$ ,. Este ión estabiliza la cromatina del núcleo espermático (como hemos mencionado en secciones anteriores) mediante uniones a los grupos S de los aminoácidos de las protaminas estabilizando la estructura cuaternaria. Cuando es eliminado (al lavar los espermatozoides) se facilita la ruptura de estas uniones S-S y favorece o posibilita la descondensación de la cromatina (revisado por Molina et al., 1995).

Katayama et al., (2002) inyectaron espermatozoides lavados en Percoll y fijaron los ovocitos a las 3, 6, 9 y 15h post inyección; los resultados de activación del ovocito fueron desde 24 a 77% según el tiempo analizado. En cuanto a la activación del núcleo masculino (0% a las 3 h, 18% a las 6 h, 41% a las 9 y 73% a las 15h) fueron más bajos que los nuestros. Puede que estas diferencias se deban a la deficiente calidad en la maduración de sus ovocitos (tal y como ellos opinan), aunque también podría deberse a una diferente manipulación de los espermatozoides, ya que la ICSI es una técnica que requiere de un aparataje sofisticado y una alta capacitación técnica de la persona que la esté realizando, lo cual son dos hechos que podrían modificar enormemente los resultados. Un año más tarde, Lee et al. (2003) realizaron un estudio sobre la activación del ovocito y la descondensación del espermatozoide utilizando semen congelado. Sus resultados mostraron que con este tipo de espermatozoide se facilita la activación del ovocito ya que, según ellos, se facilita la liberación del factor espermático, sin embargo obtuvo baja descondensación y formación de pronúcleos. Este hecho lo atribuyó a problemas de maduración ovocitaria aunque no descartó la posibilidad de que fuese debido a anomalías en la cromatina de los espermatozoides

congelados-descongelados en los que se ha determinado que éste proceso induce a ciertas alteraciones en el momento de la modificación de la cabeza espermática (Perry et al., 1999). Lo importante de este estudio fue que determinó que la activación del ovocito y la descondensación del espermatozoide son procesos independientes.

La preparación espermática para ICSI no parece ser de suma importancia en las etapas iniciales que tienen lugar después de la inyección espermática y que conducen a la primera división pero sí tiene profundos efectos sobre el desarrollo posterior. El momento de la primera división parece ser una señal importante para el desarrollo del embrión más allá de la etapa de dos células y, en particular, para el desarrollo post-implantacional. En este sentido se ha demostrado que en ausencia de membranas espermáticas (acrosoma) los cambios que tienen lugar después de la inyección espermática se producen más rápidamente y con consecuencias de largo alcance (revisado por Roldan, 2006). Aunque no ha sido motivo de nuestro estudio determinar si los tratamientos espermáticos mejoran el rendimiento de la ICSI, de los resultados se desprende que los cambios que ocurren en el espermatozoide tratado e incubado en FOP son responsables de una mayor activación y formación de pronúcleo. Los motivos se podrían deber a que la selección de la población espermática posea mayor cantidad de PLCz para activar al ovocito de forma adecuada y que además presente una cromatina capaz de descondensarse en el momento apropiado, lo que resulta en una mayor sincronía en la formación de los pronúcleos femenino y masculino. Todos estos hechos, indudablemente conllevan a un mejor desarrollo embrionario posterior. Por tanto, la capacitación espermática, aunque no sea un proceso necesario para el desarrollo embrionario mediante ICSI, sí que mejora el rendimiento de ésta técnica.

---

### **Experiencia 3. Análisis de la fosforilación de la tirosina mediante Western blot (WB) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La fosforilación/defosforilación de las proteínas se encuentra implicada en la regulación de diferentes funciones celulares como la regulación del crecimiento, proceso de adhesión celular, cambios en el citoesqueleto, control del ciclo celular o exocitosis (Aplin y Juliano, 1999; Schlaepfer et al., 1999; Hubbard y Till, 2000). La adición y/o eliminación de los grupos fosfato a aminoácidos de distintas proteínas es un mecanismo que tiene como resultado la producción de cambios conformacionales de dichas proteínas que conducen a su activación o inactivación.

La fosforilación de las proteínas puede ocurrir en los residuos de serina, treonina y tirosina. Sin embargo, la más ampliamente descrita y estudiada ha sido la fosforilación en tirosina (PT), ya que puede ser el primer indicador de las vías de señalización de transducción en las células (Naz y Rajesh, 2004). En espermatozoides y durante la maduración se producen fenómenos de fosforilación/defosforilación de proteínas durante la capacitación, la hipermotilidad y la reacción acrosómica, procesos que serán indispensables para que el espermatozoide pueda alcanzar y penetrar al ovocito (Galantino-Homer et al., 1997).

Visconti et al., (1995ab) fueron los primeros en encontrar una correlación entre el estado de capacitación espermática y la fosforilación de la tirosina en espermatozoides epididimarios de ratón. A partir de estos estudios, se publicaron diversos trabajos relacionando la capacitación espermática con la fosforilación de la tirosina en diferentes mamíferos como el hombre, toro, cerdo, mono y hámster. Los datos obtenidos en estos trabajos mostraron que el incremento de la fosforilación de la tirosina asociada a la capacitación es especie-específica, ya que diferentes constituyentes de los medios de capacitación como  $\text{Ca}^{2+}$ , BSA y bicarbonato tienen diferentes efectos según la especie. Aunque a día de hoy no se puede decir que el aumento de la fosforilación de tirosina sea una causa o una consecuencia de la capacitación.

si es considerada como uno de los cambios moleculares más importantes para el estudio de dicho proceso. La identificación y la caracterización de las fosfoproteínas es importante para conocer las bases moleculares del proceso de capacitación. Actualmente el número de proteínas involucradas en la fosforilación durante la capacitación es elevado, sin embargo, solo unas pocas de ellas han sido caracterizadas.

El objetivo de esta experiencia fue evaluar la fosforilación de tirosina en nuestros grupos experimentales bajo determinadas condiciones como: ausencia/presencia de BSA, FOP y el tiempo de incubación. La fosforilación fue evaluada, según los experimentos, mediante WB e IFI.

**Experimento 3-1, 3-2 y 3-3. Efecto de la incubación espermática con BSA, FOP y efecto del tiempo de incubación sobre la fosforilación de la tirosina (PT) evaluados mediante WB.**

**E**n varias especies de mamíferos la PT ha sido correlacionada con el estado de capacitación del espermatozoide (Visconti et al. 1995, 1999; Tardif et al. 2001; Pommer et al. 2003; Grasa et al. 2006). Dichos autores observaron un incremento tiempo-dependiente en la PT de varias proteínas específicas en rangos moleculares de 40-120 kDa, con el estado de capacitación de los espermatozoides y parece ser un prerequisite para que un espermatozoide sea capaz de fecundar (Urner et al., 2001).

En este experimento hemos demostrado diferentes patrones de fosforilación de tirosina mediante WB según el origen espermático, tratamiento y tiempo de incubación. En los espermatozoides eyaculados las proteínas denominadas p60, p44 y p42 se encuentran fosforiladas en tirosina en un nivel similar en todos los experimentos realizados según tiempo, composición del medio o tratamiento; la p175, p100, p32, p25 y p20 se encuentran fosforiladas en respuesta a la incubación en medio capacitante (grupo L) y/o FOP.

En relación a los espermatozoides epididimarios la p44, p42, p25 y p20 son fosforiladas en tirosina en un nivel similar en todos los experimentos

---

realizados. La p32 se encuentra fosforilada cuando los espermatozoides eran incubados en un medio capacitante (con  $\text{Ca}^{2+}$ , bicarbonato) y/o FOP.

La capacitación del espermatozoide porcino se asocia con la fosforilación de determinadas proteínas y la redistribución de los residuos de fosfotirosina hacia el acrosoma (IFI). Los diferentes patrones de fosforilación de las proteínas espermáticas entre los espermatozoides incubados en medio no capacitante (grupo control) o en medio capacitante sugieren que la fosforilación de la proteína juega un papel importante en la capacitación porcina. Durante varios años se ha conocido la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en los espermatozoides porcinos con pesos moleculares muy similares a los descritos en este estudio (Berruti y Martegani, 1989); estos resultados han sido también demostrados en publicaciones más recientes (Kalab et al., 1998; Tardif et al., 2001; Tardif et al., 2003). Aunque bien es cierto que la función exacta de dichas proteínas aun no está del todo clara.

Tal y como han descrito otros autores (Tardif et al., 2001; Bravo et al., 2005) y al igual que los resultados obtenidos en este trabajo, antes de la capacitación se encuentran fosforilados algunos residuos de tirosina en diferentes grados como son las bandas de 60, 42 y 40 kDa en el caso del EP y EY. Cuando los espermatozoides son sometidos al proceso de capacitación a través de lavados y/o incubación con FOP, aparecen otras bandas fosforiladas o se modifica la intensidad de las mismas. Para el caso de los espermatozoides de EP, aparece una mayor fosforilación de las bandas de 32, 27 y 20 kDa. En el caso de espermatozoides EY, en los grupos L y FOP se fosforilan las bandas de 32, 27 y 20 kDa con respecto al grupo C. Berruti y Martegani (1989) compararon la reactividad a fosfotirosina de espermatozoides eyaculados y epididimarios. Observando proteínas reactivas con pesos moleculares p43, p40 y p36 en ambos casos. Estas proteínas podrían corresponderse con las encontradas en nuestro trabajo, coincidentes en ambos casos (EP y EY) con la p44, p42 y p36. Pero cuando dichos autores utilizaron espermatozoides de la cabeza del epidídimo, estas proteínas no se encontraban fosforiladas.

---

Según Tardif et al. (2001) la proteína fosforilada en tirosina con un peso molecular de 32 kDa, denominada p32, es un indicativo de capacitación espermática en la especie porcina. Aunque, tal y como indican dichos autores, la presencia de p32 ligeramente fosforilada en espermatozoides no incubados en medio capacitante puede ser indicativo de capacitaciones espontáneas. Además, la fosforilación de la tirosina p32 puede ocurrir algunas veces durante o antes de completarse la capacitación (Tardif et al., 2001). En 1999, Flesch et al., observaron la presencia de una proteína fosforilada en tirosina de 34 kDa, la cual podría ser aquella descrita por Tardif et al. 2001. Por el contrario, Kalab et al. (1998) observaron que las proteínas p34, p38, p40 y p44 se encontraban fosforiladas. La p34 identificada por estos autores es probablemente, la misma descrita por Flesch et al. (1999) y Tardif et al. (2001).

Al igual que nuestros resultados Kalab et al. (1998), no encontraron diferencias en la fosforilación de la tirosina cuando incubaron los espermatozoides en presencia o ausencia de BSA. Bailey et al. (2005) propusieron que la aparición de la p32 dependía de la presencia de  $Ca^{2+}$  pero no de la BSA ni del bicarbonato.

Tardif et al. (2003) concluyeron que la fosforilación de la p32 tiene lugar, pero no es un requisito para la capacitación del espermatozoide porcino, aunque la capacitación siempre ocurre cuando esta banda está fosforilada. En otro estudio llevado a cabo por Bravo et al. en el 2005, encuentran una correlación positiva entre el estado de capacitación y la fosforilación en tirosina de p32 en espermatozoides porcinos, considerando dos posibles explicaciones para este hecho: (i) un incremento en la fosfotirosina de la p32 es necesario o interviene en la capacitación del espermatozoide de cerdo; (ii) la fosforilación de tirosina de p32 y el estado de capacitación se encuentran regulados bajo las mismas vías intracelulares.

En los trabajos previos de Tardif et al. (2001, 2004) mostraron que el proceso de capacitación es un proceso más o menos largo en el tiempo (2-4 h). Pero en nuestros resultados hemos observado que la fosforilación de la tirosina puede ocurrir justo tras el lavado espermático con gradientes de Percoll® e

incubación en TALP (grupos L y 0h). Los lavados de Percoll® pueden ser suficientes para permitir una fosforilación prematura de la proteína p32, posiblemente mediante la eliminación de los factores decapacitantes que rodean la membrana espermática. Los espermatozoides de porcino recién eyaculados y lavados a través de gradientes de Percoll® son capaces de penetrar los ovocitos, sugiriendo que los espermatozoides se encuentran capacitados (Berger y Horton, 1988).

La capacitación, tanto *in vivo* como *in vitro*, es un proceso lento (Yanagimachi, 1994b). La p32 se encuentra más fosforilada conforme mayor es el tiempo de incubación (4h-EP y 3h-EY). Shadan et al., en 2004 al incubar espermatozoides epididimarios porcinos durante 3h en medio TALP, encontraron los mismos patrones de fosforilación que en nuestros resultados.

La membrana plasmática del espermatozoide sufre diversas remodelaciones durante su maduración epididimaria, especialmente en el contenido de fosfolípidos, esteroides y glicoproteínas extrínsecas (Jones, 1998). Además, el fluido epididimario contiene proteínas de unión a esteroides (Kirchhoff et al. 1996; Okamura et al. 1999), las cuales son reservorios de intercambio de colesterol con la membrana plasmática del espermatozoide. Es importante que el espermatozoide no se capacite o reaccione prematuramente en el epidídimo, manteniendo altos niveles de colesterol en la membrana plasmática, siendo un factor decapacitante hasta la exposición de aceptores de colesterol en el tracto reproductivo de la hembra. Es por este hecho que en los espermatozoides epididimarios no se vean cambios evidentes en el patrón de fosforilación hasta las 4h de incubación con medio capacitante.

Otro aspecto importante observado en nuestros resultados ha sido la presencia de fosforilación en la banda de 20 kDa en todos los grupos experimentales excepto para el grupo EY-C. En el momento de la eyaculación los espermatozoides procedentes del epidídimo se mezclan con el plasma seminal de las glándulas accesorias, este plasma seminal contiene factores que previenen la capacitación del espermatozoide previo a su llegada al lugar de fecundación (Dukelow et al., 1967; Oliphant et al., 1985; Fraser et al., 1990).

---

En nuestros experimentos hemos utilizado espermatozoides EP (sin plasma seminal) y espermatozoides EY (en contacto con el plasma seminal), los cuales se han sometido a lavados de Percoll® eliminando estos factores decapacitantes anteriormente mencionados, excepto para el grupo C. Esta podría ser una de las causas de la aparición de la proteína de 20 kDa fosforilada en todos los grupos excepto en el EY-C. Kalab et al. (1998), mostraron que la p20 y la p93 no se fosforilaban en espermatozoides de porcino eyaculados incubados en un medio no capacitante. Además, la intensidad de la fosforilación es mayor en los espermatozoides de EP que EY, sugiriendo la presencia en el fluido epididimario de algunos componentes que estimulan la fosforilación de dichas proteínas. Cuando se adiciona plasma seminal porcino a espermatozoides epididimarios se produce una inhibición de la capacitación (Lusignan et al. 2007). Además, en otros estudios (Harayama et al. 1999; Suzuki et al. 2002; Vadnais et al. 2005) al adicionar plasma seminal a espermatozoides eyaculados lavados también se prevenía la capacitación.

El hecho de que no encontremos grandes diferencias en relación con los niveles de fosforilación entre los grupos L y L-FOP podría deberse a que, tal y como ocurre en el oviducto, el FOP actúa como un modulador de la capacitación manteniendo a los espermatozoides en un estado de “baja capacitación” (Tienthai et al., 2004; Zumoffen et al., 2010). La interacción entre el espermatozoide y el oviducto es un mecanismo por el cual los espermatozoides pueden permanecer en el oviducto por un tiempo, permitiendo de este modo la selección espermática. Tejeiro et al. (2008) mostraron que cuando los espermatozoides eran capacitados e incubados con la proteína SBG, la cual se encuentra presente en las células epiteliales oviductales, el patrón de fosforilación de tirosina solo se veía modificado en una banda con un peso molecular de 97 kDa.

La denominada p60 aparece, en todos los grupos experimentales, ligeramente fosforilada excepto en el grupo EP-L donde no se fosforila. Kalab et al. (1998), encontraron la fosforilación inconsistente de una proteína p55 que pudiera corresponder con la p60 de nuestro trabajo. La fosforilación de tirosina de la proteína p60 actúa, en el caso de los espermatozoides

eyaculados de la misma manera que p20, aumentando su intensidad tras el lavado espermático, tal y como han mostrado otros autores.

Se ha comprobado en este y en otros estudios la fosforilación de la tirosina en espermatozoides bajo determinadas condiciones de incubación, pero todavía son necesarios realizar más estudios para conocer el papel fisiológico exacto que juega la fosforilación de la tirosina en la fisiología del espermatozoide porcino.

#### **Experimento 3-4. Localización de la fosforilación de la tirosina en espermatozoides mediante (IFI)**

En general, la fosforilación en proteínas ha sido estudiada en poblaciones espermáticas durante la capacitación y después de la exposición a inductores de la RA mediante WB. Este enfoque ha llevado a la acumulación de información sobre el peso molecular de proteínas fosforiladas y su regulación durante la capacitación y RA. En células individuales también ha sido examinada la fosforilación de proteínas espermáticas mediante inmunocitoquímica y ésta técnica ha revelado la compartimentalización de fosfoproteínas así como la heterogeneidad en las poblaciones espermáticas. El conocimiento de los patrones de fosforilación en espermatozoides y su regulación durante la interacción de gametos es uno de los temas más importantes en este área de investigación haciéndose necesario diferenciar la localización de las proteínas fosforiladas en los espermatozoides para entender la relación entre éstas y la correspondiente función espermática que regulan (Urner y Sakkas 2003).

La PT de proteínas espermáticas ha sido localizada principalmente a nivel del flagelo, estando relacionada la fosforilación de la pieza principal con la adquisición de la hipermotilidad (Nassar et al., 1999; Petrunkina et al., 2003a). Además, la localización de determinadas proteínas fosforiladas en el área acrosomal pueden estar relacionadas con la interacción con la ZP y la penetración (Dube et al. 2005). También se ha descrito la aparición de un área triangular dentro del segmento ecuatorial en la unión con la zona

---

postacrosomal, “el segmento subecuatorial”. Éste presenta proteínas fosforiladas en residuos en tirosina, las cuales podrían jugar un papel clave como centro organizador de ensamblaje de complejos multi-moleculares mediando en la fusión de gametos y en la reacción acrosómica (Jones et al. 2008).

En este trabajo, para estudiar como afectaban los tratamientos espermáticos de capacitación sobre la PT en proteínas, agrupamos los distintos patrones en cuatro categorías atendiendo a la localización de la fluorescencia. Aunque existen grandes diferencias entre especies en cuanto a la distribución de la localización de la PT, la mayoría de autores coinciden con la clasificación realizada en este trabajo (Urner y Sakkas, 2003).

En el grupo I, incluimos los espermatozoides que no presentaban fluorescencia en la zona subecuatorial, espermatozoides sin ningún tipo de fluorescencia y/o fluorescencia muy baja y los consideramos como no capacitados. En el grupo II agrupamos a los espermatozoides que tenían fluorescencia en la región subecuatorial considerándolos que habían iniciado el proceso de capacitación (espermatozoides capacitados presentan esta región fosforilada). En el grupo III incluimos a aquellos espermatozoides que además del presentar la región subecuatorial fosforilada, también presentaban el acrosoma, lo cual lo consideramos como una etapa más avanzada de la capacitación. Finalmente, dada la importancia de la PT en la cola espermática, realizamos un cuarto grupo atendiendo solamente a la localización de la PT en esta zona independientemente del resto de regiones fosforiladas.

Durante el transcurso de la capacitación, la PT se localiza principalmente en el flagelo y a nivel de la pieza intermedia (Urner et al. 2003) en los estadios más incipientes. Posteriormente, en estadios más avanzados también aparece fosforilada el área acrosomal, como ha sido observada en espermatozoides de las especies porcina y canina (Petrunkina et al. 2001a, 2003a). En el cerdo, el toro o el carnero se describe la fosforilación de la zona ecuatorial con diferente morfología, encontrándola alargada en el primero, semicircular en el segundo y rectangular en el último. En el ratón o la rata esta porción también se puede

localizar, aunque en una proporción muy baja de espermatozoides (Jones et al. 2008). En el hombre se destaca la necesidad de fosforilación de la región del cuello y la pieza intermedia para poder fecundar (Sakkas et al. 2003). Como podemos observar en estos estudios, el patrón de localización de la fosforilación de tirosina es dependiente de la especie.

A pesar de la variedad de estudios realizados sobre la localización de la PT en las distintas especies y su significado funcional, en la bibliografía no hemos encontrado estudios que comparen la localización de la PT tras ser sometidos a un sistema de capacitación en espermatozoides epididimarios y eyaculados. Según observamos en los resultados, los espermatozoides procedentes de EP y EY no presentan el mismo patrón de fosforilación. Para el caso de EP, la PT siempre fue mayor que para EY. Como hemos mencionado anteriormente la PT de proteínas se encuentra relacionada con multitud de funciones celulares (Hunter, 2000; Pawson, 2004) además de la capacitación. La fosforilación que aparece en los espermatozoides de EP puede deberse a otros fenómenos de señalización que no se encuentren relacionados con la capacitación. Hay autores que sugieren que el significado de la PT en la cabeza no está relacionado con la capacitación sino que es una característica de espermatozoides inmaduros (Lewis y Aitken, 2001).

Después de los lavados, se incrementó la fluorescencia tanto en EP como en EY, aunque la distribución de la PT difirió entre los grupos experimentales. Si observamos solamente espermatozoides con fluorescencia en la región subecuatorial (grupo II), comprobamos que para EP este tipo de patrón sufría una brusca disminución mientras que para EY era todo lo contrario. Al lavar los espermatozoides de EP, que ya presentaban alto grado de fosforilación en la región subecuatorial, se incrementaba la PT de las proteínas de la región acrosomal pero el tiempo de incubación no modificaba esta distribución. Sin embargo, para los espermatozoides EY además del lavado para que se produjese la PT en la región subecuatorial, fue necesario incubarlos en dicho medio para que tuviera lugar la PT en la región acrosomal (grupo III). Este hecho lo podemos atribuir al efecto estabilizador del plasma seminal ya que, como se ha venido comentando a lo largo de este trabajo,

---

contiene diversas proteínas que actúan como factores decapacitantes y que podrían actuar previniendo la PT en proteínas bien por impedir la activación de las fosfo-kinasas o bien mediante la activación de fosfatasas que revierten la PT.

Urner et al. (2001) observaron que la PT se produce de forma espontánea en espermatozoides cuando se diluyen en un medio de cultivo “*in vitro*” que induzca la capacitación y cuando se ha eliminado del plasma seminal. En nuestra experiencia al lavar los espermatozoides y eliminar el plasma seminal, se producía la PT como consecuencia de la resuspensión de los espermatozoides en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato, que son factores necesarios y relacionados con la activación de las kinasas (Visconti, 2008). En cualquier caso, los componentes del plasma que actúan previniendo la PT y que tienen su origen en la secreción epididimaria deben ser escasos en comparación a los producidos por las glándulas accesorias, ya que los espermatozoides EY necesitaron tanto el lavado como la incubación en el medio de capacitación para que se incrementara la PT en la región acrosomal. Sin embargo, a pesar del lavado y la incubación en el medio de capacitación nunca llegó a los niveles de PT observados en los espermatozoides de EP.

Tanto en espermatozoides EY como EP observamos que se incrementaba la PT en la cabeza espermática cuando eran resuspendidos en el medio capacitante. El movimiento de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide conduce a la alteración de la arquitectura de ésta y es un proceso inducido por el bicarbonato, cuya consecuencia principal es un aumento de la actividad de la escramblasa (Gadella et al. 2000). Los rápidos efectos del bicarbonato sobre el espermatozoide del cerdo, alterando la arquitectura de la membrana plasmática (Harrison et al. 1996) e incrementando la motilidad progresiva (Holt et al. 2002), son mediados a través de la estimulación que provoca éste sobre la actividad de la sAC. El resultado es un aumento en los niveles de AMPc en la célula espermática (Harrison et al. 2000) activándose tras ello la PKA dependiente de AMPc que va a fosforilar distintas proteínas, muchas de ellas aún desconocidas, iniciándose así varias rutas de señalización (Harrison, 2004).

---

La respuesta espermática al  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  es extremadamente rápida siendo los niveles de AMPc máximos a los 60 segundos (Harrison et al. 2000) y el incremento en la fosforilación de proteínas dependiente de la PKA a los 90 segundos (Harrison, 2004). Estos niveles de AMPc disminuyen después de aproximadamente 7 min, y vuelven a recuperarse aunque más lentamente. Una explicación a este “rebote” en los niveles de AMPc, podría ser el hecho de la existencia de un mecanismo de *feedback* mediante el cual, la PKA fosforila a fosfodiesterasas que disminuyen la actividad del AMPc (Mehats et al., 2002). Además, este proceso es reversible, al menos a corto plazo (Harrison, 1996). Barboneti et al. (2010) observaron que al incubar los espermatozoides en un medio capacitante durante 1 hora se fosforilaban las proteínas de la cabeza espermática y la adición de plasma seminal inhibía esta fosforilación.

Jones et al. (2007) identificaron mediante microscopia de fuerza atómica una región dentro del segmento ecuatorial de espermatozoides bovinos, porcinos y ovinos rica en proteínas fosforiladas, tanto en espermatozoides eyaculados como de la cola del epidídimo. Además, estos resultados los confirmaron mediante tinción con el anticuerpo 4G10 que es específico para residuos fosfotirosina. En porcino, esta región también se marca con anticuerpos anti-Hsp70. Previamente al trabajo de Jones antes mencionado, Spinaci et al. (2005) evaluaron la presencia y distribución de la Hsp70 en espermatozoides porcinos eyaculados, capacitados y reaccionados. Observaron que la Hsp70 está presente sobre el espermatozoide con una redistribución dinámica durante la capacitación y RA. Durante la capacitación, Hsp70, sufre una migración lateral y reorganización y esta redistribución es un evento temprano y progresivo característico del proceso de capacitación. Después de la RA, la Hsp70 parece difundir a una gruesa banda subecuatorial.

Al estudiar el efecto de FOP sobre la PT en espermatozoides lavados observamos que se revertía el proceso de capacitación ya que se producía una defosforilación de la región acrosomal tanto en EP como en EY. Se producía un descenso en el grupo III (acrosoma y región subecuatorial fosforilada) y un incremento del grupo II (solo fosforilada la región subecuatorial). Es conocido que la interacción espermatozoide-células del oviducto *in vitro* modifica tanto la

---

PT de las proteínas como la capacitación. La unión de los espermatozoides a las células del epitelio oviductal suprime la PT en la región de la cabeza y, al parecer, este hecho ayuda a la sincronización de la función espermática con el momento de la ovulación. Petrunkina et al. (2003) estudiaron el efecto de las células del oviducto sobre la PT de las proteínas espermáticas *in vitro* y observaron que se incrementaba el porcentaje de espermatozoides con PT en la cabeza en los espermatozoides que no se unían a las células epiteliales del oviducto y era un proceso tiempo-dependiente.

En este trabajo no hemos evaluado el efecto de las células oviductales sobre la PT de las proteínas espermáticas. No obstante la secreción de las células epiteliales del oviducto forma parte de la composición del fluido oviductal. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a aquellos obtenidos por estos autores (Petrunkina et al., 2003). También se ha sugerido que algunas proteínas del fluido oviductal se encuentran involucradas en la modulación de la funcionalidad espermática y en su capacidad para fecundar (O'Day-Bowman et al. 1996; McCauley et al. 2003; Quintero et al. 2005; Brewis y Gadella, 2009). En un estudio de Quintero et al. (2005) demostraron la secreción de proteínas *de novo* en un medio condicionado producido por cultivos de células oviductales. Munuce et al., (2009) determinaron que las proteínas producidas por las células oviductales cultivadas *in vitro* disminuía la afinidad de los espermatozoides por la ZP. Finalmente, Zumoffen et al. (2010) observaron que estas proteínas inhiben la PT de las proteínas de la cabeza espermática y que este proceso era reversible al eliminarlas. Durante la realización de este trabajo no hemos encontrado ningún estudio en el que describan el efecto del fluido oviductal sobre la localización de la PT en las proteínas espermáticas, no obstante nuestros resultados son totalmente coincidentes con lo descrito por los autores que han utilizado explantes oviductales o la secreción de éstos durante su cultivo *in vitro*.

En esta experiencia también evaluamos de forma independiente la fosforilación del flagelo del resto de estructuras espermáticas. Observamos que se producía la PT del flagelo de forma inmediata en espermatozoides de EP y para los de EY necesitaban algo más de tiempo, pero en cualquier caso a las 3

horas del cocultivo más del 80% de las células tenían fosforilado el flagelo. La fosforilación de tirosina de proteínas en el flagelo del espermatozoide, ha sido relacionada con la adquisición de la hipermotilidad espermática, necesaria para que los espermatozoides puedan penetrar el cúmulo y la ZP del ovocito (Mahony y Gwathmey, 1999; Nassar et al, 1999; Si y Okuno, 1999). Se ha demostrado en varias especies que la exposición de los espermatozoides a sustancias que incrementen el nivel del AMPc intracelular (como el bicarbonato y  $\text{Ca}^{2+}$ ), aumentan tanto la motilidad hiperactiva como la proporción de espermatozoides con PT en el flagelo (Nassar et al. 1999, Mahony y Gwathmey, 1999; Lewis y Aitken, 2001). También observamos que al incubar los espermatozoides en FOP se obtenían más del 90% de células con la cola fosforilada, es decir incrementaba aún más la fosforilación. En cierto modo estos resultados coinciden con los obtenidos por Petrunkina et al. (2003) donde observaron que los espermatozoides unidos a las células del oviducto mantenían la PT del flagelo. Sin embargo parece ser que la PT está más relacionada con la hipermotilidad que con el proceso de capacitación y fecundación. La hipermotilidad es necesaria para liberarse del epitelio oviductal en el momento adecuado y seguidamente poder penetrar las envolturas del ovocito de forma que la PT en el flagelo se mantiene incluso después de la unión del espermatozoide a la ZP (revisado por Urner y Sakkas 2003).

## **7. CONCLUSIONES**

**1.-** Los lavados espermáticos afectan de forma diferente la motilidad de espermatozoides de epidídimo y de eyaculado. En los espermatozoides de epidídimo se produce un incremento en todos los parámetros de motilidad analizados (salvo para ALH y BCF), y un descenso de ellos para los eyaculados, (excepto para ALH en el que se produce un incremento).

**2.-** El fluido oviductal porcino afecta de forma diferente la motilidad de espermatozoides epididimarios y eyaculados. Los espermatozoides de epidídimo disminuyen los parámetros VSL, STR, WOB y BCF. Sin embargo, los espermatozoides eyaculados solo disminuyen el porcentaje de motilidad y ALH.

**3.-** La descondensación de la cromatina en los espermatozoides epididimarios sin ningún tratamiento es elevada respecto a la de los espermatozoides eyaculados. Sin embargo, después de los tratamientos de lavado espermático, la descondensación se incrementa de forma similar en espermatozoides epididimarios y eyaculados no viéndose afectada por la incubación del fluido oviductal porcino.

**4.-** La reacción acrosómica no se ve afectada por los lavados espermáticos ni por el origen de los espermatozoides (epididimarios o eyaculados). La incubación con fluido oviductal incrementa la población de espermatozoides reaccionados en el grupo de espermatozoides de epidídimo.

**5.-** La unión de los espermatozoides a la zona pelúcida es similar para espermatozoides de epidídimo y eyaculado independientemente del tratamiento empleado. En ambos grupos de espermatozoides, los lavados y la incubación en fluido oviductal porcino provocan una disminución en el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida.

**6.-** La mayor activación del núcleo femenino tras la inyección intracitoplasmática de espermatozoides se produce con espermatozoides

eyaculados tras el tratamiento de lavado e incubación en fluido oviductal porcino. En relación al núcleo masculino, el lavado espermático y la incubación posterior en fluido oviductal porcino mejoran la descondensación y formación del pronúcleo tanto en espermatozoides epididimarios como en eyaculados.

**7.-** La fosforilación de la tirosina de las proteínas no se modifica por la presencia en el medio de capacitación de BSA ni de fluido oviductal porcino. No obstante, los espermatozoides de epidídimo, independientemente del tratamiento al que son sometidos presentan una banda fosforilada de ~ 20 KDa, la cual solo aparece en espermatozoides eyaculados cuando son separados del plasma seminal.

**8.-** El mayor nivel de fosforilación de la tirosina analizado mediante inmunofluorescencia indirecta se encuentra en espermatozoides de epidídimo. Al lavar los espermatozoides se produce un incremento de la fosforilación de la tirosina en todos los grupos analizados aunque la distribución de la fosforilación difiere entre ellos. Para que la región acrosomal se fosforile, los espermatozoides eyaculados necesitan más tiempo en el medio de incubación que los de epidídimo.

**9.-** La incubación de espermatozoides epididimarios y eyaculados en fluido oviductal porcino revierte la fosforilación de la tirosina en la región acrosomal.

Como **conclusión general** de este trabajo, podemos decir que el proceso de capacitación así como la respuesta al fluido oviductal porcino, es diferente para espermatozoides procedentes de eyaculado o de epidídimo, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de realizar estudios fisiológicos de interacción de gametos.

## **8. ABREVIATURAS**

**AC:** Adenilato ciclasa

**Ac:** Anticuerpo

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ALH:** Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza espermática

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BCF:** Frecuencia de batido de cabeza espermática

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

**BSA-FAF:** Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (*Bovine Serum Albumine-Free Acid Fatty*)

**BSP:** (Proteínas del plasma seminal bovino) *Bovine Seminal Protein*

**BTS:** *Betswille Thawing Solution*

**CASA:** *Computer Assisted Sperm Analysis*

**CO:** *cumulus oophorus*

**COCs:** complejos *cumulus oophorus*-ovocito

**CE:** Cultivo de embriones

**CRISP:** Proteínas espermáticas ricas en cisteína (*Cystein Rich Sperm Proteins*)

**DAG:** Diacilglicerol

**DTT:** Ditioneitol

**dbAMPc:** dibutil adenosín monofosfato cíclico

**EP:** Epidídimo

**Espz:** Espermatozoide

**EY:** Eyaculado

**FICT:** Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isotiocyanate*)

**FFP:** Fluído folicular porcino

- Fn-II:** Proteínas del plasma seminal con dominio fibronectina tipo-II
- FOP:** Fluido oviductal porcino
- FPP:** Péptido promotor de la fertilidad
- FIV:** Fecundación *in vitro*
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- GSH:** Glutación
- hCG:** Gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoprotein*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*)
- ICSI:** Inyección Intracitoplasmática de espermatozoide
- IFI:** Inmunofluorescencia indirecta
- IP:** Ioduro de Propidio
- IP<sub>3</sub>:** Inositol 1,4,5-trifosfato
- kDa:** Kilodalton
- LIN:** Índice de linealidad
- MIV:** Maduración *in vitro*
- Mot Prog:** Motilidad progresiva
- Mot:** Motilidad
- NAD:** Nicotinamida adenina dinucleótida
- NADH<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótida hidrógeno
- NCSU-37:** medio *North Carolina State University-37*
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida (*PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*)
- PBS:** (Tampón fosfato salino de *Dulbecco* modificado) *Phosphate Buffer Saline*
- PC:** Fosfaditilcolina

**PDE1:** Fosfodiesterasa 1 (*Phosphodiesterase 1*)

**PE:** Fosfatidiletanolamina

**PIP2:** Fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato

**PIV:** Producción *in vitro* de embriones

**PKA:** Protein kinasa A

**PKC:** Protein kinasa C

**PLD:** Fosfolipasa D

**PLC:** Fosfolipasa C

**PMSG:** Gonadotropina sérica de yegua gestante (*pregnant mare's serum gonadotropin*)

**PNA:** Lectina *Arachis hypogaea* (*Peanut agglutinin*)

**PNF:** Pronúcleo femenino

**PNM:** Pronúcleo masculino

**PS:** Fosfatidilserina

**PT:** Fosforilación de la tirosina

**PVA:** Polivinil alcohol

**PVDF:** Polivinilideno-difluoruro (*Polyvinylidene difluoride*)

**PVS:** Espacio perivitelino

**P4:** Progesterona

**RA:** Reacción acrosómica

**RS:** Reservorio espermático

**SCA:** *Sperm Class Analyzer*

**SDS:** Dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulphate)

**SFB:** Suero fetal bovino

**SGB:** Glicoproteína de unión espermática (*Sperm Binding Glycoprotein*)

**SM:** Esfingomielina

**SMIF:** Factor inhibidor de la motilidad espermática (*Sperm Motility Inhibitor Factor*)

**SS:** Solución salina

**Spz/Ovo:** Número de espermatozoides por ovocito

**Spz/ml:** Número de espermatozoides por mililitro

**STR:** Índice de rectitud

**TALP:** Medio *Tyrodes* con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)

**TBST:** Buffer salino Tris-Tween (*Tris-Buffered Saline y Tween*)

**TRIS:** Hidroximetil aminometano

**TUNEL:** (Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End. Labeling)

**VAP:** Velocidad media

**VCL:** Velocidad curvilínea

**VSL:** Velocidad rectilínea

**WOB:** Índice de oscilación

**ZP:** Zona Pelúcida

**v/v:** Volumen/Volumen

## **9.BIBLIOGRAFÍA**

---

Abbott, A.L., Ducibella, T., 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience* 6, D792-D806.

Aitken, R.J., Curry, B.J., 2011. Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 367-381.

Alonso, M.A., Millán, J., 2001. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114, 3957-3965.

Amann, R.P., Schanbacher, B.D., 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science* 57, 380-403.

Aplin, A.E., Juliano, R.L., 1999. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci* 112 ( Pt 5), 695-706.

Arnoult, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., Florman, H.M., 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6757-6762.

Austin, C.R., 1951. Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. *Nature* 168, 558-559.

Austin, C.R., 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.

Austin, C.R., Bishop, M.W., 1958a. Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature* 181, 851.

Austin, C.R., Bishop, M.W., 1958b. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 149, 234-240.

Aveldaño, M.I., Rotstein, N.P., Vermouth, N.T., 1992. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J* 283 ( Pt 1), 235-241.

Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., Coy, P., 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 16, 896-906.

Awano, M., Kawaguchi, A., Mohri, H., 1993. Lipid-composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 99, 375-383.

Awda, B.J., Mackenzie-Bell, M., Buhr, M.M., 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biology of Reproduction* 81, 553-561.

---

Bailey, J.L., Tardif, S., Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Lefièvre, L., Leclerc, P., 2005. Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology* 63, 599-614.

Bailey, J.L., 2010. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med* 56, 334-348.

Barros, C., Bedford, J., Franklin, L., Austin, C., 1967. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol* 34, C1-5.

Barros, C., Yanagimachi, R., 1971. Block to polyspermy in Golden-hamster. *Archivos De Biología Y Medicina Experimentales* 8, R8-&.

Bearer, E.L., Friend, D.S., 1981. Maintenance of lipid domains in the guinea-pig sperm membrane. *Journal of Cell Biology* 91, A266-A266.

Bedford, J.M., 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl* 2, 128-158.

Bedford, J.M., 1975. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis., In: Hamilton D.W, G.R.O. (Ed.), In *Handbook of physiology. Endocrinology*, American Physiology Society., Washington, pp. 303-317.

Ben-Yosef, D., Shalgi, R., 2001. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med* 7, 163-169.

Benon, M., Linet, T., 2005. Sperm hyperactivated motility: influence of the capacitation medium. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 34, 488-492.

Berger, T., Horton, M.B., 1988. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 19, 101-111.

Berridge, M., Lipp, P., Bootman, M., 1999. Primer - Calcium signalling. *Current Biology* 9, R157-R159.

Berruti, G., Martegani, E., 1989. Identification of proteins cross-reactive to phosphotyrosine antibodies and of a tyrosine kinase activity in boar spermatozoa. *J Cell Sci* 93 ( Pt 4), 667-674.

Bi, Y., Xu, W.M., Wong, H.Y., Zhu, H., Zhou, Z.M., Chan, H.C., Sha, J.H., 2009. NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian Journal of Andrology* 11, 229-239.

Bischof, R.J., Lee, C.S., Brandon, M.R., Meeusen, E., 1994. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J Reprod Immunol* 26, 131-146.

Björk, M., Bjorndahl, L., Zakeri, A., Kvist, U., 2009. Can sperm chromatin packaging influence results of sperm DNA integrity measures? Results of the TUNEL assay. *Journal of Andrology*, 40-41.

---

Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G.M., Kvist, U., 1986. The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *Int J Androl* 9, 77-80.

Björndahl, L., Kvist, U., 2010. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 16, 23-29.

Blandau, R.J., Rumery, R.E., 1964. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertil Steril* 15, 571-579.

Bleil, J.D., Beall, C.F., Wassarman, P.M., 1981. Mammalian sperm-egg interaction-fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology* 86, 189-197.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1983. Sperm egg interactions in the mouse-sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* 95, 317-324.

Blobel, C.P., 2000. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod* 5, 75-83.

Boerke, A., Tsai, P.S., Garcia-Gil, N., Brewis, I.A., Gadella, B.M., 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* 70, 1188-1196.

Boja, E.S., Hoodbhoy, T., Fales, H.M., Dean, J., 2003. Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J Biol Chem* 278, 34189-34202.

Bravo, M.M., Aparicio, I.M., Garcia-Herreros, M., Gil, M.C., Pena, F.J., Garcia-Marin, L.J., 2005a. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 71, 88-96.

Breitbart, H., Rubinstein, S., Lax, Y., 1997. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod* 2, 165-174.

Breitbart, H., 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49, 321-327.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R., 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 277, 38895-38900.

Brooks, D.E., 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36, 205-221.

Brown, D.A., London, E., 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-17224.

---

Brüssow, K.P., Rátky, J., Rodríguez-Martínez, H., 2008. Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2, 245-251.

Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., Levin, L.R., 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 79-84.

Buffone, M.G., Calamera, J.C., Verstraeten, S.V., Doncel, G.F., 2005. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction* 129, 697-705.

Caballero, I., Vázquez, J.M., Parrilla, I., 2007. Inmunolocalización de la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre los espermatozoides de verraco., *An. Vet, Murcia*, pp. 55-64.

Caballero-Peregrín, P., Núñez Calonge, R., Ortega-López, L., Pérez-Gutiérrez, L.M., López-Fernández, C., Gosálvez Berenguer, J., 2008. Dinámica diferencial de la fragmentación del ADN en espermatozoides capacitados y no capacitados: un análisis prospectivo. *Revista Internacional de Andrología* 6, 186-192.

Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Raida, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1995. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett* 365, 179-182.

Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett* 407, 201-206.

Calvete, J.J., Sanz, L., 2007. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 201-215.

Calvin, H.I., Bedford, J.M., 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 13, Suppl 13:65-75.

Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., Perreault, S.D., 2000. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod* 15, 1322-1328.

Cánovas, S., Coy, P., Gomez, E., 2007. First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *J Androl* 28, 273-281.

Cánovas, S., Coy, P., 2008. [Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion]. *Rev Invest Clin* 60, 403-413.

---

Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66, 841-850.

Carlson, A., Westenbroek, R., Quill, T., Ren, D., Clapham, D., Hille, B., Garbers, D., Babcock, D., 2003. CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14864-14868.

Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Tesarik, J., Kopf, G.S., Moss, S.B., 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 180, 284-296.

Chalabi, S., Panico, M., Sutton-Smith, M., Haslam, S.M., Patankar, M.S., Lattanzio, F.A., Morris, H.R., Clark, G.F., Dell, A., 2006. Differential O-glycosylation of a conserved domain expressed in murine and human ZP3. *Biochemistry* 45, 637-647.

Chamberland, A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M.A., Sullivan, R., Bailey, J.L., 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55, 823-835.

Chang, M.C., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.

Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., Bleil, J.D., 1994. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol* 125, 867-878.

Chenoweth, P., 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. In Youngquist, In: R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Saunders., pp. 217-229.

Chevrier, C., Dacheux, J.L., 1992. Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. *Cell Motil Cytoskeleton* 23, 8-18.

Chiu, P.C., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K.F., Yeung, W.S., 2003. Zona-binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodeilin. *Biol Reprod* 69, 365-372.

Cohen, G., Rubinstein, S., Gur, Y., Breitbart, H., 2004. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev Biol* 267, 230-241.

Cook, S.P., Brokaw, C.J., Muller, C.H., Babcock, D.F., 1994. Sperm-chemotaxis-egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Developmental Biology* 165, 10-19.

---

Cooper, T., 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 119-136.

Cooper, T.G., Yeung, C.H., 1999. Approaches to post-testicular contraception. *Asian J Androl* 1, 29-36.

Cooper, T., Yeung, C., 2006a. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril* 85, 220-224.

Cooper, T.G., Yeung, C., 2006b. Sperm maturation in the human epididymis., In: Barratt, C. y De Jonge C. (Ed.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Pp. 72-107

Courtens, J.L., Fournierdelpech, S., 1979. Modifications in the plasma membranes of epididymal ram spermatozoa during maturation and incubation in utero. *Journal of Ultrastructure Research* 68, 136-148.

Coy, P., Lloyd, R., Romar, R., Satake, N., Matas, C., Gadea, J., Holt, W.V., 2010. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology* 74, 632-642.

Cross, N.L., 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 7-11.

Cuasnicú, P., González Echeverría, F., Piazza, A., Piñeiro, L., Blaquier, J., 1984. Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 71, 427-431.

Cummins, J.M., Yanagimachi, R., 1982. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Research* 5, 239-256.

Cummins, J.M., Woodall, P.F., 1985. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 75, 153-175.

Cummins, J.M., Yanagimachi, R., 1986. Developmet of ability to penetrate the cumulus-oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Research* 15, 187-212.

Cummings, R.D., 1994. Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Guide to Techniques in Glycobiology* 230, 66-86.

Curry, M.R., Watson, P.F., 1995. Sperm structure and function, In: J.L., G.y.Y. (Ed.), *Gametes: The spermatozoon*, Cambridge University Press, pp. 45-69.

Dacheux, J.L., Gatti, J.L., Dacheux, F., 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61, 7-17.

---

Dacheux, J.L., Castella, S., Gatti, J.L., Dacheux, F., 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63, 319-341.

Dadoune, J., 1995. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 26, 323-345.

Dadoune, J.P., Siffroi, J.P., Alfonsi, M.F., 2004. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.

Dale, B., Defelice, L.J., Ehrenstein, G., 1985. Injection of soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 41, 1068-1070.

Dandekar, P., Aggeler, J., Talbot, P., 1992. Structure, distribution and composition of the extracellular-matrix of human oocytes and cumulus masses. *Human Reproduction* 7, 391-398.

Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T., Treviño, C.L., 2001. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 240, 1-14.

Darszon, A., Acevedo, J., Galindo, B., Hernández-González, E., Nishigaki, T., Treviño, C., Wood, C., Beltrán, C., 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131, 977-988.

DasGupta, S., Mills, C.L., Fraser, L.R., 1993. Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 99, 135-143.

Davis, B.K., 1976. Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of rabbit spermatozoa. *Proc Soc Exp Biol Med* 152, 257-261.

Davis, B.K., 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7560-7564.

Dawson, R.M., Scott, T.W., 1964. Phospholipid composition of epididymal spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *Nature* 202, 292-293.

De Geyter, C., De Geyter, M., Koppers, B., Nieschlag, E., 1998. Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod* 13, 2512-2520.

De Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C., 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3, 175-194.

De Maistre, E., Béné, M.C., Foliguet, B., Touati, F., Faure, G.C., 1996. Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm: a flow cytometric analysis. *Arch Androl* 37, 179-187.

---

Dean, J., 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 26, 29-38.

Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J.L., Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A., Visconti, P.E., 2003. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278, 7001-7009.

Demott, R.P., Suárez, S.S., 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46, 779-785.

Desnoyers, L., Manjunath, P., 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267, 10149-10155.

Ding, J.C., Moor, R.M., Foxcroft, G.R., 1992. Effects of protein-synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 33, 59-66.

Dostálová, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Topferpetersen, E., 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitates spermatozoa. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1200, 48-54.

Dostálová, Z., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., 1995. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 237-242.

Dobrinski, I., Ignatz, G.G., Thomas, P.G., Ball, B.A., 1996. Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *Am J Vet Res* 57, 1635-1639.

Dragileva, E., Rubinstein, S., Breitbart, H., 1999. Intracellular Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 61, 1226-1234.

Dubé, C., Tardif, S., LeClerc, P., Bailey, J.L., 2003. The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. *J Androl* 24, 727-733.

Dukelow, W.R., Chernoff, H.N., Williams, W.L., 1967. Properties of decapacitation factor and presence in various species. *J Reprod Fertil* 14, 393-399.

Eddy, E., 1994. The Spermatozoon, In: J.D, N. (Ed.), *Physiology of Reproduction*, Academic Press, USA, pp. 3-54.

Ekhlas-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoolova, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E., 2005a. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod* 73, 536-545.

---

Ekhlesi-Hundrieser, M., Schäfer, B., Kirchhoff, C., Hess, O., Bellair, S., Müller, P., Töpfer-Petersen, E., 2005b. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 70, 45-57.

Elliott, R.M., Lloyd, R.E., Fazeli, A., Sostaric, E., Georgiou, A.S., Satake, N., Watson, P.F., Holt, W.V., 2009. Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction* 137, 191-203.

Ensslin, M., Calvete, J.J., Thole, H.H., Sierralta, W.D., Adermann, K., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., 1995. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 733-738.

Ensslin, M.A., Shur, B.D., 2003. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114, 405-417.

Ensslin, M.A., Lyng, R., Raymond, A., Copland, S., Shur, B.D., 2007. Novel gamete receptors that facilitate sperm adhesion to the egg coat. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63, 367-383.

Evans, J.P., 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update* 8, 297-311.

Evenson, D., 1999. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 11, 1-15.

Fawcett, D.W., Hollenberg, R.D., 1963. Changes in the acrosome of the guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 60, 276-292.

Fawcett, D., 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod* 2, Suppl 2:90-127.

Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V., 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60, 879-886.

Flesch, F.M., Colenbrander, B., van Golde, L.M., Gadella, B.M., 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 787-792.

Flesch, F., Gadella, B., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469, 197-235.

Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nievelstein, P.F., Verkleij, A.J., van Golde, L.M., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2001a. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114, 3543-3555.

---

Flesch, F.M., Wijnand, E., van de Lest, C.H., Colenbrander, B., van Golde, L.M., Gadella, B.M., 2001b. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 60, 107-115.

Florman, H.M., Storey, B.T., 1982. Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Developmental Biology* 91, 121-130.

Florman, H.M., Corron, M.E., Kim, T.D., Babcock, D.F., 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152, 304-314.

Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, C., O'Toole, C.M., 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 59, 12-16.

Florman, H.M., Ducibella, T., 2006. Fertilization in mammals, In: Neill, J.D. (Ed.), *In The Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.*, Elsevier, New York, pp. 55-112.

Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., Dacheux, J.L., 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 62, 1790-1803.

Fraser, L.R., 1984. Mechanisms controlling mammalian fertilization. *Oxf Rev Reprod Biol* 6, 174-225.

Fraser, L.R., Harrison, R.A., Herod, J.E., 1990. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 89, 135-148.

Fraser, L.R., Abeydeera, L.R., Niwa, K., 1995. Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40, 233-241.

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

Frenette, G., Sullivan, R., 2001. Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* 59, 115-121.

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

Funahashi, H., Cantley, T., Day, B., 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 57, 49-53.

---

Funahashi, H., 2003. Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction Fertility and Development* 15, 167-177.

Furimsky, A., Vuong, N., Xu, H., Kumarathasan, P., Xu, M., Weerachayanukul, W., Bou Khalil, M., Kates, M., Tanphaichitr, N., 2005. Percoll gradient-centrifuged capacitated mouse sperm have increased fertilizing ability and higher contents of sulfogalactosylglycerolipid and docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine compared to washed capacitated mouse sperm. *Biol Reprod* 72, 574-583.

Gaboriau, D., Howes, E.A., Clark, J., Jones, R., 2007. Binding of sperm proacrosin/beta-acrosin to zona pellucida glycoproteins is sulfate and stereodependent. Synthesis of a novel fertilization inhibitor. *Dev Biol* 306, 646-657.

Gaddum-Rosse, P., 1985. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* 174, 347-356.

Gadea J, Gumbao D, Matás C y Romar R. 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the In Vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J. Of Andrology*. 26: 749-756

Gadella, B.M., Colenbrander, B., Van Golde, L.M., Lopes-Cardozo, M., 1993. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. *Biol Reprod* 48, 483-489.

Gadella, B.M., Harrison, R.A., 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407-2420.

Gadella, B.M., Harrison, R.A., 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67, 340-350.

Gadella, B.M., Van Gestel, R.A., 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* 82-83, 307-319.

Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O., Dean, J., 2010. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 329, 216-219.

Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 56, 707-719.

Garbers, D.L., Tubb, D.J., Hyne, R.V., 1982. A requirement of bicarbonate for Ca<sup>2+</sup>-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem* 257, 8980-8984.

---

García Herreros, M., Aparicio, I.M., Núñez, I., García-Marín, L.J., Gil, M.C., Peña Vega, F.J., 2005. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology* 63, 795-805.

García-Roselló, E., 2005. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina., Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia, Murcia, España.

García-Roselló, E., Matás, C., Cánovas, S., Moreira, P.N., Gadea, J., Coy, P., 2006. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J Androl* 27, 268-275.

García-Roselló, E., García-Mengual, E., Coy, P., Alfonso, J., Silvestre, M.A., 2009. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod Domest Anim* 44, 143-151.

Gatti, J.L., Druart, X., Guérin, Y., Dacheux, F., Dacheux, J.L., 1999. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol Reprod* 60, 937-945.

Gatti, J.L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., Dacheux, J.L., 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 82-83, 321-339.

Geng, J.G., Raub, T.J., Baker, C.A., Sawada, G.A., Ma, L., Elhammer, A.P., 1997. Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectin on acrosomal membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions. *Journal of Cell Biology* 137, 743-754.

Gomez, E., Buckingham, D.W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, D.S., Aitken, R.J., 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17, 276-287.

Grant, S.A., Long, S.E., Parkinson, T.J., 1994. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil* 100, 477-483.

Grasa, P., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2006. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* 132, 721-732.

Green, D.P., 1993. Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod* 8, 91-96.

Gupta, S.K., Chakravarty, S., Suraj, K., Bansal, P., Ganguly, A., Jain, M.K., Bhandari, B., 2007. Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63, 203-216.

---

Gwathmey, T.M., Igotz, G.G., Suárez, S.S., 2003. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction* 69, 809-815.

Gwathmey, T.M., Igotz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P., Suárez, S.S., 2006a. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction* 75, 501-507.

Gwathmey, T.M., Igotz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P., Suárez, S.S., 2006b. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 75, 501-507.

Hafez, E.S., 1993. *Reproduction in Farm Animals*. LEA & Febiger, Interamericana, Philadelphia.

Hall, J.C., Hadley, J., Doman, T., 1991. Correlation between changes in rat sperm membrane-lipids, protein and the membrane physical state during epididymal maturation. *Journal of Andrology* 12, 76-87.

Hamner, C.E., Jennings, L.L., Sojka, N.J., 1970. Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. *J Reprod Fertil* 23, 477-480.

Handrow, R.R., First, N.L., Parrish, J.J., 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 252, 174-182.

Harayama, H., Kato, S., 1992. Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. *Animal Science Technology* 63, 462-467.

Harayama, H., Miyake, M., Shidara, O., Iwamoto, E., Kato, S., 1998. Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 10, 445-450.

Harayama, H., Miyake, M., Kato, S., 2000. Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and serum albumin in head-to-head agglutination of boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 12, 307-318.

Harayama, H., Miyake, M., 2006. A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73, 1169-1178.

Hardy, D.M., Oda, M.N., Friend, D.S., Huang, T.T.F., 1991. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochemical Journal* 275, 759-766.

Harkema, W., Colenbrander, B., Engel, B., Woelders, H., 2004. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. *Theriogenology* 61, 215-226.

---

Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* 4, 361-393.

Harrison, R.A., 1974. The detection of hexokinase, glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase activities in polyacrylamide gels after electrophoresis: a novel method using immobilized glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Anal Biochem* 61, 500-507.

Harrison, R.A., Mairet, B., Miller, N.G., 1993. Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in boar sperm populations. *Mol Reprod Dev* 35, 197-208.

Harrison, R.A., 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8, 581-594.

Harrison, R.A., Ashworth, P.J., Miller, N.G., 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45, 378-391.

Harrison, R.A., Miller, N.G., 2000. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 55, 220-228.

Harrison, R.A., 2004. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev* 67, 337-352.

Harrison, R.A., Gadella, B.M., 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351.

Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suárez, S.S., Levin, L.R., Williams, C.J., Buck, J., Moss, S.B., 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* 9, 249-259.

Hinton, B.T., Dott, H.M., Setchell, B.P., 1979. Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J Reprod Fertil* 55, 167-172.

Hinton, B.T., Palladino, M.A., Rudolph, D., Labus, J.C., 1995. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 7, 731-745.

Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H., Sato, I., 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18, 213-218.

Hirohashi, N. Kamei, N. Kubo, H. Sawada, H. Matsumoto, M. Hoshi, M. 2008. Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Development Growth & Differentiation*. 50, 221-238

---

Ho, H.C., Suárez, S.S., 2001. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular  $\text{Ca}^{+}_2$  store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 65, 1606-1615.

Holt, W., 1984. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int Rev Cytol* 87, 159-194.

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

Holt, W.V., 2009. Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 3, 31-38.

Hoodbhoy, T., Talbot, P., 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39, 439-448.

Hoodbhoy, T., Talbot, P., 2001. Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Mol Reprod Dev* 58, 223-235.

Huang, T.T., Fleming, A.D., Yanagimachi, R., 1981. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study using the guinea pig. *J Exp Zool* 217, 287-290.

Hubbard, S.R., Till, J.H., 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69, 373-398.

Hunnicutt, C.R., Primakoff, P., Myles, D.G., 1996. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: One activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biology of Reproduction* 55, 80-86.

Hunnicutt, G., Koppel, D., Myles, D., 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev Biol* 191, 146-159.

Hunter, R.H., Hall, J.P., 1974a. Capacitation of boar spermatozoa: synergism between uterine and tubal environments. *J Exp Zool* 188, 203-213.

Hunter, R.H., Hall, J.P., 1974b. Capacitation of boar spermatozoa: the influence of post-coital separation of the uterus and fallopian tubes. *Anat Rec* 180, 597-603.

Hunter, R.H., 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 63, 109-117.

Hunter, R.H., 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil* 72, 203-211.

---

Hunter, R.H., Nichol, R., 1986. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil* 77, 599-606.

Hunter, R.H., Rodríguez-Martínez, H., 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol Reprod Dev* 67, 243-250.

Hunter, R., 2008. Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles. *Mol Reprod Dev* 75, 167-174.

Huret, J.L., 1986. Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arch Androl* 16, 97-109.

Hyne, R.V., Garbers, D.L., 1979. Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. *Biol Reprod* 21, 1135-1142.

Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M., Okabe, M., 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 120, 984-994.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M., 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.

Iwamatsu, T., Chang, M.C., 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 26, 197-208.

Jahn, R., Grubmuller, H., 2002. Membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 488-495.

Jezová, M., Scsuková, S., Nagyová, E., Vranová, J., Procházka, R., Kolena, J., 2001. Effect of intraovarian factors on porcine follicular cells: cumulus expansion, granulosa and cumulus cell progesterone production. *Anim Reprod Sci* 65, 115-126.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., Hirohashi, N., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4892-4896.

Johansson, M., Tienthai, P., and Rodríguez-Martínez, H., 2000. Histochemistry and Ultrastructure of the Intraluminal Mucus in the Sperm Reservoir of the Pig Oviduct. *J Reprod Dev* 46, 183-192.

Jones, R., 1989. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxf Rev Reprod Biol* 11, 285-337.

Jones, R., 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.

---

Jones, K.T., Cruttwell, C., Parrington, J., Swann, K., 1998. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca<sup>2+</sup> release in sea urchin egg homogenates. *Febs Letters* 437, 297-300.

Jones, K.T., Matsuda, M., Parrington, J., Katan, M., Swann, K., 2000. Different Ca<sup>2+</sup>-releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochemical Journal* 346, 743-749.

Jonáková, V., Kraus, M., Veselský, L., Cechová, D., Bezouska, K., Tichá, M., 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil* 114, 25-34.

Jonáková, V., Manásková, P., Kraus, M., Liberda, J., Tichá, M., 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 56, 275-277.

Kaji, K., Kudo, A., 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127, 423-429.

Kalab, P., Peknicová, J., Geussová, G., Moos, J., 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 51, 304-314.

Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J., Coward, K., 2010. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update* 16, 690-703.

Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J., Coward, K., 2011. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*.

Katayama, M., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S., 2002. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* 10, 95-104.

Kato, S., Shibukawa, T., Harayama, H., Kanna, Y., 1996. Timing of shedding and disintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa. *J Reprod Develop* 42, 237-241.

Katska-Ksiazkiewicz, L., 2007. Recent studies on molecular mechanisms involved in mammalian sperm capacitation: A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16, 311-328.

Keating, J., Grundy, C.E., Fivey, P.S., Elliott, M., Robinson, J., 1997. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil* 110, 71-77.

---

Khalifa, T.A.A., Rekkas, C.A., Lymberopoulos, A.G., Sioga, A., Dimitriadis, I., Papanikolaou, T., 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 104, 143-163.

Killian, G.J., 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 82-83, 141-153.

Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita, M., Kashiwabara, S., Baba, T., 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18028-18033.

Kim, K.S., Foster, J.A., Gerton, G.L., 2001. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biology of Reproduction* 64, 148-156.

Kim, K.S., Gerton, G.L., 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental Biology* 264, 141-152.

Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A.C.F., Yanagimachi, H., 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biology of Reproduction* 58, 1407-1415.

Kirchhoff, C., Hale, G., 1996. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2, 177-184.

Kirchhoff, C., Pera, I., Derr, P., Yeung, C.H., Cooper, T., 1997. The molecular biology of the sperm surface. Post-testicular membrane remodelling. *Adv Exp Med Biol* 424, 221-232.

Koehler, J., 1978. The mammalian sperm surface: studies with specific labeling techniques. *Int Rev Cytol* 54, 73-108.

Kolbe, T., Holtz, W., 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 52, 671-682.

Kopf, G.S., 1991. Signal transduction mechanisms mediating acrosomal exocytosis in mammalian spermatozoa. *Comparative Spermatology 20 Years After 75*, 185-190.

Korley, R., Pouresmaeili, F., Oko, R., 1997. Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent. *Biol Reprod* 57, 1426-1432.

Kulanand, J., Shivaji, S., 2001. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia* 33, 95-104.

---

Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K., Yanagimachi, R., 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biology of Reproduction* 55, 789-795.

Kölle, S., Reese, S., Kummer, W., 2010. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology* 73, 786-795.

Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Leblond, E., Desnoyers, L., Manjunath, P., 1993. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 34, 443-449.

Leclerc, P., De Lamirande, E., Gagnon, C., 1996. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55, 684-692.

Leclerc, P., De Lamirande, E., Gagnon, C., 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22, 643-656.

Lee, J.W., Tian, X.C., Yang, X., 2003. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 68, 1341-1347.

Lefebvre, R., Lo, M.C., Suárez, S.S., 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* 56, 1198-1204.

Leshin, L.S., Raj, S.M., Smith, C.K., Kwok, S.C., Kraeling, R.R., Li, W.I., 1998. Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *J Reprod Fertil* 114, 77-84.

Lewis, B., Aitken, R.J., 2001. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl* 22, 611-622.

Li, J.P., Zhong, Y., Wu, D., Ai, L., Wang, S., Tan, C., Zeng, W.Q., Liu, J., Ma, G.P., 2006. [Relationships among human follicular fluid-induced acrosome reaction, sperm morphology and in vitro fertilization rates]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12, 605-607.

Libersky, E.A., Boatman, D.E., 1995. Progesterone concentrations in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during the periovulatory period. *Biol Reprod* 53, 477-482.

Lin, Y., Kimmel, L.H., Myles, D.G., Primakoff, P., 1993. Molecular-cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10071-10075.

---

Lindemann, C.B., Kanous, K.S., 1989. Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of Andrology* 23, 1-22.

Lipitz, S., Bartoov, B., Rajuan, C., Reichart, M., Kedem, P., Mashiach, S., Dor, J., 1992. Sperm head ultramorphology and chromatin stability of males with unexplained infertility who fail to fertilize normal human ova in vitro. *Andrologia* 24, 261-269.

Litscher, E.S., Williams, Z., Wassarman, P.M., 2009. Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Mol Reprod Dev* 76, 933-941.

Llanos, M.N., Morales, P., Riffo, M.S., 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool* 267, 209-216.

Loeb, J., 1915. On the nature of the conditions which determine or prevent the entrance of the spermatozoon into the egg. *Amer. Nat.* 49, 257-285.

Lusignan, M.F., Bergeron, A., Crete, M.H., Lazure, C., Manjunath, P., 2007. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biology of Reproduction* 76, 424-432.

Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C., El-Alfy, M., Sullivan, R., 1999. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev* 52, 225-233.

O'Rand, M.G., Welch, J.E.a., Fisher, S.J., 1986. Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization., In: Dhindsa, D.S.a.B., O.P. (Ed.), In: *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction.*, Plenum Publishing Corp., New York, pp. 131-144.

Maas, D.H.A., Storey, B.T., Mastroianni, L., 1977. pH and PCO<sub>2</sub> in oviduct of rhesus-monkey during menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 28, 306-306.

Maeda, T., Nishida, J., Nakanishi, Y., 1999. Expression pattern, subcellular localization and structure--function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Dev Growth Differ* 41, 715-722.

Mahony, M.C., Gwathmey, T., 1999. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* 60, 1239-1243.

Manásková, P., Peknicová, J., Elzeinová, F., Tichá, M., Jonáková, V., 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol* 74, 103-113.

Manásková, P., Davidova, N., Jonáková, V., 2011. Biochemical and binding characteristics of boar epididymal fluid proteins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879, 100-106.

---

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

Mann, T., Lutwak-Mann, C., 1981. Male reproductive function and semen, Themes and trends in physiology, biochemistry, and investigative andrology, Springer-Verlag, Berlin, Nueva York.

Marini, P.E., Cabada, M.O., 2003. One step purification and biochemical characterization of a spermatozoa-binding protein from porcine oviductal epithelial cells. *Mol Reprod Dev* 66, 383-390.

Marquez, B., Suárez, S.S., 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod* 70, 1626-1633.

Martín, R.S., 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina, Barcelona, España.

Matthijs, A., Harkema, W., Engel, B., Woelders, H., 2000. In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. *J Reprod Fertil* 120, 265-273.

Matthijs, A., Engel, B., Woelders, H., 2003. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction* 125, 357-367.

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

Matás, C., Coy, P., Romar, R., Marco, M., Gadea, J., Ruiz, S., 2003. Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs. *Reproduction* 125, 133-141.

Matás, C., Sansegundo, M., Ruiz, S., García-Vázquez, F.A., Gadea, J., Romar, R., Coy, P., 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74, 1327-1340.

Mburu, J.N., Rodríguez-Martínez, H., Einarsson, S., 1997. Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim Reprod Sci* 47, 137-148.

McCann, C.T., Chantler, E., 2000. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. *Int J Androl* 23, 205-209.

McLeskey, S.B., Dowds, C., Carballada, R., White, R.R., Saling, P.M., 1998. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 177 177, 57-113.

---

Mehats, C., Andersen, C.B., Filopanti, M., Jin, S.L., Conti, M., 2002. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* 13, 29-35.

Meyers, S.A., Rosenberger, A.E., 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* 61, 444-451.

Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D., 1992. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357, 589-593.

Miller, D.J., Shi, X., Burkin, H., 2002. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res* 57, 37-73.

Molina, J., Castilla, J.A., Gil, T., Hortas, M.L., Vergara, F., Herruzo, A., 1995. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod* 10, 1280-1286.

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

Monks, N.J., Stein, D.M., Fraser, L.R., 1986. Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue. *Int J Androl* 9, 67-76.

Mori, E., Baba, T., Iwamatsu, A., Mori, T., 1993. Purification and characterization of a 38-kda protein, sp38, with zona-pellucida binding property from porcine epididymal sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196, 196-202.

Morozumi, K., Yanagimachi, R., 2005. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14209-14214.

Mortimer, S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 3, 403-439.

Mortimer, S.T., Maxwell, W.M., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev* 11, 25-30.

Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25, 747-806.

Munuce, M.J., Serravalle, A., Caille, A.M., Zumoffen, C., Botti, G., Cabada, M., Ghersevich, S., 2009. Human tubal secretion can modify the affinity of human spermatozoa for the zona pellucida. *Fertil Steril* 91, 407-413.

---

Muñoz-Garay, C., De la Vega-Beltrán, J.L., Delgado, R., Labarca, P., Felix, R., Darszon, A., 2001. Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234, 261-274.

Myles, D.G., Primakoff, P., 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction* 56, 320-327.

Müller, P., Erlemann, K.R., Müller, K., Calvete, J.J., Töpfer-Petersen, E., Marienfeld, K., Herrmann, A., 1998. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J* 27, 33-41.

Nagai, T., 1996. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science* 42, 153-163.

Nakai, M., Ito, J., Sato, K.I., Noguchi, J., Kaneko, H., Kashiwazaki, N., Kikuchi, K., 2011. Pre-Treatment of Sperm Reduces Success of Intracytoplasmic Sperm Injection in the Pig. *Reproduction*.

Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y., Okabe, M., 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett* 449, 277-283.

Nakano, Y., Shirakawa, H., Mitsuhashi, N., Kuwabara, Y., Miyazaki, S., 1997. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Molecular Human Reproduction* 3, 1087-1093.

Nassar, A., Mahony, M., Morshedi, M., Lin, M.H., Srisombut, C., Oehninger, S., 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 71, 919-923.

Naz, R.K., Ahmad, K., Kumar, R., 1991. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J Cell Sci* 99 ( Pt 1), 157-165.

Naz, R.K., Rajesh, P.B., 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 75.

Neill, J.M., Oldsclarke, P., 1987. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum-albumin is required. *Gamete Research* 18, 121-140.

Nicolle, J.C., Fournierdelpech, S., Courot, M., 1985. Influence of uterine secretions on the chromatin of ram spermatozoa at different stages of maturation. Cytophotometric study of feulgen-DNA after in vitro incubation. *Gamete Research* 11, 321-328.

Nikolettos, N., Kupker, W., Demirel, C., Schopper, B., Blasig, C., Sturm, R., Felberbaum, R., Bauer, O., Diedrich, K., Al-Hasani, S., 1999. Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Human Reproduction* 14, 47-70.

---

Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., Vary, J.C., 1985. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 815, 486-498.

O'Donnell, J.B., Hill, J.L., Gross, D.J., 2004. Epidermal growth factor activates cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevations and subsequent membrane permeabilization in mouse cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 127, 207-220.

Oda, S., Deguchi, R., Mohri, T., Shikano, T., Nakanishi, S., Miyazaki, S., 1999. Spatiotemporal dynamics of the Ca<sup>2+</sup> (i) rise induced by microinjection of sperm extract into mouse eggs: Preferential induction of a Ca<sup>2+</sup> wave from the cortex mediated by the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Developmental Biology* 209, 172-185.

Odeh, A.I., Dascanio, J.J., Caceci, T., Bowen, J., Eng, L.A., 2003. Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 126, 605-613.

Oehninger, S., Patankar, M., Seppala, M., Clark, G.F., 1998. Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia* 30, 269-274.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., Sugita, Y., 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260, 9699-9705.

Okamura, N., Kiuchi, S., Tamba, M., Kashima, T., Hiramoto, S., Baba, T., Dacheux, F., Dacheux, J., Sugita, Y., Jin, Y., 1999. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1438, 377-387.

Oko, R., Aul, R.B., Wu, A., Sutovsky, P., 2001. The sperm head cytoskeleton., In: Robaire, B., Chemes, H., Morales, C.R. (Eds.), *Andrology in the 21st century.*, Medimond Publishing Co., Englewood, NJ, USA., pp. 37-51.

Oliphant, G., 1974. Role of seminal plasma in sperm capacitation. *Federation Proceedings* 33, 289-289.

Oliphant, G., Reynolds, A.B., Thomas, T.S., 1985. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 174, 269-283.

Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K., Lai, F.A., 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379, 364-368.

Parrington, J.J., Jones, M.L., Tunwell, R., Devader, C., Katan, M., Swann, K., 2002. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs. *Reproduction* 123, 31-39.

---

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., First, N.L., 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41, 683-699.

Parrish, J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J., 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44, 859-869.

Pawson, T., 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191-203.

Perreault, S.D., Barbee, R.R., Slott, V.L., 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology* 125, 181-186.

Perry, A.C., Wakayama, T., Yanagimachi, R., 1999. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod* 60, 747-755.

Pesch, S., Bergmann, M., 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37, 597-612.

Petrunkina, A.M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E., 2001a. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* 122, 469-480.

Petrunkina, A.M., Gehlhaar, R., Drommer, W., Waberski, D., Topfer-Petersen, E., 2001b. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 121, 889-896.

Petrunkina, A.M., Simon, K., Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E., 2003a. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Journal of Andrology* 24, 423-437.

Petrunkina, A.M., Simon, K., Günzel-Apel, A.R., Töpfer-Petersen, E., 2003b. Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod Domest Anim* 38, 455-463.

Petters, R.M., Wells, K.D., 1993. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48, 61-73.

Pettersson, E., Ståhl, P.L., Mahdessian, H., Käller, M., Lundeberg, J., Ahmadian, A., 2009. Visual DNA as a diagnostic tool. *Electrophoresis* 30, 3691-3695.

Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J., Suárez, S.S., 1991. Fertilizing-capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial-cells. *Biology of Reproduction* 44, 102-107.

---

Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, S.A., 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 68, 1208-1214.

Porcelli, F., Consiglio, A.L., Cremonesi, F., Ferrandi, B., 1987. Cytochemical study on mouse spermatozoa chromatin during epididymal maturation and during in vivo and in vitro capacitation. *Archivio Veterinario Italiano* 38, 33-39.

Primakoff, P., Myles, D.G., 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296, 2183-2185.

Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa-fertilizing-capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40, 99-102.

Pérez, F.A., Roma, S.M., Cabada, M.O., Marini, P.E., 2006. Sperm binding glycoprotein is differentially present surrounding the lumen of isthmus and ampulla of the pig's oviduct. *Anat Embryol (Berl)* 211, 619-624.

Quintero-Moreno, A., González-Villalobos, D., Garde López-Brea, J.J., Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Carvalho-Crociata, J.L., Mejía-Silva, W., León-Atencio, G., 2008. Morphometric Evaluation of Sperm Head of Domestic Pig According their Age, *Revista Científica [en línea]* 2009, Zulia, Venezuela.

Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Simerly, C., Oko, R., Wessel, G.M., Hewitson, L., Schatten, G., 2000. ICSI choreography: fate of sperm structures after monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. *Human Reproduction* 15, 2610-2620.

Rana, A.P.S., Majumder, G.C., Misra, S., Ghosh, A., 1991. Lipid changes of goat sperm plasma-membrane during epididymal maturation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1061, 185-196.

Rath, D., Niemann, H., 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47, 785-793.

Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., Johnson, L.A., 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77, 3346-3352.

Ravnik, S.E., Albers, J.J., Muller, C.H., 1995. Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein. *J Exp Zool* 272, 78-83.

Recková, Z., Machatkova, M., Rybar, R., Horakova, J., Hulinska, P., Machal, L., 2008. Evaluation of chromatin integrity of motile bovine spermatozoa capacitated in vitro. *Zygote* 16, 195-202.

Reid, A.T., Redgrove, K., Aitken, R.J., Nixon, B., 2011. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl* 13, 88-96.

---

Richardson, R.T., Orand, M.G., 1996. Site-directed mutagenesis of rabbit proacrosin: Identification of residues involved in zona pellucida binding. *Biology of Reproduction* 54, 53-53.

Robaire, B., Viger, R.S., 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52, 226-236.

Roberts, K.P., 2002. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and vas deferens, In: Hinton, B.R.y.B.T. (Ed.), *The Epididymis: From molecules to clinical practice*, Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, p. 575.

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

Rodríguez-Martínez, H., Nicander, L., Viring, S., Einarsson, S., Larsson, K., 1990b. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embryol* 19, 16-36.

Rodríguez-Martínez, H., Ekstedt, E., Ridderstråle, Y., 1991. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the female genitalia of pigs during the oestrous cycle. *Acta Anat (Basel)* 140, 41-47.

Rodríguez-Martínez, H., Iborra, A., Martínez, P., Calvete, J.J., 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reprod Fertil Dev* 10, 491-497.

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

Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., Calvete, J.J., 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 63, 514-535.

Rodríguez-Martínez, H., 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S138-146.

Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Roca, J., Peña, F.J., 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70, 1242-1250.

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., Peña, F.J., Martínez, E.A., Roca, J., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66, 1-21.

Roldan, E.R., 2006. Better intracytoplasmic sperm injection without sperm membranes and acrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17585-17586.

---

Romero, M.F., Boron, W.F., 1999. Electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 699-723.

Royere, D., Hamamah, S., Nicolle, J.C., Lansac, J., 1991. Does in vitro capacitation alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa? *Cytochemical studies. Mol Reprod Dev* 28, 177-182.

Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H., Molitor, T.W., Crabo, B.G., 1999. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J Anim Sci* 77, 2201-2206.

Runge, K.E., Evans, J.E., He, Z.Y., Gupta, S., McDonald, K.L., Stahlberg, H., Primakoff, P., Myles, D.G., 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental Biology* 304, 317-325.

Sabeur, K., Cherr, G.N., Yudin, A.I., Primakoff, P., Li, M.W., Overstreet, J.W., 1997. The PH-20 protein in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 18, 151-158.

Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T., Tanabe, T., 2002. Ca<sub>v</sub>2.3 (α1E) Ca<sup>2+</sup> channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett* 516, 229-233.

Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D., 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66, 1061-1067.

Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., Visconti, P.E., 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 245-259.

Saling, P.M., Storey, B.T., 1979. Interaction of intact and acrosome-reacted mouse sperm with the zonae pellucidae of mouse eggs-chlortetracycline as fluorescent-probe of the acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 20, A80-A80.

Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C.B., Laurent, T.C., Hascall, V.C., 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151, 541-551.

Sansegundo, M., Gardon, J.C., Garcia-Vazquez, F., Gadea, J., Matas, C., 2007. Comparing changes in motion parameters in epididymal and ejaculated boar spermatozoa under three different treatments. *Reproduction Fertility and Development* 19, 329.

Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Schmid, E.R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Ehrhard, M., Töpfer-Petersen, E., 1992. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Lett* 300, 213-218.

---

Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.J., 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 435-478.

Schmidt, H., Kamp, G., 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128, 171-179.

Schmidt, H., Kamp, G., 2005. Characterization of hyperactivated boar spermatozoa. *Theriogenology* 63, 487-488.

Schultz, R.M., Kopf, G.S., 1995. Molecular basis of mammalian egg activation. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 30 30, 21-62.

Seaton, G.J., Hall, L., Jones, R., 2000. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biol Reprod* 62, 1667-1676.

Seppälä, M., Taylor, R.N., Koistinen, H., Koistinen, R., Milgrom, E., 2002. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 23, 401-430.

Sette, C., Bevilacqua, A., Bianchini, A., Mangia, F., Geremia, R., Rossi, P., 1997. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 124, 2267-2274.

Shadan, S., James, P.S., Howes, E.A., Jones, R., 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 253-265.

Si, Y., Okuno, M., 1993. Multiple activation of mouse sperm motility. *Mol Reprod Dev* 36, 89-95.

Si, Y., Okuno, M., 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 61, 240-246.

Silva, P.F., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.

Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.

Simons, K., Vaz, W.L., 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, 269-295.

Sirivaidyapong, S., Bevers, M., Colenbrander, B., 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J Androl* 20, 537-544.

---

Stein, D.M., Fraser, L.R., 1984. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation in vitro. *Gamete Research* 10, 283–299.

Stice, S.L., Robl, J.M., 1990. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Molecular Reproduction and Development* 25, 272-280.

Storey, B.T., Lee, M.A., Miller, C., Ward, C.R., Wirtshafter, D.G., 1984. Mouse sperm bind to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus with acrosomes intact. *Journal of Cell Biology* 99, A395-A395.

Strzezek, J., Hopfer, E., Zaborniak, A., 1987. Zinc-ion dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Anim Reprod Sci.* 13, 133-142.

Strzezek, J., 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol* 2, 243-266.

Suárez, S.S., Dai, X.B., DeMott, R.P., Redfern, K., Mirando, M.A., 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl* 13, 75-80.

Suárez, S.S., 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* 58, 1105-1107.

Suárez, S.S., 2001. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs* 168, 105-112.

Suárez, S.S., Ho, H.C., 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* 38, 119-124.

Suárez, S.S., Pacey, A.A., 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update* 12, 23-37.

Suárez, S.S., 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14, 647-657.

Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., Frenette, G., 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35, 1-10.

Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J., 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9, 483-491.

Sun, Q.Y., 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique* 61, 342-348.

---

Sun, T.T., Chung, C.M., Chan, H.C., 2011. Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein Cell* 2, 92-98.

Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G., 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol* 188, 75-84.

Sutovsky, P., Wu, A.T.H., Takahashi, D., Benmusa, A., Schatten, G., Dominko, T., Oko, R., 2001. Oocyte activation by mammalian sperm perinuclear theca proteins PT 32 and tyrosine kinase c-Yes. *Molecular Biology of the Cell* 12, 114A-114A.

Sutovsky, P., 2010. Sperm capacitation, the acrosome reaction and fertilization., In: Carrell, D., T. and Peterson, C.M. (Eds.), In: *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice.*, Springer Science Business Media., New York, pp. 389–421.

Suttner, R., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Muller, S., Alberio, R., Medjugorac, I., Brem, G., Wolf, E., Stojkovic, M., 2000. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: Effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 54, 935-948.

Swann, K., 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110, 1295-1302.

Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J.L., Okamura, N., Dacheux, J.L., 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55, 956-974.

Sánchez-Peña, L.C., Reyes, B.E., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M.E., Quintanilla-Vega, B., 2004. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 196, 108-113.

Taberner, E., Morató, R., Mogas, T., Miró, J., 2010. Ability of Catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim Reprod Sci* 118, 354-361.

Talbot, P., Dandekar, P., 2003. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech* 61, 349-357.

Talevi, R., Gualtieri, R., 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 73, 796-801.

Tanphaichitr, N., Agulnick, A., Seibel, M., Taymor, M., 1988. Comparison of the in vitro fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and Percoll gradient centrifugation. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 5, 119-122.

---

Tanphaichitr, N., Smith, J., Kates, M., 1990. Levels of sulfogalactosylglycerolipid in capacitated motile and immotile mouse spermatozoa. *Biochem Cell Biol* 68, 528-535.

Tapia, J.A., Aparicio, I.M., García, M., Gil, M.C., and García-Marín, L.J., 2006. Técnicas de estudio de la señalización intracelular en espermatozoides., In: Bonet, S., Martínez, E., Rodríguez, J.E.a., Barrera, X. (Eds.), *Manual de técnicas de Reproducción Asistida en Porcino.*, Universitat de Girona- Servei de publicacions., Girona, España, pp. 93-124.

Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., Bailey, J.L., 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* 65, 784-792.

Tardif, S., Dubé, C., Bailey, J.L., 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68, 207-213.

Tash, J.S., 1989. Protein-phosphorylation: The 2nd messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 14, 332-339.

Teijeiro, J.M., Cabada, M.O., Marini, P.E., 2008. Sperm binding glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm. *J Cell Biochem* 103, 1413-1423.

Teijeiro, J., Ignatz, G., Marini, P., 2009. Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm-oviduct interaction. *Mol Reprod Dev* 76, 334-341.

Terada, Y., Luetjens, C.M., Sutovsky, P., Schatten, G., 2000. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril* 74, 454-460.

Tesarik, J., Sousa, M., 1994. Comparison of Ca<sup>2+</sup> responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 62, 1197-1204.

Thibault, C., Gerard, M., 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* 13, 145-&.

Tian, J.H., Wu, Z.H., Liu, L., Cai, Y., Zeng, S.M., Zhu, S.E., Liu, G.S., Li, Y., Wu, C.X., 2006. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 66, 439-448.

Tienthai, P., Kjellen, L., Pertoft, H., Suzuki, K., Rodríguez-Martínez, H., 2000a. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the

---

tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reproduction Fertility and Development* 12, 173-182.

Tienthai, P., Suzuki, K., Pertoft, H., Kjellen, L., Rodríguez-Martínez, H., 2000b. Production of glycosaminoglycans by the porcine oviduct in relation to sperm storage. *Reproduction in Domestic Animals* 35, 167-170.

Tienthai, P., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H., 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 80, 131-146.

Tollner, T.L., Vandervoort, C.A., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., Cherr, G.N., 2009. Release of DEFB126 from macaque sperm and completion of capacitation are triggered by conditions that simulate periovulatory oviductal fluid. *Mol Reprod Dev* 76, 431-443.

Toshimori, K., 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* 293, 177-187.

Travis, A.J., Kopf, G.S., 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110, 731-736.

Tuck, R.R., Setchell, B.P., Waites, G.M., Young, J.A., 1970. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflugers Arch* 318, 225-243.

Turner, T.T., 1991. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis., *The Male Germ Cell: Spermatogonium to fertilization*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, pp. 364–383.

Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Sanz, L., Sinowatz, F., 1995. Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. *Andrologia* 27, 303-324.

Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlesi-Hundrieser, M., Dostàlovà, Z., Sanz, L., Calvete, J.J., 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, 217-224.

Töpfer-Petersen, E., 1999a. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update* 5, 314-329.

Töpfer-Petersen, E., 1999b. Molecules on the sperm's route to fertilization. *J Exp Zool* 285, 259-266.

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsołova, M., Leeb, T., Kirchhoff, C., Müller, P., 2005. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia* 37, 202-204.

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Tsołova, M., 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *Int J Dev Biol* 52, 717-736.

---

Udby, L., Bjartell, A., Malm, J., Egesten, A., Lundwall, A., Cowland, J.B., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2005. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl* 26, 333-342.

Uehara, T., Yanagimachi, R., 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 15, 467-470.

Urner, F., Leppens-Luisier, G., Sakkas, D., 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* 64, 1350-1357.

Urner, F., Sakkas, D., 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 125, 17-26.

Usselman, M.C., Cone, R.A., 1983. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by immobilin, a high molecular-weight glycoprotein. *Biology of Reproduction* 29, 1241-1253.

Vadnais, M.L., Galantino-Homer, H.L., Althouse, G.C., 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl* 53, 109-123.

Vajta, G., Rienzi, L., Cobo, A., Yovich, J., 2010. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reproductive Biomedicine Online* 20, 453-469.

Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T.A., Damjanovich, S., 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8053-8058.

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.

Vijayasathy, S., Balaram, P., 1982. Regional differentiation in bull sperm plasma-membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108, 760-769.

Viring, S., Einarsson, S., 1980. Influence of boar seminal plasma on the distribution of spermatozoa in the genital tract of gilts. *Acta Vet Scand* 21, 598-606.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.

Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-1150.

---

Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59, 1-6.

Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., Kopf, G.S., 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214, 429-443.

Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., Diekman, A.B., 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53, 133-150.

Visconti, P.E., 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 667-668.

Visconti, P.E., Florman, H.M., 2010. Mechanisms of sperm-egg interactions: between sugars and broken bonds. *Sci Signal* 3, pe35.

Voglmayr, J.K., Setchell, B.P., White, I.G., 1971. Effects of heat on metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 24, 71.

Voglmayr, J.K., Amann, R.P., 1973. Glucose metabolism and lipid synthesis of cauda epididymal and ejaculated bull spermatozoa in the presence of selected androgens. *Acta Endocrinol (Copenh)* 73, 196-208.

Voglmayr, J.K., Sawyer, R.F., Dacheux, J.L., 1985. Glycoproteins: A variable factor in surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biology of Reproduction* 33, 165-176.

Vredenburg-Wilberg, W.L., Parrish, J.J., 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* 40, 490-502.

Wang, W.H., Day, B.N., Wu, G.M., 2003. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microscopy Research and Technique* 61, 335-341.

Wassarman, P.M., Litscher, E.S., 1995. Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 30 30, 1-19.

Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., Williams, Z., 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 285, 251-258.

Wassarman, P.M., 1999. The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization. *J Reprod Fertil* 116, 211-216.

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-492.

---

Weerachayanukul, W., Rattanachaiyanont, M., Carmona, E., Furimsky, A., Mai, A., Shoushtarian, A., Sirichotiyakul, S., Ballakier, H., Leader, A., Tanphaichitr, N., 2001. Sulfogalactosylglycerolipid is involved in human gamete interaction. *Mol Reprod Dev* 60, 569-578.

Wennemuth, G., Carlson, A.E., Harper, A.J., Babcock, D.F., 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup> -channel responses: initial events in sperm activation. *Development* 130, 1317-1326.

White, D., Weerachayanukul, W., Gadella, B., Kamolvarin, N., Attar, M., Tanphaichitr, N., 2000. Role of sperm sulfogalactosylglycerolipid in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol Reprod* 63, 147-155.

Williams, C.J., Mehlmann, L.M., Jaffe, L.A., Kopf, G.S., Schultz, R.M., 1998. Evidence that G(q) family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Developmental Biology* 198, 116-127.

Williams, C.J., 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update* 8, 313-321.

Wolny, Y.M., Fissore, R.A., Wu, H., Reis, M.M., Colombero, L.T., Ergun, B., Rosenwaks, Z., Palermo, G.D., 1999. Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca<sup>2+</sup> release in mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 52, 277-287.

Wong, P.Y.D., 1989. Potassium channel blockers inhibit anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. *Japanese Journal of Physiology* 39, 595-607.

Wong, P.Y.D., Huang, S.J., 1989. Intracellular pH measurement in primary monolayer-cultures of rat epididymal cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 413, 414-421.

Wu, J.T., Chiang, K.C., Cheng, F.P., 2006. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 93, 34-45.

Yanagida, K., Katayose, H., Hirata, S., Yazawa, H., Hayashi, S., Sato, A., 2001. Influence of sperm immobilization on onset of Ca(2+) oscillations after ICSI. *Human Reproduction* 16, 148-152.

Yanagimachi, R., Phillips, D.M., 1984. The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. *Gamete Research* 9, 1-19.

Yanagimachi, R., 1986. The acrosome reaction-analysis of its mechanism using guinea-pig spermatozoa. *Development Growth & Differentiation* 28, 3-4.

Yanagimachi, R., 1988. Sperm-egg fusion., In: Duzgunes, N.a.B., F, (Ed.), In: *Current Topics in Membranes and Transport*, Academic Press., Florida, pp. 3-43.

---

Yanagimachi, R., 1994a. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.

Yanagimachi, R., 1994b. Fertilization mechanisms in man and other mammals., In: Tesarik, J. (Ed.), *Male Factor in Human Infertility*, pp. 15-43.

Yanagimachi, R., 1994c. Stability of the mammalian sperm nucleus. *Zygote* 2, 383-384.

Yanagimachi, R., 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? *Biol Reprod*.

Yeste, M., Lloyd, R.E., Badia, E., Briz, M., Bonet, S., Holt, W.V., 2009. Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. *Anim Reprod Sci* 113, 263-278.

Yeung, C.H., Oberländer, G., Cooper, T.G., 1992. Characterization of the motility of maturing rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. *J Reprod Fertil* 96, 427-441.

Yeung, W.S., Lee, K.F., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P.C., Chiu, P.C., 2006. Roles of glycodelin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250, 149-156.

Yin, L., Chung, C.M., Huo, R., Liu, H., Zhou, C., Xu, W., Zhu, H., Zhang, J., Shi, Q., Wong, H.Y.C., Chen, J., Lu, Y., Bi, Y., Zhao, C., Du, Y., Ma, M., Cai, Y., Chen, W.Y., Fok, K.L., Tsang, L.L., Li, K., Ni, Y., Chung, Y.W., Zhou, Z., Sha, J., Chan, H.C., 2009. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 900-908.

Yoneda, A., Kashima, M., Yoshida, S., Terada, K., Nakagawa, S., Sakamoto, A., Hayakawa, K., Suzuki, K., Ueda, J., Watanabe, T., 2006. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C zeta. *Reproduction* 132, 393-401.

Yoshida, M., Kawano, N., Yoshida, K., 2008. Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3446-3457.

Yu, Y., Xu, W., Yi, Y.J., Sutovsky, P., Oko, R., 2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Dev Biol* 290, 32-43.

Zeng, Y., Clark, E.N., Florman, H.M., 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171, 554-563.

Zeng, Y., Oberdorf, J.A., Florman, H.M., 1996. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-), and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* 173, 510-520.

Zhang, H., Martin-Deleon, P., 2003. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* 24, 51-58.

Zini, A., De Lamirande, E., Gagnon, C., 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 16, 183-188.

Zirkin, B.R., Perreault, S.D., and Naish, S.J., 1989. Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization., In: Schatten, H.a.S., G. (Ed.), *In The Molecular Biology of Fertilization*, Academic Press., New York, pp. 91–114.

Zitta, K., Wertheimer, E.V., Miranda, P.V., 2006. Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *Mol Hum Reprod* 12, 557-563.

Zumoffen, C.M., Caille, A.M., Munuce, M.J., Cabada, M.O., Ghersevich, S.A., 2010. Proteins from human oviductal tissue-conditioned medium modulate sperm capacitation. *Hum Reprod* 25, 1504-1512.

