

**EFEECTO DEL TRATAMIENTO DE LOS
ESPERMATOZOIDES SOBRE LA
FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN EL CAPRINO**

Memoria presentada para aspirar al
grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad Autónoma de Barcelona

María Jesús Palomo Peiró-septiembre 1995

María Teresa Paramio Nieto, Profesora Titular de Producció Animal del Departament de Patologia i de Producció Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMA que María Jesús Palomo Peiró ha realizado su trabajo de investigación sobre el tema *Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la Fecundación in vitro en el caprino* en el Departament de Patologia i de Producció Animals bajo mi dirección, con la finalidad de aspirar al grado de Doctor.



Facultat de Veterinària

Data	22 ET. 1995
Entrada num.	94
Surtida num.	

María Teresa Paramio Nieto

María Jesús Palomo Peiró

Bellaterra, 21 de Septiembre de 1995



Biblioteca General
E-101 A
08193 Bellaterra (Barcelona) España

INDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1.BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN Y FECUNDACIÓN.	7
1.1. Maduración de los espermatozoides en el epidídimo	7
1.1.1. Adquisición de la madurez funcional	8
1.1.2. Cambios en el núcleo y acrosoma del espermatozoide	11
1.1.3. Cambios en la membrana plasmática	11
1.1.4. Metabolismo de los espermatozoides durante la maduración en el epidídimo	14
1.2. Plasma seminal	15
1.2.1. Factores de infecundidad del plasma seminal	15
1.3. Capacitación del espermatozoide	16
1.3.1. Capacitación in vivo	17
1.3.2. Bases moleculares de la capacitación	19
1.4. Reacción acrosómica	26
1.4.1. Agonistas naturales de la reacción acrosómica	27
1.4.2. Mecanismos moleculares de la reacción acrosómica	30
1.5. Hiperactivación de los espermatozoides	34
1.5.1. Significado biológico de la hiperactivación	34
1.5.2. Mecanismos de la hiperactivación	35
1.6. Fecundación	36
1.6.1. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito .	36
1.6.2. Fusión de los gametos	40
1.7. Activación del ovocito	41
1.7.1. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la polispermia	42
1.7.2. Reanudación de la meiosis	43
1.8. Formación de los pronúcleos	43
1.8.1. Descondensación del núcleo del espermatozoide	43

1.8.2. Formación y desarrollo de los pronúcleos	44
1.8.3. Migración de los pronúcleos y formación del huso de la primera división mitótica	44
2. CAPACITACIÓN <i>IN VITRO</i>	45
2.1. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica <i>in vitro</i> .	46
2.1.1. Modificación de la osmolaridad del medio	46
2.1.2. Modificación del pH	46
2.1.3. Uso de albúmina sérica bovina	46
2.1.4. Uso de fluido folicular y oviductal	47
2.1.5. Uso del ionóforo de calcio (A23187)	47
2.1.6. Adición de suero de oveja en celo	48
2.1.7. Electropermeabilización	48
2.1.8. Liposomas de fosfatidilcolina	48
2.1.9. Progesterona	49
2.1.10. Medio Tyrodes libre de calcio	49
2.1.11. Uso del <i>TEST-Yolk Buffer</i>	49
2.1.12. Heparina y otros glucosaminoglucanos	50
2.1.13. Papel de los β -aminoácidos y catecolaminas	52
2.1.14. Uso de cultivos de células epiteliales del oviducto	52
2.2. Factores que afectan la capacitación <i>in vitro</i>	53
2.2.1. Temperatura	53
2.2.2. Procedencia de los espermatozoides	53
2.2.3. Uso de semen fresco o congelado	54
2.2.4. Variaciones inter- e intraespecies	54
2.2.5. Presencia del cumulus	55
2.2.6. Composición del medio de capacitación <i>in vitro</i>	55
2.3. Valoración de la eficacia de los procesos de capacitación <i>in vitro</i> . . .	56
2.3.1. Técnicas morfológicas	56
2.3.2. Uso de Fluorescencia	58
2.3.3. Fijación espermatozoide-ovocito y tests de penetración de ovocitos	59
2.3.4. Otras técnicas de valoración espermática	59
3. FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	60
3.1. Preparación de los espermatozoides para la FIV	60
3.1.1. Lavado de los espermatozoides	60
3.1.2. Técnicas de selección de los espermatozoides	61
3.1.3. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática	63
3.2. Preparación de los ovocitos para la FIV	64

3.2.1. Procedencia de los ovocitos	64
3.2.2. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos foliculares de ovarios de matadero	64
3.3. Inseminación de los ovocitos	66
3.4. Factores que influyen sobre la eficacia de la FIV	67
3.4.1. Concentración de espermatozoides en el medio de inseminación	67
3.4.2. Tiempo de co-cultivo de los gametos	67
CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS	69
1.OBTENCIÓN DE GAMETOS, FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> Y CULTIVO DE EMBRIONES	70
1.1. Obtención, selección y maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos	70
1.1.1. Medio de maduración de los ovocitos	70
1.2. Obtención y preparación de los espermatozoides	70
1.2.1. Medio de lavado y pre-incubación espermática	71
1.3. Fecundación <i>in vitro</i>	71
1.3.1. Medio de fecundación	71
1.4. Cultivo de embriones	71
1.4.1. Medio de cultivo de los embriones	72
2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS	73
2.1. Valoración de la fecundación <i>in vitro</i>	73
2.2. Valoración de los espermatozoides	73
2.2.1. Procesado de las muestras de espermatozoides	73
2.2.2. Valoración de la motilidad	73
2.2.3. Valoración de la vitalidad y la reacción acrosómica	73
2.2.4. Validación de la T.S.T. simplificada con otras técnicas de valoración de la vitalidad y reacción acrosómica	75
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75

<i>CAPÍTULO 4: EFECTO DEL LAVADO Y SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES SOBRE LA FIV</i>	80
INTRODUCCIÓN	81
MATERIAL Y MÉTODOS	82
RESULTADOS	84
DISCUSIÓN	91
BIBLIOGRAFÍA	94
<i>CAPÍTULO 5: EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE LA CAPACITACIÓN CON HEPARINA SOBRE LA FIV</i>	97
INTRODUCCIÓN	98
MATERIAL Y MÉTODOS	99
RESULTADOS	100
DISCUSIÓN	107
BIBLIOGRAFÍA	109
<i>CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES EN LA FIV</i>	112
INTRODUCCIÓN	113
MATERIAL Y MÉTODOS	114
RESULTADOS	115
DISCUSIÓN	122
BIBLIOGRAFÍA	127
<i>CAPÍTULO 7: INFLUENCIA DE DISTINTOS PARÁMETROS SEMINALES SOBRE LA FIV</i>	131
INTRODUCCIÓN	132
MATERIAL Y MÉTODOS	133
RESULTADOS	134
DISCUSIÓN	140
BIBLIOGRAFÍA	143
<i>CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL</i>	146
<i>CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES</i>	150
<i>CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFIA</i>	152

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante las últimas décadas, gametos de la mayoría de especies mamíferas y no mamíferas han sido expuestos a diversas condiciones físicas y químicas con el fin de lograr que la fecundación tuviera lugar *in vitro*.

Thibault en 1954 obtuvo la primera evidencia citológica de ovocitos penetrados *in vitro* por espermatozoides recuperados del tracto genital de conejas sacrificadas. Aunque fue Chang en 1959, quien obtuvo la primera demostración de una auténtica fecundación *in vitro* en mamíferos, gracias al nacimiento de descendencia normal en conejos, después de transferir embriones de 4 células, obtenidos a partir de la inseminación de ovocitos ovulados con espermatozoides que habían sido incubados en útero.

Estos importantes acontecimientos tuvieron lugar gracias a estudios básicos de la fisiología del espermatozoide, pero fundamentalmente fueron logrados gracias al descubrimiento por Austin en 1951 de la necesidad de los espermatozoides de rata y de conejo de sufrir un cambio fisiológico en el tracto reproductivo femenino antes de ser capaces de penetrar el ovocito. Independientemente Chang observó el mismo fenómeno en conejos el mismo año, aunque fue Austin en 1952 quién introdujo el término de *capacitación* para denominar a este proceso de preparación fisiológica del espermatozoide para la fecundación.

Tras estos primeros estudios, se hicieron verdaderos esfuerzos en desarrollar y mejorar la tecnología de la fecundación *in vitro* (FIV), así como en el estudio de la fisiología de los gametos, obteniéndose una década más tarde descendencia viva tras la transferencia de embriones en ratón (Whittingham, 1968). Pero a pesar del descubrimiento de la capacitación por Chang y Austin y los éxitos obtenidos, el conocimiento sobre este proceso permanece todavía incompleto.

El hecho que espermatozoides epididimarios pudieran ser capacitados, sin el acondicionamiento proporcionado por el tracto genital femenino, fue descrito por vez primera en el hámster (Yanagimachi y Chang, 1963) y posteriormente en ratón (Toyoda y col., 1971a,b). Así pues, la capacitación *in vitro* de espermatozoides recogidos del epidídimo caudal produjo embriones capaces de desarrollarse a término en ratón (Miyamoto y Chang, 1972; Hoppe y Pitts, 1973) y también en rata (Toyoda y Chang, 1974). Tras estos progresos, se logró la capacitación *in vitro* de espermatozoides eyaculados de conejo puesta en evidencia con el nacimiento de descendencia mediante FIV (Brackett y Oliphant, 1975). Todos estos estudios sugirieron la existencia de diferencias entre espermatozoides eyaculados y epididimarios, diferencias en el tiempo de capacitación entre especies y en la eficacia de la capacitación bajo diferentes condiciones. Experimentos adicionales confirmaron cada una de estas hipótesis.

Paralelamente a estos estudios sobre la capacitación espermática, se realizaron estudios sobre la fisiología y la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos. Pero no fue hasta principios de los años 80 que se obtuvo la maduración y fecundación de los ovocitos totalmente *in vitro*, incluyendo también la capacitación espermática (Ball y col., 1983; Fukui y col., 1983a).

En la actualidad, se ha conseguido el nacimiento de animales mediante la FIV en numerosas especies, tanto de laboratorio y domésticas como en especies exóticas, acuáticas, aves, primates y con especial interés en humana (Steptoe y Edwards, 1978). Respecto a las especies

domésticas de interés ganadero, se han realizado en esta última década verdaderos avances en el desarrollo de la tecnología de la FIV, obteniéndose descendencia en la vaca (Brackett y col., 1982), en la cerda y oveja (Cheng y col., 1986) y en el caballo (Palmer y col., 1991).

Concretamente en la cabra, Hanada (1985a) obtuvo el primer nacimiento de un cabrito mediante la FIV de ovocitos madurados *in vivo* con espermatozoides capacitados con ionóforo de calcio A23187. La descripción morfológica de la unión espermatozoides-ovocito *in vitro* (Song y Iritani, 1985) y estudios ultraestructurales de cigotos de cabras obtenidos *in vivo* (Crozet y col., 1987a) revelaron hechos comunes a otras especies mamíferas. También se realizaron estudios sobre el análisis e inducción de la reacción acrosómica (Kusunoki y col., 1989) en espermatozoides eyaculados de cabras. En estos últimos años, varios grupos están realizando trabajos sobre MIV-FIV en esta especie (Younis y col., 1991; Chauhan y Anand, 1991 y De Smedt, 1992), obteniéndose el primer cabrito mediante estas técnicas en 1992 (Crozet y col., 1993).

Respecto a la importancia o utilidad de la FIV en animales domésticos, varias aplicaciones han sido sugeridas. Una de las contribuciones más importantes de esta tecnología es la obtención de un gran número de cigotos o embriones en fases tempranas para el estudio de aspectos básicos de los procesos reproductivos, así como para el desarrollo de nuevas tecnologías como la clonación y bisección de embriones, producción de animales transgénicos, quimeras, etc. Desde un punto de vista más práctico, la FIV puede contribuir a la mejora genética mediante la utilización de ovocitos y espermatozoides procedentes de animales de alto valor genético, favorecida por la extendida práctica de la congelación de gametos y embriones. Igualmente esta tecnología permite la obtención de descendencia a partir de hembras fuera de la edad reproductiva (prepúberes, viejas), así como es útil también para el tratamiento de algunos casos de infertilidad. Asimismo es también una importante herramienta dentro de las estrategias para la conservación de especies.

Actualmente, una de las aplicaciones más interesantes en las especies ganaderas parece ser su utilización como test de fertilidad, ya que los métodos rutinarios de contrastación seminal no presentan una buena correlación con los resultados de fertilidad *in vivo*. Por esta razón, la FIV, tanto homóloga como heteróloga, está siendo introducida en las técnicas de análisis seminal para la selección de reproductores como "indicador" de la capacidad fecundante de sus espermatozoides.

Tradicionalmente, los métodos de predicción de la fertilidad de los machos se han basado principalmente en el análisis descriptivo del semen como la valoración del volumen y concentración del eyaculado, la motilidad masal y progresiva, así como la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y morfológicamente normales, indicando todos ellos únicamente aspectos indirectos de la competencia funcional de los espermatozoides.

Aunque estos métodos convencionales incluyen la valoración del porcentaje de espermatozoides móviles, proporcionan una escasa información sobre la calidad de esta motilidad. En los últimos años una gran variedad de técnicas objetivas han sido incorporadas en los laboratorios para la valoración de las características del movimiento espermático, como los sistemas de análisis de la motilidad mediante ordenador (*Computer assisted semen analysis, CASA*). Estas técnicas permiten conocer componentes individuales del movimiento de los espermatozoides como la amplitud y frecuencia del bateo flagelar, la velocidad lineal

de progresión, la velocidad y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide entre otros muchos parámetros. No obstante, si los componentes particulares del movimiento son necesarios para las funciones específicas del espermatozoide o si defectos en estas características del movimiento pueden jugar algún papel en la capacidad fecundante de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro*, es todavía en la actualidad uno de los principales objetivos de investigación, especialmente en el estudio de la infertilidad humana. De hecho, algunos autores han señalado que la capacidad de penetración del mucus cervical parece ser una prueba más útil que las medidas de motilidad observadas microscópicamente (Mole y Fitzgerald, 1990).

Esta necesidad de nuevos tests de valoración de la calidad seminal más correlacionados con la fertilidad masculina ha provocado el estudio de otros aspectos del espermatozoide como la valoración de la integridad y funcionalidad de la membrana mediante la prueba de endósmosis celular o HOS test (*Hypoosmotic Swelling Test*), la cual parece ser un buen indicador de la viabilidad espermática (Jeyendran y col., 1984). Asimismo, varios autores han comprobado que el porcentaje de espermatozoides con integridad acrosómica presentes en una muestra seminal está altamente correlacionado con la fertilidad de la misma (Saacke y Marshall, 1968; Juneja y col., 1989).

También ha sido sugerido que el estudio de la capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides, inducida *in vitro* por la heparina, podría proporcionar un método de predicción de la fertilidad (Whitfield y Parkinson, 1992). Debido a que el proceso de la capacitación es difícilmente apreciable, la detección de espermatozoides que fisiológicamente sufren la reacción acrosómica ha sido el principal método para la valoración de ambos procesos. La reacción acrosómica que experimentan los espermatozoides capacitados puede ser determinada mediante el uso de tinciones que nos permiten diferenciar la reacción acrosómica verdadera de la falsa. Una de estas tinciones es la Triple Tinción descrita por primera vez en humana (Talbot y Chacon, 1981), la cual también ha sido posteriormente descrita en el caprino (Kusunoki y col., 1984).

Por otra parte, a pesar de la importancia de la calidad y competencia funcional espermática en el éxito de la FIV, pocos son los conocimientos que tenemos acerca de los cambios que sufren los espermatozoides durante la inducción *in vitro* de la capacitación y reacción acrosómica, siendo estos procesos valorados principalmente en función de las tasas de penetración obtenidas tras la FIV, lo cual puede dar lugar a errores, ya que existen otros muchos factores que influyen en la penetración de los ovocitos.

Desafortunadamente, en las especies domésticas existen pocos trabajos dedicados al estudio de posibles correlaciones entre diferentes parámetros seminales, valorados durante la preparación de los espermatozoides para la FIV, y las tasas de fecundación y división de ovocitos. Por el contrario, en humana, se han realizado considerables esfuerzos para determinar los efectos de la calidad seminal en las tasas de fecundación, debido especialmente a la necesidad de conocer el origen de ciertos casos de infertilidad y de desarrollar distintos protocolos de FIV para su tratamiento. No obstante, debido a la complejidad de la función fecundante, la predicción del éxito de la FIV es extremadamente difícil y parece requerir la integración de varios métodos laboratoriales que nos permitieran conocer la cantidad de espermatozoides funcionales y potencialmente fértiles existentes en una muestra seminal antes de su utilización, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

- 1- Estudiar el efecto de distintos sistemas de lavado y selección de los espermatozoides sobre los resultados de FIV de ovocitos de cabras prepúberes madurados *in vitro*.
- 2- Estudiar el efecto de la inducción *in vitro* de la capacitación espermática por heparina sobre los resultados de FIV.
- 3- Determinar la concentración óptima de espermatozoides en el medio de FIV.
- 4- Estudiar la incidencia de la reacción acrosómica espontánea y su relación con la tasa de penetración de los ovocitos de cabras prepúberes.
- 5- Estudiar la evolución de la motilidad, vitalidad e integridad del acrosoma durante el proceso de preparación de los espermatozoides para la FIV y su relación con los resultados de fecundación.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN Y FECUNDACIÓN

La fecundación es el proceso fisiológico que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de los gametos femenino y masculino. Este proceso se puede definir como el conjunto de complejas transformaciones que se producen en los dos gametos a partir de la interacción y fusión de ambos, lo cual conducirá a la asociación de los dos grupos haploides de cromosomas de origen materno y paterno, restableciendo así la diploidía para dar lugar a un individuo original.

Sin embargo, todo ello no es posible, si ambos gametos no han sufrido un proceso de maduración previo que les confiera esta competencia. En el caso del ovocito, dicha maduración corresponde a la maduración preovulatoria que se produce en el folículo ovárico, mientras que en el espermatozoide corresponde a la maduración posttesticular que ocurre, al menos, en tres diferentes estadios: a) *maduración epididimaria*, b) *capacitación espermática* y c) *reacción acrosómica*.

De hecho, los espermatozoides procedentes de los testículos son casi completamente inmóviles y no han adquirido todavía la capacidad de fecundar ovocitos (Bedford, 1987). Tras abandonar el epitelio de los túbulos seminíferos, los espermatozoides sufren una serie de profundas modificaciones morfológicas y fisiológicas, tanto en su paso a través del tracto genital masculino donde alcanzan su madurez funcional, como en el tracto genital femenino durante la capacitación (Bedford, 1975, 1987; Chang y Hunter, 1975), lo que les proporcionará la capacidad de sufrir la reacción acrosómica, haciéndoles capaces de penetrar la zona pelucida (ZP) y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (revisado por Kopf y Gerton, 1991).

Además de todos estos fenómenos claves para la fecundación como son la maduración en el epidídimo, capacitación y reacción acrosómica, también el cambio en el modelo de motilidad de los espermatozoides, como consecuencia de la capacitación y referida como *hiperactivación* (Yanagimachi, 1981), ha sido considerada esencial para la capacidad de penetrar y fecundar ovocitos (Fraser, 1981).

1.1. MADURACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES EN EL EPIDÍDIMO

El proceso de maduración de los espermatozoides dentro del epidídimo es un proceso complejo y secuencial. La secuencia exacta de todos los cambios que sufren los espermatozoides es desconocida y puede diferir entre especies, a pesar de que este proceso ha sido extensamente estudiado (ver revisiones Austin, 1985; Bellvé y O'Brien, 1983; Dacheux y Paquignon, 1980; Cooper, 1992).

No obstante, si es conocido que el alcance de este proceso de maduración implica una serie de modificaciones del espermatozoide que facilitarán o darán lugar a:

- Mantenimiento de genoma dentro de un núcleo altamente compactado y estable.
- Modificaciones en la membrana plasmática, mitocondrias, fibras y componentes microtubulares de las piezas media y principal que darán lugar a la motilidad progresiva.
- Desarrollo de características de superficie capaces de prolongar la supervivencia dentro el microambiente del tracto genital femenino.
- Mantenimiento de las membranas acrosomales y plasmática como estructuras estables hasta que se produzcan las modificaciones que conducirán a la reacción acrosómica.

-Formación o exposición de una necesaria concentración de lugares de unión en la membrana plasmática sobre la cabeza del espermatozoides para permitir la unión a la zona pelúcida y membrana vitelina del ovocito. (revisado por Amann, 1988).

1.1.1. Adquisición de la madurez funcional

Aunque se ha demostrado que los principales cambios morfológicos y bioquímicos que sufren los espermatozoides ocurren durante su tránsito epididimario, no ha sido posible relacionar estos cambios con la maduración funcional, la cual culmina con un espermatozoide altamente móvil y con completa capacidad para la fecundación (revisado por Orgebin-Crist, 1969).

No obstante, se ha demostrado que la actividad del epidídimo promueve la diferenciación posttesticular de los espermatozoides mamíferos (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983). Sin embargo, cada región del epidídimo tiene una función específica, siendo el cuerpo del epidídimo una región especialmente crítica para el desarrollo de la capacidad fecundante y de la motilidad (Dacheux y Paquignon, 1980). Teniendo en cuenta que el lugar preciso de la maduración varía entre especies y que no todos los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante simultáneamente; se considera que no es hasta que entran en la cola del epidídimo que la gran mayoría de los espermatozoides alcanzan su pleno potencial fecundante (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983, Yanagimachi, 1988,1994).

En el ovino, la fertilidad de los espermatozoides de la porción proximal y distal de la cola del epidídimo es equivalente a la de los espermatozoides eyaculados mediante inseminación intrauterina (Amann, 1987). Asimismo, ha sido demostrado que los espermatozoides de la porción distal del cuerpo del epidídimo en el morueco son capaces de fecundar ovocitos, sin embargo, los embriones resultantes presentaron una alta probabilidad de morir en el útero (Fournier-Delpech y col., 1979). Así pues, la maduración dentro del epidídimo no es completa hasta que el espermatozoide ha adquirido motilidad, fertilidad y capacidad de inducir un desarrollo embrionario normal.

En general, se considera que la maduración del espermatozoide se completa cuando el espermatozoide alcanza el segmento distal de la cola del epidídimo. Esto es probablemente cierto para la mayoría de especies mamíferas. Sin embargo, en especies donde los espermatozoides son almacenados en el tubo deferente por algún tiempo antes de ser eyaculados es probable que la maduración pueda continuar o ser completada en este segmento del tracto genital masculino (Yanagimachi, 1988).

Adquisición de la motilidad

Aunque todas las estructuras del aparato flagelar están ya establecidas cuando el espermatozoide abandona el testículo, la motilidad flagelar de los gametos no aparece hasta que éstos han alcanzado la región anterior del epidídimo, siendo ésta una de las modificaciones más evidentes que sufren los espermatozoides durante su tránsito epididimario (Dacheux y col., 1990). No obstante, la adquisición de la motilidad no implica necesariamente una indicación de capacidad fecundante, aunque ésta última se alcanza al mismo tiempo o ligeramente después de que el espermatozoide es móvil (Fournier-Delpech y col., 1979; Dacheux y Paquignon, 1980).

La incapacidad de los espermatozoides testiculares de moverse probablemente se debe, al menos en parte, a la inmadurez de la membrana plasmática, ya que éstos pueden moverse casi tan activamente como los espermatozoides maduros de la cola del epidídimo si son desmembrados y expuestos a ATP, AMPc y Mg^{++} (White y Voglmayr, 1986, revisado por Yanagimachi, 1988,1994). De hecho, la aparición de movimiento flagelar en los espermatozoides epididimarios de cerdo coincide con grandes cambios en la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides, a pesar de no haberse observado ninguna relación entre los compuestos de superficie de la membrana y la actividad flagelar (Bork y col., 1988).

Se ha demostrado que el porcentaje de espermatozoides móviles (incluidas todos los movimientos flagelares) aumenta a través de la región anterior y es máximo en el cuerpo del epidídimo (Paquignon y col., 1983); teniendo en cuenta que la evolución del movimiento flagelar y la localización precisa de estas modificaciones en el epidídimo varían entre especies (Gaddum, 1968).

En el ovino, el movimiento flagelar de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo se caracteriza por la presencia de una gran curvatura estática en la primera parte del flagelo y oscilaciones flagelares sin aparentes ondas propagadoras (Dacheux y col., 1990). En el cuerpo del epidídimo, la mayoría de los espermatozoides presentan un movimiento circular y desplazamientos erráticos debidos a movimientos transitorios del flagelo. El movimiento de estos espermatozoides se caracteriza por unas curvaturas muy asimétricas y varios lugares de inicio de ondas (Dacheux y col., 1990).

De todas formas, se ha de tener en cuenta que las condiciones de estudio pueden influir y modificar la motilidad, así como presentar errores de valoración. Aunque todavía son escasas las evidencias sobre la inmovilidad *in situ*, los espermatozoides son aparentemente quiescentes en el epidídimo y son activos durante la eyaculación o en condiciones *in vitro*, después de diluir intensamente las muestras (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983; Setchell, 1991).

Aparición de la motilidad progresiva

La maduración del movimiento flagelar se caracteriza por un incremento del bateo del flagelo y la aparición de una curvatura simétrica, lo que provoca la aparición de una motilidad progresiva y de rotación de los espermatozoides de la última parte del epidídimo (Bork y col., 1988; Dacheux y col., 1990).

La *forward motility protein* (FMP) bovina ha sido descrita como una glicoproteína de origen epididimario que se une al espermatozoide a medida que atraviesa el epidídimo (Acott y Hoskins, 1981; Brandt y col.,1978). Según Amann (1988) y Hoskins y col. (1978), la motilidad progresiva es adquirida tras la exposición de los espermatozoides a esta FMP exógena, la cual parece inducir cambios en la membrana y estructuras subyacentes relacionadas con el metabolismo y/o transducción de ATP al aparato flagelar.

Por otra parte, Harper (1987) sugiere que la adquisición de esta motilidad progresiva parece ser más una función de la edad del espermatozoide que del microambiente de las distintas regiones del epidídimo.

Control de la motilidad

-Papel del AMPc y enzimas relacionados

La motilidad de los espermatozoides epididimarios está controlada por vías reguladoras que implican al AMPc. Los niveles de AMPc parecen estar regulados principalmente por la actividad AMPc-fosfodiesterasa del espermatozoide, la cual disminuye a lo largo del epidídimo. De esta manera, los efectos estimuladores de la motilidad son mediados por incremento de la concentración intracelular de AMPc (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983). De hecho, ha sido demostrado que la motilidad de los espermatozoides aumenta en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa (como la cafeína) o en presencia de análogos del AMPc (como el dibutilil AMPc) (Garbers y Kopf, 1980).

Lindemann (1978) puso en evidencia que el AMPc podía activar directamente el sistema flagelar. Sin embargo, el efecto del AMPc en la motilidad parece estar mediado vía fosforilación de proteínas según el modelo clásico de acción del AMPc. Concretamente, Tash y Means (1982) demostraron que el AMPc estimulaba la fosforilación de proteínas, así como la motilidad. Además, existen evidencias de que la fosforilación de una proteína de 55 Kda podría estar correlacionada con la motilidad (Brandt y Hoskins, 1980).

La correlación entre la actividad proteína-kinasa y los bateos flagelares evidencian que las fosforilaciones de las proteínas dependientes del AMPc están implicadas en el proceso de la motilidad. Sin embargo, esta actividad enzimática aumentada está asociada solamente al porcentaje de espermatozoides móviles, y no con la aparición de la motilidad progresiva que ocurre más tarde en el epidídimo (Pariset y col., 1985). De hecho, Hoskins y col. (1978) ya sugirieron que el AMPc sólo no era suficiente para la iniciación de la motilidad progresiva normal, indicando que el desarrollo de este tipo de motilidad dependía, al menos, de 2 factores, del incremento de los niveles intracelulares de AMPc y de la unión a una proteína específica de la motilidad progresiva (FMP) a la superficie del espermatozoide (Hoskins y col., 1978).

-Papel del calcio

Se ha demostrado que el Ca^{++} regula la curvatura del axonema de los espermatozoides (revisado por Dacheux y col., 1990). Aunque el papel del Ca^{++} en la modificación de la curvatura durante el tránsito epididimario es todavía incierto, ha sido postulado que el efecto del Ca^{++} podría estar mediado por su unión a la calmodulina presente en los flagelos (Lindemann y Kanous, 1989).

También se han descrito interacciones entre el Ca^{++} y el AMPc en espermatozoides de rata, donde un descenso del Ca^{++} intracelular está acompañado de un incremento del AMPc, motilidad y curvatura del flagelo (Lindemann y col., 1987).

- Carnitina y acetilcarnitina

Se ha encontrado una relación entre la concentración de carnitina en el fluido epididimario y la motilidad (revisado por Dacheux y col., 1990). En los espermatozoides, la carnitina es rápidamente acetilada y de esta forma puede estar implicada indirectamente en el suministro

de energía a los gametos. La concentración de carnitina aumenta en el fluido y en los espermatozoides desde el cuerpo hasta la región distal del epidídimo (Besançon y col., 1985). Durante el tránsito epididimario, el incremento en el porcentaje de espermatozoides móviles ocurre antes de que la concentración de carnitina aumente. Sin embargo el porcentaje de espermatozoides progresivos está siempre asociado a la concentración intracelular de carnitina y acetilcarnitina. Esto sugiere que la carnitina no está directamente implicada en el inicio de la motilidad de los espermatozoides, pero puede ser un importante factor metabólico en los altos requerimientos energéticos de los espermatozoides progresivos (Dacheux y col., 1990).

- *Otros factores de la motilidad*

Aparentemente, la energía no es un factor limitante de la motilidad, ya que los espermatozoides pueden metabolizar una gran variedad de sustratos exógenos (Voglmayr, 1975). Además, se ha observado que las concentraciones de ATP son similares en los espermatozoides de morueco eyaculados o testiculares (Voglmayr, 1975).

Existen estudios que indican la existencia de factores de mantenimiento o promoción de la motilidad y de factores de supervivencia en el fluido epididimario del macho (revisado por Mandal y col., 1989). Sin embargo, existen otros factores como el *quiescence factor* en el fluido epididimario de toro que interacciona con el pH para mantener los espermatozoides inmóviles en el epidídimo. Este factor parece ser bastante distinto a la *inmobilina* de rata que parece actuar por virtud de su alta viscoelasticidad (revisado por Setchell, 1991).

1.1.2. Cambios en el núcleo y acrosoma del espermatozoide

Durante la maduración epididimal, la morfología del núcleo no cambia drásticamente, pero se produce un incremento de la estabilidad de la cromatina que puede atribuirse a un incremento progresivo de fuertes puentes disulfuro (-S-S-) entre las protaminas ricas en cisteínas, características del núcleo de los espermatozoides mamíferos (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983; Bedford, 1987; Yanagimachi, 1988,1994). También se ha observado que otras estructuras del espermatozoides como ciertos componentes de la cola (fibras densas externas, vaina fibrosa y membranas mitocondriales) se estabilizan mediante puentes disulfuro pudiendo afectar a las características del movimiento natatorio del espermatozoide maduro (Bedford y Calvin, 1974).

En la mayoría de especies mamíferas, se han descrito cambios en la forma y estructura del acrosoma muy poco prominentes, a excepción de algunas especies como la cobaya y la chinchilla, donde estos cambios son mucho más marcados (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983; Yanagimachi, 1988,1994).

1.1.3. Cambios en la membrana plasmática

La osmolaridad y composición química del fluido secretado por el epidídimo varía de un segmento a otro (Dacheux y col., 1989; revisado por Yanagimachi, 1988), por lo que es razonable esperar que la membrana plasmática del espermatozoide, la cual está expuesta directamente al fluido, se altere paso a paso a medida que el espermatozoide transita por las distintas regiones del epidídimo. No hay duda que la membrana plasmática es una de las partes del espermatozoide más susceptible a modificaciones durante la maduración (Holt,

1984; revisado por Yanagimachi, 1988,1994).

Además, debido a que los espermatozoides tienen una limitada capacidad de biosíntesis, la interacción del espermatozoide con el fluido que le rodea podría dar lugar a la eliminación, enmascaramiento o desenmascaramiento de componentes de superficie preexistentes, así como a la adsorción e incorporación de polipéptidos del fluido epididimal (revisado por Dacheux y col., 1989). La importancia de todos estos cambios en la motilidad y fertilidad no está todavía bien establecida.

Así, el hecho de que el espermatozoide, a medida que atraviesa el epidídimo, incrementa su capacidad a unirse a la zona pelúcida del ovocito (Cuasnicu y col., 1984; Peterson y col., 1986; Saling, 1982), indica claramente una alteración química de la membrana plasmática del espermatozoide. Otras propiedades de la membrana plasmática como la resistencia al choque térmico y la densidad de carga también son alteradas durante el paso a través del epidídimo (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983).

Estudios realizados mediante criofractura han revelado que las partículas intramembranarias (IMP) muestran distribuciones regionales específicas. Durante el transporte epididimario, se produce una redistribución de estas partículas. Varios modelos de IMP han sido observados en los espermatozoides epididimarios de varias especies, siendo el modelo hexagonal, el modelo más comúnmente observado en las especies estudiadas (revisado por Suzuki, 1990). La presencia de estos distintos modelos en la membrana plasmática pueden reflejar las características dinámicamente cambiantes de la membrana, así como de la fluidez de la membrana durante el transporte epididimario (Wolf y Voglmayr, 1984).

En espermatozoides de rata de la porción central de la cabeza del epidídimo, se ha observado una acumulación de un *variable glycocalyx material* (VGM) sobre la superficie externa de la membrana plasmática periacrosomal, el cual se desprende en la cola proximal del epidídimo. El origen de este VGM es oscuro, aunque podría ser sintetizado por las células epiteliales epididimarias y posteriormente ser acumulado en la superficie del espermatozoide. La presencia de este VGM parece estabilizar los modelos de las IMP (revisado por Suzuki, 1990).

Un fenómeno similar ha sido descrito en espermatozoides de hámster chino, donde se ha podido observar muchas estructuras vesiculares y tubulares en y cerca de la membrana plasmática que cubre el acrosoma, pero no en otras regiones de esta membrana (revisado por Yanagimachi, 1988). Aunque en la mayoría del resto de especies, no ha sido posible ver tan claramente estas estructuras en la superficie del espermatozoide a lo largo de su maduración, la adición de materiales de revestimiento a partir de la secreción epididimaria puede ser considerada como un cambio estabilizador o protector del espermatozoide (revisado por Suzuki, 1990).

Mecanismos responsables de los cambios en la membrana

La membrana plasmática de los espermatozoides testiculares se caracteriza por la presencia principalmente de proteínas especie-específicas de gran peso molecular (PM). Algunas de ellas han sido identificadas como una proteína de 105-115 Kda en espermatozoides de cerdo (Dacheux y col., 1989), una de 95-119 KDa en el morueco (Dacheux y Voglmayr, 1983), una

de 110-130 KDa en la rata (Jones y col., 1981) y una de 110 KDa en el hombre (Dacheux y col., 1987). La mayoría de estas proteínas superficiales desaparecen gradualmente en la primera parte del epidídimo, aunque otras son eliminadas muy rápidamente como es el caso de un componente de 75-97 KDa en espermatozoides de cerdo (Dacheux y col., 1989) y de 78-88 KDa en espermatozoides de morueco (Dacheux y Voglmayr, 1983).

Sin embargo, la mayoría de estos polipéptidos que desaparecen de la superficie del espermatozoide no se encuentran nunca en el plasma epididimario, lo que sugiere que son probablemente degradados durante su liberación. En cambio, otros todavía presentes en el extracto de la membrana, se hacen inaccesibles al proceso de marcaje, gracias a la internalización o enmascaramiento por otros componentes o por modificaciones en sus residuos azucar. Asimismo, la desaparición de estas proteínas está asociada algunas veces a la aparición de otras nuevas (Dacheux y col., 1989; Dacheux y Voglmayr, 1983). Algunos de estos cambios han sido mediados por actividades enzimáticas tipo galactosiltransferasa y sialotransferasa en el fluido epididimario, por una sustancia similar a la α -lactoalbúmina que regula la glicosilación de las glicoproteínas de la superficie del espermatozoide o por asociación de nuevos componentes exógenos capaces de enmascarar otros polipéptidos (revisado por Yanagimachi, 1988,1994) como es el caso de la glicoproteína de 105-110 KDa de la superficie del espermatozoide de cerdo (Dacheux y col., 1989).

Entre los nuevos componentes de superficie de la membrana del espermatozoide durante el tránsito, la mayoría se caracterizan por un bajo PM (rango 14-36 KDa) y un alto nivel de glicosilación (revisado por Dacheux y col., 1990). La mayoría de estas proteínas de bajo PM parecen ser especie-específicas. Algunas de ellas se unen a la membrana sólo durante la maduración y desaparecen en el tracto genital femenino (Gould y col., 1984); en cambio otras todavía están presentes en la membrana del espermatozoide durante la fecundación del ovocito.

Modificación de la densidad de carga de la membrana

Como se ha citado anteriormente, otra indicación de modificación química de la membrana es el cambio en la carga neta negativa de la superficie del espermatozoide durante la maduración (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994). Este incremento de cargas aniónicas puede ser debido principalmente a la adición de residuos de ácido siálico (Holt, 1980) y/o debido a un incremento del contenido de esterol sulfato (Yanagimachi y col., 1972).

Posiblemente, las variaciones en la densidad y distribución de carga están relacionadas con la tendencia incrementada de los espermatozoides a aglutinarse observada en muchas especies (Bedford,1975). Esta aglutinación es una propiedad específica de los espermatozoides y del ambiente epididimario que se observa sólo después de diluirlo, lo que sugiere la existencia de un componente en el fluido del epidídimo que previene la aglutinación *in vivo*.

Por otra parte, la aglutinación *head-to-head* sólo se observa en determinadas regiones del epidídimo, siendo máxima en la región posterior de la cabeza y desaparece completamente en la cola del epidídimo. Los espermatozoides testiculares diluidos no exhiben una intensa aglutinación y esto se puede atribuir a que la aparición de la aglutinación se relaciona con una modificación progresiva en la membrana de la región acrosomal (Dacheux y col., 1983). También se ha observado que la aparición de aglutinación coincide con la aparición de

motilidad y precede a la capacidad de unirse intensamente a los ovocitos.

Cambios en los lípidos de membrana

Las glicoproteínas no son los únicos componentes de la membrana que cambian durante la maduración epididimaria. También los lípidos cambian su composición, así como sus propiedades físicas y químicas (revisado por Yanagimachi, 1988,1994). Algunos de estos cambios en la composición y contenido de lípidos podrían causar diferencias en la susceptibilidad al choque térmico, en la fluidez de membrana o cambios en la permeabilidad de ésta, como sería de esperar tras la pérdida de fosfolípidos y/o incremento de los ácidos grasos poliinsaturados (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983).

Los cambios en el modelo de distribución de las partículas proteicas (glicoproteínas) dentro de la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito epididimario, parecen reflejar o inducir cambios tanto en las proteínas como en los lípidos, como se evidencia en un aumento en la relación esterol-fosfolípidos, una disminución de las cantidades relativas de fosfolípidos y cambios en los ácidos grasos predominantes en los fosfolípidos. (Amann, 1988; Yanagimachi, 1988,1994).

El hecho de que el epidídimo, particularmente el cuerpo, tenga una elevada actividad de síntesis de colesterol (revisado por Yanagimachi, 1988,1994) puede sugerir que el colesterol sea una de las moléculas lipídicas integradas en la membrana durante la maduración. De hecho, a pesar de que el contenido lipídico total de los espermatozoides decrece durante la maduración epididimaria (revisado por Awano y col., 1993), se ha demostrado que la relación molar de colesterol:fosfolípidos aumenta en la membrana plasmática periacrosomal aislada durante el tránsito (en morueco: Parks y Hammerstedt, 1985).

Aunque la función de los esteroides en las membranas celulares no se conoce todavía exactamente, éstos son considerados determinantes esenciales de la estabilidad y permeabilidad de la membrana. Así, el aumento en la densidad de esterol en la membrana plasmática que cubre el acrosoma durante este tránsito podría estabilizar la membrana e inhibir la reacción acrosómica prematura durante el transporte a través del tracto genital masculino y femenino (revisado por Suzuki, 1990; Yanagimachi, 1994).

Es importante remarcar que la membrana plasmática de la cabeza no es la única porción de la membrana que sufre modificaciones durante la maduración epididimaria. También se ha descrito adsorción y/o integración de varias glicoproteínas específicas y otros péptidos en y dentro de la membrana plasmática de las regiones de la cola del espermatozoide (revisado por Yanagimachi, 1988).

1.1.4. Metabolismo de los espermatozoides durante la maduración en el epidídimo

Mientras algunos autores atribuyen a los espermatozoides una actividad respiratoria constante durante el tránsito o incluso un incremento de esta actividad en las partes terminales del tracto genital masculino (Voglmayr, 1975; Dacheux y Paquignon, 1980), Ferrandi y col. (1987) demuestran un descenso progresivo en el metabolismo oxidativo intramitocondrial de los espermatozoides de conejo desde el testículo al conducto deferente.

Ha sido postulado que las variaciones en el metabolismo de los espermatozoides (tasas alteradas de glicolisis y respiración) pueden ser consecuencias secundarias al desarrollo de la capacidad de motilidad (revisado por Bellvé y O'Brien, 1983). Asimismo, el comportamiento metabólico de los espermatozoides puede depender de las interacciones con los fluidos del epidídimo, los cuales cambian su composición en los distintos segmentos del conducto. De este modo, el ambiente epididimario podría ejercer un papel esencial en el metabolismo y desarrollo del gameto masculino (revisado por Ferrandi y col., 1987). De hecho, a medida que los espermatozoides maduran en su paso por el epidídimo, utilizan las reservas endógenas de sustratos metabólicos y se convierten en dependientes de los sustratos exógenos disponibles que metabolizan mediante actividad glicolítica más que por metabolismo oxidativo característico de los espermatozoides testiculares (revisado por Johnson y Everitt, 1988).

Por otra parte, en el ratón, Bragg y Handel (1979) postularon la existencia, en espermatozoides de la cola del epidídimo y conducto deferente, de una actividad enzimática relacionada con la síntesis proteica intramitocondrial sin actividad transcripcional nuclear. Los productos de esta síntesis son probablemente enzimas (citocromo oxidasa o ATPasa) implicadas en la producción de energía para la motilidad del espermatozoide, pudiendo permitir al espermatozoide utilizar estos nuevos enzimas o isoenzimas en su tránsito a través del tracto genital masculino y femenino.

1.2. PLASMA SEMINAL

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable. Este fluido puede no ser esencial para la función fecundante de los espermatozoides, ya que espermatozoides extraídos directamente del conducto deferente pueden fecundar ovocitos, e incluso obtener gestaciones en algunas especies con inseminación de espermatozoides del epidídimo.

Sin embargo, el plasma seminal parece ser esencial como transportador y protector de los espermatozoides en la mayoría de los procesos de apareamiento, así como por su contribución de factores nutricionales, especialmente en las especies en las que el eyaculado se deposita en la vagina (White y col., 1977). Por lo que la importancia de estas funciones puede variar dependiendo de la especie.

No obstante, durante el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, éstos van separándose progresivamente del plasma seminal, por lo que su economía se ve influida fuertemente por los fluidos luminales del útero y del oviducto. Esta situación parece tener un efecto directo sobre la actividad metabólica de los espermatozoides eyaculados, así como también puede estar relacionada con el desarrollo de la capacidad fecundante y el incremento de la movilidad de los espermatozoides (revisado por Hafez, 1989).

De hecho, los espermatozoides se desprenden de todo el plasma seminal antes de llegar al lugar de fecundación, independientemente de donde se deposite el semen durante el coito, siendo muy improbable que en los momentos próximos a la ovulación penetre plasma seminal en los tubos de Falopio (revisado por Hafez, 1989)

1.2.1. Factores de infecundidad del plasma seminal

Ciertos componentes del plasma seminal contribuyen positivamente a la fertilidad de los

espermatozoides, como por ejemplo los que ayudan al mantenimiento de la motilidad. Sin embargo, otros actúan como factores de infertilidad, los cuales serán eliminados durante la capacitación in vivo en el tracto genital femenino. Estos inhibidores están compuestos principalmente por proteínas que inhiben la motilidad, capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides (Shivaji y Bhargava, 1987).

Dentro de estos factores de infertilidad se encuentra el factor de estabilidad acrosómico (ASF), una glicoproteína aislado en el fluido epididimario de conejo (Eng y Oliphant, 1978), la cual inhibe reversiblemente la fecundidad de los espermatozoide bloqueando la reacción acrosómica. Otro factor proveniente de la región caudal del epidídimo ha sido aislado en el plasma seminal (conejo, morueco, toro y caballo) y corresponde a la fracción I de las vesículas membranas pesadas. Estas vesículas se unen a los espermatozoide y se fusionan a la membrana induciendo un modificación en su composición lipídica, aumentando la relación colesterol:fosfolípido y estabilizando la membrana plasmática, lo que prevendrá su fusión con la membrana acrosomal externa (Davis y col., 1978). Respecto a los factores inhibidores secretados por las glándulas anejas, se ha aislado la fracción II, correspondiente a las vesículas membranas ligeras, emitida por las vesículas seminales y por la próstata. Esta fracción induce efectos similares a los de la fracción I.

También han sido detectados en las diferente glándulas, tejidos y secreciones del tracto genital masculino ciertos inhibidores de proteasas. Estos tienen una actividad antifecundante, pero además otra de sus funciones consiste en proteger al tracto masculino de la actividad enzimática de la acrosina, la cual es liberada en caso de muerte fisiológica de los espermatozoide.

Además, las glándulas anexas sintetizan un polipéptido denominado *plasma seminal* que posee numerosas propiedades relacionadas con el hecho de que es un posible inhibidor de la captación de Ca^{++} (Lewis y col., 1985). Sin embargo, sus propiedades inhibitoras no se manifiestan en presencia de altas concentraciones de Ca^{++} o de una proteína, la *anti-plasma seminal* (Rao y Bhargava, 1985). De hecho, el sistema plasma y anti-plasma parece ser un mecanismo de regulación de la fecundación. (ver tesis Guyader).

1.3. CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides mamíferos, madurados en el epidídimo y eyaculados, son activamente móviles, pero incapaces de fecundar ovocitos. Los espermatozoides deben residir en el tracto reproductivo femenino por algún tiempo, donde sufren una serie de cambios fisiológicos (funcionales), antes de alcanzar la capacidad de fecundar ovocitos. El término *Capacitación* fue originariamente propuesto para referirse a estos cambios (Austin, 1952), aunque la capacitación fue descrita por primera vez, e independientemente, por Austin (1951) y Chang (1951).

La capacitación se puede definir como un cambio que proporciona a los espermatozoides la capacidad de sufrir la reacción acrosómica (Austin, 1967; Bedford, 1970; Yanagimachi, 1981). La reacción acrosómica es considerada como un fenómeno general en el reino animal, mientras que la capacitación es un fenómeno que se produce en los mamíferos y probablemente en muy pocos animales no mamíferos.

Aunque se han realizado numerosos estudios sobre los cambios que se producen en el espermatozoide durante la capacitación, los mecanismos moleculares de este proceso están todavía poco caracterizados, y el papel funcional de cada uno de ellos está todavía sujeto a debate. No obstante, se cree que uno de los principales eventos de este proceso es la alteración bioquímica de la membrana plasmática del espermatozoide. Una gradual eliminación y/o alteración de las glicoproteínas periféricas, reordenación de glicoproteínas integrales, reducción del colesterol de la membrana y cambios en la distribución y composición de ciertos fosfolípidos de membrana parecen contribuir, todos ellos, en esta alteración de membrana (Yanagimachi, 1981 1988; Cooper, 1986; Eddy, 1988).

Asimismo, la reversibilidad de la capacitación refleja la asociación/disociación de componentes superficiales, adquiridos durante el contacto con los fluidos epididimario y seminal que inhiben la expresión de la capacidad fecundante del espermatozoide (revisado por O'Rand, 1982; Oliphant y col., 1985). Se ha postulado que entre los cambios que sufre el espermatozoide, la eliminación de estos componentes superficiales *estabilizantes o factores de decapitación* adquiridos a partir de los fluidos reproductivos masculinos, es una parte importante del proceso de la capacitación (Chang, 1957; Eng y Oliphant, 1978).

La capacitación no es sitio-específico. En cobaya y hombre, por ejemplo, la capacitación es posible en la cavidad peritoneal y/o en oviducto sin que los espermatozoides hayan tenido que pasar a través del cérvix y útero (Asch y col., 1984; Forrler y col., 1986). La capacitación también puede ocurrir en una gran variedad de medios artificiales sin contribución alguna de la hembra, sugiriendo la naturaleza *espontánea* de la capacitación. Parece probable que la principal función del tracto genital femenino en la capacitación sea la de regular el proceso más que inducirlo. Además, por lo que se refiere a las condiciones o factores capacitantes naturales no parecen ser extremadamente especie-específicos, ya que espermatozoides y ovocitos de una especie pueden llevar a cabo la fecundación en el tracto genital femenino de otra especie (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

El tiempo necesario para la capacitación varía entre especies (Austin, 1985) e igualmente dentro de una misma especie puede variar en función del momento del apareamiento o inseminación respecto al estado hormonal de la hembra, más concretamente a la ovulación (Smith y Yanagimachi, 1989). Asimismo, parece improbable que todos los espermatozoides de una misma población completen la capacitación simultáneamente, debido a posibles diferencias fisiológicas individuales entre los espermatozoides. También la composición del medio al que están expuestos los espermatozoides influye marcadamente en el tiempo de capacitación (Yanagimachi, 1988, 1994).

En la mayoría de sistemas de F.I.V., se utiliza un único medio para la capacitación. Sin embargo, *in vivo*, los espermatozoides son expuestos secuencialmente a distintos fluidos secretados por los diferentes segmentos del tracto genital femenino, por lo que es sumamente probable que los espermatozoides sean capacitados bajo condiciones mucho más complejas y mejor controladas que *in vitro*.

1.3.1. Capacitación in vivo

En la mayoría de especies mamíferas, la capacitación tiene lugar normalmente en el tracto genital de una hembra en celo. No obstante, el intervalo desde el inicio del celo hasta la

ovulación puede ser de varias horas o incluso días (Hunter, 1988a). Asimismo, la hembra puede ser cubierta después de la ovulación, por lo que la capacidad del tracto femenino de controlar la velocidad de la capacitación y de proporcionar suficientes espermatozoides recién capacitados para fecundar todos los ovocitos ovulados es una de las más importantes funciones del tracto genital femenino, especialmente en aquellas especies que ovulan muchos ovocitos durante un extenso periodo de tiempo (revisado por Yanagimachi, 1994).

Desafortunadamente, no se conocen las condiciones o factores que directamente controlan la capacitación dentro del tracto genital femenino. Sin embargo, varias sustancias han sido sugeridas como posibles factores reguladores de la capacitación o capacitantes fisiológicos de los espermatozoides. Entre ellos se incluyen los glicosaminoglicanos (Handrow y col., 1984), catecolaminas (Helm y col., 1982), taurina e hipotaurina (Meizel y col., 1980), albúmina (Langlais y Roberts, 1985) y la esteroide sulfatasa (Langlais y Roberts, 1985; Legault y col., 1980) entre otros muchos enzimas (revisado por Yanagimachi, 1988).

Respecto al lugar donde el espermatozoide fecundante inicia y completa la capacitación, éste puede variar entre especies, dependiendo del lugar de depósito del semen durante el coito. Aunque es muy probable que muchas o, quizás, todas las partes del tracto reproductor femenino tengan el potencial de capacitar espermatozoides, el segmento inferior del oviducto (istmo) parece jugar un papel más importante en el depósito y capacitación de los espermatozoides fértiles que lo que originariamente se pensaba (Yanagimachi y Mahi, 1976; Overstreet y col., 1978; Hunter y Nichol, 1983; Hunter, 1984, 1987a,b).

Importancia del segmento inferior del istmo en la fecundación in vivo

Aunque no ha sido definitivamente confirmado, el almacenamiento de los espermatozoides en el istmo previo a la fecundación parece ser un fenómeno universal en los mamíferos. Concretamente, el segmento inferior del istmo, donde los espermatozoides fecundantes son almacenados, es rico en receptores adrenérgicos y tiene un aporte directo de sangre rica en hormonas ováricas (revisado por Yanagimachi, 1994), lo que sugiere que esta región particular del oviducto podría ser sensible a cualquier cambio en el perfil hormonal ovárico.

Han sido propuestos varios mecanismos para el almacenamiento de los espermatozoides en istmo oviductal durante el periodo pre-ovulatorio como: la constricción localizada del istmo (Suarez, 1987); la retención de los espermatozoides en el moco ístmico viscoso (Jansen, 1978), la motilidad espermática deprimida en el istmo (Overstreet y Cooper, 1975; Suarez, 1987) y la adhesión de los espermatozoides a la superficie de la mucosa oviductal (Cooper y col., 1979; Flechon y Hunter, 1981; Smith y col., 1987; Suarez, 1987). De hecho, ha sido observado en varias especies que un gran número de espermatozoides interacciona estrechamente con el epitelio del istmo (Flechon y Hunter, 1981; Suarez, 1987; Smith y col., 1987; Hyttel y col., 1991; Hunter y col., 1991).

La naturaleza de la interacción espermatozoide-epitelio oviductal no se conoce todavía con exactitud. No obstante, esta unión parece estar influenciada por la región (siendo alta en el istmo) y por estado hormonal (alta durante el estro) (Raychoudhury y Suarez, 1991), aunque no es restrictiva al periodo de estro ni sólo al istmo (Suarez y col., 1991). En general, ha sido descrito que los estrógenos provocan cambios en el tracto genital femenino que tienen un efecto estimulador de la capacitación, mientras que la progesterona parece inhibirla.

Además, es probable que los espermatozoides completen su capacitación en el oviducto, ya que éste parece ser capaz de controlar la evolución de la capacitación con el fin de sincronizar el estado fisiológico de los gametos y así maximizar la fecundación (Smith y Yanagimachi, 1989). De hecho, se ha demostrado que el contacto entre los espermatozoides y la mucosa del istmo, vía región acrosomal, es beneficiosa para la supervivencia de los espermatozoides (Smith y Yanagimachi, 1990) y para el mantenimiento de la capacidad fecundante y de la motilidad (Pollard y col., 1991). Asimismo, esta interacción parece inducir alteraciones en la superficie del espermatozoide que conllevarían a la capacitación (Guyader y col., 1989), ya que los espermatozoides que no consiguen adherirse, mueren o pierden su capacidad fecundante (Smith y Yanagimachi, 1990; Pollard y col., 1991; Suarez y col., 1991a).

Por otra parte, sólo una pequeña fracción de los miles de espermatozoides almacenados en el istmo parecen ser liberados de la mucosa antes y durante la fecundación; lo que sugiere que el oviducto también puede servir para prevenir la poliespermia (Hunter, 1988). De hecho, el número de espermatozoides que alcanza la ampulla es muy bajo, aún después de que todos los ovocitos han sido fecundados (Cummins y Yanagimachi, 1982; Smith y col., 1987). Se ha demostrado que la capacidad de retener a los espermatozoides de la mucosa ístmica del hámster permanece invariable antes y durante la ovulación (Smith y Yanagimachi, 1991), por lo que debe ser un cambio en las características del espermatozoide, lo que provoque su liberación de la mucosa. La capacitación parece estar implicada en este cambio, perdiendo los espermatozoides capacitados su afinidad por la mucosa oviductal.

En resumen, parece probable que los espermatozoides permanezcan adheridos a la mucosa ístmica hasta que son capacitados, sólo entonces son capaces de abandonar el istmo y ascender a la ampulla. El hecho que una pequeña fracción de los espermatozoides ístmicos abandonen el istmo sugiere que sólo una pequeña fracción de los espermatozoides completan su capacitación en el oviducto (Smith y Yanagimachi, 1991). Últimamente se ha demostrado que la hiperactivación es una manera eficiente de propulsión dentro de los viscosos fluidos del oviducto (Suarez y col., 1991b) y que posiblemente esté implicada en la liberación de los espermatozoides de la mucosa oviductal (Demott y Suarez, 1992; Smith y Yanagimachi, 1991). No obstante, la migración de los espermatozoides libres desde el istmo hasta la ampulla parece llevarse a cabo tanto por la motilidad del espermatozoide como por el movimiento contráctil del oviducto (Hunter, 1988a; Overstreet, 1983).

1.3.2. Bases moleculares de la capacitación

El fenómeno de la capacitación es difícil de definir a nivel molecular; debido a que la naturaleza de las modificaciones bioquímicas a las cuales es sometido el gameto masculino durante sus múltiples interacciones con los componentes presentes en los fluidos del tracto genital femenino, y dentro del complejo cumulus-ovocito todavía permanece oscura. No obstante, posibles mecanismos moleculares de la capacitación han sido propuestos en estos últimos años.

Cambios en la membrana plasmática del espermatozoide

De acuerdo con las características generales del modelo de mosaico fluido de las membranas, la membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica y fluida, donde la mayoría de sus componentes (lípidos, proteínas y glúcidos) son capaces de moverse en el

plano de la membrana, distribuyéndose en dominios específicos, estructural y funcionalmente distintos, dentro de la membrana de las diferentes regiones del espermatozoide (Holt, 1984).

Debido a que la membrana plasmática del espermatozoide está directamente expuesta al ambiente capacitante, no es de sorprender que cambios muy prominentes tengan lugar en ella durante la capacitación. Desde que en los años 60, se postuló que la retirada o alteración de los materiales de revestimiento de la superficie del espermatozoide constituía una importante parte de la capacitación, un gran número de evidencias que lo confirman han sido descritas (revisado por Clegg, 1983; Oliphant y col., 1985; Yanagimachi, 1981, 1988, 1994). Dentro de estos materiales de revestimiento se encuentran los denominados factores de decapitación provenientes del epidídimo y plasma seminal (Fraser y col., 1990, Miller y Ax, 1990).

Proteínas:

Las proteínas de la bicapa lipídica intervienen en diferentes funciones de la membrana plasmática, algunas de las cuales pueden estar implicadas en la secuencia y regulación de los fenómenos que finalizan con la fusión de los gametos, como es la de transportar moléculas específicas, intervenir como enzimas en reacciones asociadas a la membrana, actuar como receptores específicos, etc.

Las proteínas periféricas (o glicoproteínas) están asociadas no-covalentemente a los lípidos de la bicapa que forman la matriz de la membrana, mientras que las proteínas intrínsecas están firmemente empotradas en la bicapa y sólo pueden ser eliminadas mediante tratamientos duros (ej: con detergentes). Sin embargo, las proteínas periféricas, que están asociadas a la membrana, principalmente a través de interacciones electrostáticas, pueden ser liberadas simplemente por adición de agentes quelantes, por un incremento del pH o fuerza iónica (Gordon y Mobley, 1985). Así, la mayoría de proteínas o glicoproteínas liberadas y/o añadidas a la membrana durante la capacitación parecen ser las proteínas periféricas (o glicoproteínas).

Es sabido que las proteínas de revestimiento provenientes del epidídimo y de las glándulas anejas ejercen funciones inhibitoras precisas como la inmovilización de proteínas estructurales, bloqueo de los canales de calcio, actividad anti-tripsina, etc. Entre los cambios que sufren las proteínas, la eliminación de estos *factores estabilizantes o de decapitación* pueden afectar a las proteínas de superficie, estimular bombas iónicas (Fraser y col., 1990) o pueden intervenir en la exposición o enmascaramiento de receptores de superficie que podrían ser eventualmente activados durante el reconocimiento espermatozoide-ovocito o en la reacción acrosómica. Los cambios en estas proteínas pueden darse por modificación en la estructura molecular de las proteínas existentes (por pérdida de péptidos o de residuos glucídicos) o por cambios en su localización o en el nivel de expresión superficial, ambas estrategias son de gran importancia en una célula que no puede dedicarse a la síntesis de proteínas (Roldan, 1994).

Hasta la actualidad, se conoce muy poco de la naturaleza precisa de las proteínas periféricas que son eliminadas durante la capacitación. Una de ellas podría ser la fibronectina o proteína tipo-fibronectina (Koehler y col., 1980). Se ha especulado que moléculas similares a la fibronectina se unen a las proteínas intrínsecas *congelando* su movimiento lateral entre los lípidos de la bicapa. La eliminación de la membrana de estas proteínas tipo-fibronectina podría

permitir a las proteínas intrínsecas moverse más libremente en la bicapa.

Mediante examen de criofractura de la membrana, antes y después de la capacitación, se ha revelado que proteínas intrínsecas o partículas intramembranarias (IMPs) cambian su distribución tanto en la región de la cola como de la cabeza (revisado por Suzuki, 1990; Yanagimachi, 1994). Estos estudios morfológicos parecen indicar que la capacitación causa, en parte, la formación de áreas especializadas dentro de la membrana plasmática en la región acrosomal que están desprovistas de proteínas intramembranarias y de esteroides y que son consideradas fusigénicas cuando se proporcionan las condiciones adecuadas para la reacción acrosómica. Todos estos cambios parecen ser el resultado de la alteración física y/o química de la bicapa lipídica durante la capacitación (revisado por Yanagimachi, 1994).

Existen varios ejemplos de antígenos de membrana que migran durante la capacitación (revisado por Yanagimachi, 1994), y quizás los más conocidos sean el PH-20 en espermatozoides de cobaya (Myles y col., 1990) y el 2B1 en espermatozoides de rata (Jones y col., 1990). Ambos experimentan una división endoproteolítica y parecen tener un papel importante en la interacción espermatozoide-ovocito. También existen ejemplos de antígenos de superficie que son eliminados o alterados, enmascarados o desenmascarados, e incluso adsorbidos durante la capacitación, no reduciéndose sólo a nivel de la membrana de la región de la cabeza, sino que también de la región de la cola del espermatozoide (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

Lípidos:

La fluidez y permeabilidad de la membrana son reguladas en parte por su composición lipídica. Pero los lípidos, a parte de su función estructural y de barrera relativamente impermeable a la mayoría de moléculas solubles en agua, también participan en otras funciones como la transducción de señales externas. Durante la capacitación, diferentes cambios han sido descritos en la composición lipídica de la membrana del espermatozoide.

Eflujo del colesterol de membrana durante la capacitación

Recientemente, se ha prestado mucha atención hacia el colesterol de la membrana del espermatozoide (revisado por Langlais y Roberts, 1985; Parks y Ehrenwald, 1990), debido a que el colesterol ejerce una serie de profundos efectos en las características de todas las membranas biológicas regulando la orientación, fluidez y densidad de los lípidos de membrana (Presti, 1985). Por lo que el eflujo de colesterol durante la capacitación (Davis y col., 1979, 1980; Davis, 1981; Langlais y col., 1981) podría incrementar la fluidez y permeabilidad de las membranas y permitir la reacción acrosómica (revisado por Parks y Ehrenwald, 1990). De esta forma, variaciones en el tiempo de capacitación podrían ser debidas, al menos parcialmente, a las diferencias en la relación colesterol/fosfolípidos (C/F) y la relación de saturación/insaturación de los fosfolípidos (Davis, 1981).

La reducción del colesterol de la membrana plasmática puede ser lograda por constituyentes del plasma como lipoproteínas de alta densidad (HDL), lecitinas:colesterol acil transferasa (LCAT), apolipoproteína A-1 y albúmina (revisado por Langlais y Roberts, 1985; Langlais y col., 1988; Parks y Ehrenwald, 1990). Algunas de estas macromoléculas han sido identificadas en los fluidos biológicos con actividad capacitante como los fluidos séricos, uterinos,

oviductales y foliculares. Asimismo, la distribución del colesterol de los espermatozoides, incubados en medios que contenían dichos fluidos, en cada una de estas moléculasceptoras (Langlais y Roberts, 1985; Davis, 1982; Langlais y col., 1988; Ehrenwald y col., 1989), refuerza la posibilidad de que la gradual eliminación del colesterol de la membrana por parte de alguno/s de estos componentes sea una parte esencial de la capacitación (Davis, 1981). No obstante, en un estudio realizado en el porcino, especie en la que la relación C/F de la membrana del espermatozoide incapacitado es muy baja (0.2), no se observó ninguna reducción en el colesterol, demosterol y relación total esterol/fosfolípidos después de la capacitación en útero ligado de cerdas (Evans y col., 1987).

Recientemente Parks y Ehrenwald (1990) han propuesto que esta pérdida de colesterol promueve la reorganización de los componentes de membrana de manera que facilita la acción(es) de otros factores capacitantes. Esta reorganización produce muy probablemente una membrana intrínsecamente más fusigénica, considerando que los cambios en la conformación o distribución de las proteínas integrales de la membrana también podrían mediar los efectos de otros factores capacitantes. Asimismo, ha sido sugerido que sólo una fracción del total del colesterol del espermatozoide se pierde o es redistribuido durante la capacitación y que el colesterol restante no se distribuye homogéneamente sobre la superficie del espermatozoide (Ehrenwald y col., 1988; Davis, 1982; Langlais y col., 1988).

Este modelo de liberación del colesterol propuesto por Parks y Ehrenwald (1990) parece resultar de las diferencias en la solubilidad del colesterol entre las distintas clases de fosfolípidos de la membrana. Esta pérdida o distribución diferencial del colesterol podría explicar la aparición de dominios ricos y pobres en colesterol descritos en espermatozoides de cobaya y humanos (Bearer y Friend, 1982; Tesarik y Flechon, 1986). Aunque no ha sido totalmente confirmado, también podría ser posible la pérdida de proteínas intrínsecas de la membrana en estas áreas libres de colesterol (Bearer y Friend, 1982; Tesarik y Flechon, 1986, Parks y Ehrenwald, 1990). Asimismo los cambios resultantes del eflujo de colesterol podrían modular las funciones celulares mediadas por receptores y la actividad de enzimas unidos a la membrana implicada en la capacitación, mediante cambios en la conformación de las proteínas, así como en el desplazamiento lateral y vertical de las proteínas dentro de la bicapa. Todos estos cambios podrían posiblemente alterar las características de unión de los receptores de superficie del espermatozoide y de esta forma facilitar otros posibles mecanismos relacionados con la adquisición del potencial fecundante (revisado por Parks y Ehrenwald, 1990).

Cambios en la composición fosfolipídica de la membrana

Varios autores han sugerido que la composición fosfolipídica de la membrana plasmática del espermatozoide cambia durante la capacitación (Evans y col., 1980; Stojanoff y col., 1988). En general, una acumulación de fosfatidilcolina ha sido observada, probablemente como una preparación para la transducción de señales o para la generación de lípidos fusigénicos durante la reacción acrosómica. La fosfatidilcolina parece aumentar como resultado de la acilación de lisofosfatidilcolina (Roldan y Harrison, 1990) o de la metilación de la fosfatidiletanolamina (Llanos y Meizel, 1983).

Otros cambios en el contenido de fosfolípidos de la membrana, como la síntesis de fosfatidilinositol en espermatozoides de cerdo o la conversión del ácido fosfatídico en

cardiolipin en espermatozoides de cobaya, también han sido descritos (revisado por Yanagimachi, 1988,1994), aunque se desconoce si estas alteraciones de los fosfolípidos están directamente relacionadas con el *signalling* celular durante la capacitación.

Últimamente también ha sido demostrado que los lípidos pueden migrar durante la capacitación. Un glicolípido (seminolípido) que está presente en la parte externo de la membrana plasmática, cambia su localización de la región apical de la membrana de la cabeza a la región ecuatorial (Gadella, 1994).

Disminución de la carga negativa de la superficie

Como ya se ha mencionado anteriormente, la maduración de los espermatozoides en el epidídimo induce un aumento significativo de las cargas negativas de la superficie (revisado por Yanagimachi, 1988,1994). Por el contrario, la capacitación implica una disminución de las cargas negativas (Vaidya y col., 1971; Rosado y col., 1973), debido a una eliminación de los residuos de ácido siálico (Farooqui, 1983) y de los residuos sulfato (Bleau y col., 1975; Legault y col., 1980; Langlais y col., 1981) de la superficie del espermatozoide por hidrolasas presentes en el tracto genital femenino. Este mecanismo ha sido confirmado por el hecho que los esteroides sulfatados son potentes inhibidores de la capacitación *in vitro* en el hámster (Bleau y col., 1975a) y que la esteroide sulfatasa tiene una actividad cíclica dentro de las vías femeninas con un máximo de actividad después de la ovulación (Legault y col., 1980).

Estas modificaciones pueden no inducir necesariamente cambios morfológicos directos, sino sutiles transformaciones que pueden dar lugar a cambios en la redistribución de fuerzas atractivas y repulsivas entre los grupos polares de la membrana lipídica. Estos cambios estarían acompañados por un aumento de la difusión lateral de los lípidos y por alteraciones en los dominios de la membrana. Asimismo, estos cambios podrían estar implicados en la redistribución de las partículas intramembranarias y en la formación de regiones con esteroles reducido en la membrana plasmática de la región del acrosoma (revisado por Guyader, 1988, tesis).

Papel de la esteroide sulfatasa

Entre los llamados factores de decapitación están los esteroides sulfatados (colesteril y demosteril sulfato), cuya concentración en la membrana plasmática del espermatozoide aumenta durante el tránsito epididimario (Legault y col., 1979). Estos componentes se encuentran localizados principalmente en la membrana plasmática que cubre el acrosoma (Langlais y col, 1981). El significado biológico de esta localización específica puede ser el aumento de la estabilidad membranaria, ya que los esteroides sulfatados inhiben la capacitación manteniendo una relación de colesterol/fosfolípidos elevada e impidiendo el flujo de colesterol (Langlais y col., 1981).

Por esta razón, la esteroide sulfatasa podría ser considerada como un factor de capacitación, liberando por hidrólisis los compuestos sulfatados de los esteroides presentes en la membrana plasmática. Todo esto se ve reforzado por la presencia de este enzima en el oviducto, endometrio y folículos de Graaf humanos (Lalumiere y col.,1976), así como en las células del cumulus de hámster (Langlais y Roberts, 1985). Así, la esteroide sulfatasa parece jugar un papel en el proceso de desestabilización de la membrana, lo que conduciría a un aumento del

influjo de calcio a través de la membrana (Langlais y Roberts, 1985). Sin embargo, no se ha determinado todavía si este enzima es activo *in vivo*.

Cambios en los iones intracelulares del espermatozoides

Los espermatozoides vivos mantienen eficazmente gradientes iónicos a través de la membrana plasmática, siendo la concentración de K^+ dentro del espermatozoides superior a la extracelular, mientras que a nivel del Na^+ ocurre lo contrario (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Hyne y col., 1985).

Los flujos de iones proporcionan numerosos mecanismos para controlar las actividades y respuestas celulares. Existen evidencias que indican que la capacidad fecundante del espermatozoide está marcadamente afectada y controlada por la composición iónica del ambiente inmediato. *In vivo*, los cambios en la composición iónica del tracto genital femenino, con particular referencia al K^+ , puede servir para modular y controlar la expresión del poder funcional de los espermatozoides (Fraser, 1983). Así, la composición del fluido en el que los espermatozoides eyaculados son expuestos deberá contener concentraciones adecuadas de Na^+ , K^+ y Ca^{++} para poder soportar la capacitación y reacción acrosómica.

Calcio

El Ca^{++} libre extracelular es requerido para la fecundación en mamíferos (Iwamatsu y Chang, 1971), así como para el resto de vertebrados e invertebrados. De hecho, está bien establecido que un influjo masivo del Ca^{++} extracelular tiene lugar durante la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1981, 1988; Thomas y Meizel, 1989). Sin embargo, poco se sabe de la cinética del Ca^{++} intracelular durante la capacitación.

Es generalmente aceptado que la concentración de Ca^{++} intracelular en los espermatozoides es baja, tanto en la región de la cabeza como de la cola, debido la presencia de una bomba de Ca^{++} mediada por una ATPasa, un *antiporter* Na^+/Ca^{++} y un sistema de *exchange* Ca^{++}/H^+ en la membrana plasmática (Bradley y Forrester, 1985; Breitbart y col., 1983; Roldan y Fleming, 1989), así como debido al secuestro de Ca^{++} en la mitocondria (Irvine y Aitken, 1986). Sin embargo, si el Ca^{++} libre intracelular aumenta (Baldi y col., 1991; Fraser, 1990a; Fraser y McDermott, 1992) o no aumenta (Mahanes y col., 1986; Florman y col., 1989; Ruknudin y Silver, 1990) durante la capacitación todavía es un tema de controversia.

Potasio

Otro catión, cuyo papel en la fecundación también ha sido estudiado, es el potasio, encontrado tanto en el tracto genital femenino como masculino (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Aunque el potasio es requerido para la fusión del espermatozoide-ovocito (Rogers y col., 1981; Fraser, 1983), su papel en la capacitación es más incierto. Existen evidencias que indican que el K^+ no es necesario para la capacitación en sí (Rogers y col., 1981; Fraser, 1983), aunque parece estar implicado en la reacción acrosómica (Mrsny y Meizel, 1981; Rogers y col., 1981; Fraser, 1983).

Sodio

A pesar de que el sodio es uno de los principales constituyentes iónicos de los fluidos del tracto genital *in vivo* como de los medios de cultivo *in vitro*, sólo recientemente se le ha prestado atención como un posible componente crucial para la fecundación. Aunque existen todavía escasas evidencias, el Na^+ parece jugar un papel en la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide (Hyne y col, 1984; Murphy y col., 1986).

Se ha establecido que existe un requerimiento de Na^+ extracelular para la adquisición de esta capacidad, observándose que concentraciones relativamente bajas de Na^+ son suficientes en el caso de la capacitación, mientras que para la reacción acrosómica son necesarias concentraciones mucho más altas (Hyne y col, 1984; Murphy y col, 1986; Fraser y col., 1993).

Fraser y col.(1993) sugieren que la concentración de Na^+ intracelular aumenta moderadamente durante la capacitación, probablemente ayudado por una reducción en la actividad de la Na^+ - K^+ -ATPasa, causando una disminución en la tasa en que el Na^+ es bombeado hacia el exterior.

Cambios en el núcleo y acrosoma

El núcleo de los espermatozoides de la mayoría de mamíferos es una estructura muy estable debido a que posee un elevado número de *cross-links* de proteínas nucleares mediante puentes S-S, manteniendo esta estabilidad a lo largo de la capacitación (revisado por Yanagimachi, 1988,1994).

En la mayoría de especies, la estructura del acrosoma no cambia sensiblemente durante la capacitación (Crozet, 1984; Szollosi y Hunter,1978; Yanagimachi y Usui, 1974). El caso del acrosoma del hámster dorado puede ser una excepción, ya que tanto su contorno como la textura de la matriz acrosomal cambia tras la exposición de los espermatozoides a un medio capacitante (Yanagimachi y Cummins, 1985).

Referente a si los enzimas acrosomales permanecen inactivos o son convertidos en formas activas durante la capacitación es todavía sujeto a debate (Yanagimachi, 1994).

Cambios en el sistema adenilato-ciclasa/proteína kinasa

Importantes evidencias sugieren que los nucleótidos cíclicos, particularmente el AMPc, juegan un significativo papel en la capacitación, metabolismo, reacción acrosómica y motilidad de los espermatozoides (Tash y Means, 1983; Clegg, 1983; Fraser, 1984; Fraser y Ahuja, 1988). De hecho, ha sido demostrado que la adenilato-ciclasa incrementa su actividad durante la capacitación (Berger y Clegg, 1983; Stein y Fraser, 1984; Stein y col., 1986). El incremento de la actividad adenilato-ciclasa es acompañado de un descenso en la actividad nucleótido cíclico fosfodiesterasa, incrementando la disponibilidad del AMPc (Stein y Fraser, 1984), lo que podría estimular las proteína-kinasas dependientes del AMPc. La proteína-kinasa estimulada puede alterar la estructura de las membranas del espermatozoide, mediante fosforilación de proteínas de membrana (Hyne y Edwards, 1985), dando lugar a cambios en las propiedades fisiológicas de las membranas. Asimismo, parece probable que pueda existir más de un sistema adenilato-ciclasa presente en el espermatozoides, y que el AMPc producido por estos sistemas en las diferentes regiones del espermatozoide pudieran tener distintas

funciones y ser regulados por distintos mecanismos (revisado por Clegg, 1983).

Sin embargo, mientras varios investigadores han descrito aumentos significativos en la concentración intracelular de AMPc de los espermatozoides durante la capacitación (Fraser, 1990a; Visconti y Tezon, 1989), otros no lo han observado (Kopf y Gerton, 1991; White y col., 1992).

Cambios en el metabolismo

A menudo ha sido documentado que los espermatozoides exhiben un metabolismo incrementado (actividad glicolítica y oxidativa) después de ser incubados en el tracto genital femenino o en sus fluidos asociados (Boell, 1985; Fraser y Ahuja, 1988). Sin embargo, parece posible que este incremento esté más relacionado con los sustratos energéticos presentes en el medio que con la capacitación por sí misma (Boell, 1985). No obstante la capacitación puede ocasionar algunos cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que hagan que la energía sea más accesible, por ejemplo, para el aparato motor de los espermatozoides (Yanagimachi, 1988).

1.4. REACCIÓN ACROSÓMICA

La reacción acrosómica es un requerimiento absoluto dentro del proceso de fecundación, haciendo al espermatozoide capaz de penetrar la ZP y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (revisado por Kopf y Gerton, 1991). Sin embargo, el estudio de la reacción acrosómica presenta una serie de problemas como es conocer los fenómenos secuenciales dentro del proceso exocitótico, así como distinguir los eventos bioquímicos que corresponden a la capacitación de los que pertenecen a la reacción acrosómica.

Bajo condiciones naturales, un agonista derivado del complejo cumulus-ovocito desencadena la reacción acrosómica, sólo si los espermatozoides están capacitados. Este proceso implica múltiples fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la cubre, lo cual permite que el contenido acrosomal escape a través de las membranas fenestradas, con la formación de vesículas membranales híbridas y la exposición en la ZP de la membrana acrosomal interna y el contenido acrosomal asociado. El lugar donde las dos membranas comienzan a fusionarse varía entre especies (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

También la velocidad de la reacción acrosómica es probablemente dependiente de la especie, así como de la condición y ambiente de los espermatozoides. No obstante, lo más probable es que una vez que los espermatozoides son capacitados y reciben los estímulos o señales apropiadas, sufren la reacción muy rápidamente.

No obstante, debido a que el acrosoma contiene una variedad de enzimas hidrolíticos, el acrosoma puede ser autodigerido en los espermatozoides muertos o moribundos. La relativamente inestable membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la cubre pueden ser destruidas (parcial o totalmente) o desprendidas del espermatozoide. Es muy importante distinguir estas modificaciones degenerativas del acrosoma en los espermatozoides muertos o moribundos (*falsa reacción acrosómica*) de la reacción acrosómica fisiológica que ocurre en los espermatozoides vivos (*verdadera reacción acrosómica*) (Bedford, 1970).

Probablemente en todas las especies mamíferas, los espermatozoides fecundantes, tanto *in vivo* como *in vitro*, sufren la reacción acrosómica en la superficie de la zona pelúcida antes de penetrarla (Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Bleil, 1991; Kopf y Gerton, 1991). No obstante, la reacción acrosómica puede ocurrir espontáneamente en el medio de capacitación, sin ningún agente estimulante. La incidencia de reacción acrosómica *espontánea* parece depender de varios factores como la especie y línea animal, los tratamientos de los espermatozoides después de la eyaculación y la composición del medio (revisado por Yanagimachi, 1994). Sin embargo, parece ser que únicamente la reacción acrosómica inducida por factores procedentes del complejo cumulus-ovocito es fisiológicamente importante para la fecundación (Yanagimachi, 1988, Tesarik, 1989).

1.4.1. Agonistas naturales de la reacción acrosómica

Una gran variedad de estímulos artificiales desencadenantes de la reacción acrosómica *in vitro* han sido descritos (revisado por Gordon, 1994). Por el contrario, únicamente unos pocos inductores fisiológicos de la reacción acrosómica han sido identificados, residiendo todos ellos en los componentes de la zona pelúcida y del cumulus oophorus.

Hasta últimamente, una glicoproteína de la zona pelúcida denominada ZP3 ha sido el único componente definido capaz de inducir la exocitosis acrosomal en espermatozoides mamíferos (Bleil y Wassarman, 1983; Wassarman, 1987, 1992; revisado Saling, 1991). Sin embargo, recientes trabajos han indicado que la progesterona, otro agonista natural producido y/o retenido en el cumulus oophorus, es también capaz de iniciar la exocitosis y que su papel puede ser fisiológicamente relevante. En la actualidad, no está claro si existe alguna interacción entre estos agonistas, o entre los mecanismos que activan. Además, se han descrito otros agonistas capaces de estimular la exocitosis acrosomal, cuya relevancia queda todavía por determinar.

Papel del cumulus, fluido folicular y oviductal en la reacción acrosómica

En mamíferos, los productos de secreción del oviducto y del folículo pueden jugar un importante papel en la fecundación. No obstante, la atención se ha centrado principalmente en las interacciones entre el espermatozoides y los componentes de la ZP, ignorando enormemente que los componentes del oviducto y del cumulus modulan la interacción espermatozoide-ovocito y pueden jugar importantes papeles en la coordinación e incremento de la eficacia de la fecundación.

Existen estudios en el hámster que han establecido la existencia de un antígeno oviductal que se asocia a la ZP de los ovocitos ovulados (revisado por Boatman, 1990) pero cuyo significado funcional en la fecundación no está todavía claro.

La actividad estimuladora de la reacción acrosómica del fluido folicular preovulatorio ha sido observada *in vitro* (Tesarik, 1985; Osman y col., 1986; Thomas y Meizel, 1988; Suarez y col., 1986). *In vivo*, el fluido folicular puede tener cierta importancia fisiológica, ya que podría ser retenido por la matriz del cumulus, antes y durante la ovulación, y estar presente en el momento de la fecundación (Meizel, 1985), aunque algunos autores (Mortimer y Camenzind, 1989) parecen discrepar al respecto.

Recientemente se han iniciado estudios para identificar y caracterizar el agente(s) responsable en el fluido folicular humano (FFH) de iniciar la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Thomas y Meizel, 1988, Suarez y col., 1986, Tesarik, 1985), indicando probablemente que son la progesterona y 17- α -hidroxiprogesterona (Osman y col., 1989). No obstante, esta actividad estimuladora del FFH parece ser enmascarada o diluida *in vivo* por el fluido oviductal tras la ovulación. De hecho, en la cerda se ha demostrado que sólo un 0.5% del fluido folicular, o incluso menos, entra en el oviducto en el momento de la ovulación (Hansen y col., 1991) por lo que se ha sugerido que esta pequeña cantidad tiene algún, pero probablemente no esencial, efecto estimulador de la reacción acrosómica.

Ha sido demostrado que el cumulus también induce la reacción acrosómica (Tesarik, 1985, Carrell y col., 1993, Fukui, 1990, Cummins y Yanagimachi, 1986). Además, las concentraciones *in vivo* de progesterona del cumulus parecen ser lo suficientemente altas para iniciar la reacción acrosómica (Osman y col., 1989). Asimismo, las células del cumulus continúan secretando progesterona tras la ovulación (Schutz y Dubin, 1981), lo que sugiere que esta progesterona sería la causa más probable del incremento del Ca^{++} intracelular que conduciría a la reacción acrosómica (Blackmore y col., 1990).

En los rumiantes, el cumulus se pierde rápidamente justo después de la ovulación, de forma que no está presente en el momento del contacto entre el ovocito y los espermatozoides (vaca: Lorton y First, 1979; Crozet, 1984; oveja: Crozet y Dumont, 1984; cabra: Crozet y col., 1987a), por lo que su papel en la inducción de la reacción acrosómica en estas especies no parece tener importancia.

Papel de la zona pelúcida

Numerosos estudios usando gametos de diferentes especies indican que el desencadenamiento de la reacción acrosómica por la ZP puede ser un hecho general en la interacción de los gametos. De hecho, en la mayoría de especies domésticas y en el hombre, ha sido demostrado que la reacción acrosómica ocurre tras la adhesión de los espermatozoides a la superficie de la zona (Cross y col., 1988; Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Crozet y col., 1987a; Cherr y col., 1986; O'Rand y Fisher, 1987; Saling, 1989).

Especialmente en el ratón, donde la interacción entre el espermatozoide y la ZP ha sido extensamente estudiada, ha sido postulado que la ZP3, además de su función como ligando específico de esta unión, es el componente de la ZP responsable de la inducción de la reacción acrosómica (Bleil y Wassarman, 1983), o más concretamente su cadena polipeptídica (Wassarman y col., 1989). La unión de la ZP3 al espermatozoide es específica y saturable (Wassarman, 1987, 1988), lo que sugiere la existencia de un receptor complementario (R-ZP3) en la superficie del espermatozoide.

Recientemente, ha sido propuesto que la exocitosis acrosomal puede ser desencadenada por la agregación de los R-ZP3 de la membrana plasmática que cubre el acrosoma (Leyton y Saling, 1989a; Saling y col., 1990). Entre los posibles candidatos de R-ZP3 identificados, uno que ha merecido considerable atención es una proteína de 95 KDa (p-95) con actividad *protein tyrosin kinase*, la cual se agrega y se autofosforila tras la estimulación por la zona pelúcida. (Leyton y Saling, 1989ab, Saling y col., 1990, Bunch y col., 1992). El hecho que la p-95 sea un miembro de la altamente conservada familia de proteínas receptoras tipo

protein-tirosin-kinasa, junto con el remarcable grado de conservación entre ZP3 de diferentes especies mamíferas (Chamberlain y Dean, 1990) favorecen la posibilidad de que la p-95 sea identificada como R-ZP3. Asimismo, recientes estudios han identificado una proteína de PM similar con actividad fosfotirosina en espermatozoides humanos, bovinos y de gato (Bunch y col., 1992).

No obstante, Saling (1989) especuló que los receptores de la ZP en los espermatozoides capacitados podían ser capaces de agregarse por ellos mismos, induciendo a la reacción acrosómica espontánea. Yanagimachi (1994), a pesar de estar de acuerdo con esta hipótesis, ha sugerido que otro tipo de reacción acrosómica espontánea podría estar relacionada con el envejecimiento de los espermatozoides, debido a que el tiempo reduciría la eficacia de los mecanismos de bombeo de Na^+ y/o Ca^{++} , provocando un gradual incremento del Ca^{++} y del pH hasta llegar a desencadenar la reacción acrosómica sin la activación de los receptores.

Progesterona

La inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides humanos y de hámster por progesterona es la primera demostración de la iniciación de un suceso excitotico por un esteroide (Meizel y col., 1990). Ha sido sugerido que la proteína fijadora de progesterona puede actuar como un estimulador del influjo de Ca^{++} necesario para la reacción acrosómica (Osman y col., 1989, Tesarik y col., 1992b). De hecho, se ha podido demostrar que el aumento en el Ca^{++} intracelular por la progesterona es uno de los efectos más rápidamente inducidos por esteroides (Thomas y Meizel, 1989; Blackmore y col., 1990).

Aunque en la mayoría de los sistemas celulares estudiados, la progesterona actúa a nivel de receptores nucleares modulando la actividad transcripcional, mecanismo común a una variedad de esteroides, sorprendentemente en los espermatozoides humanos, la acción de la progesterona es ejercida sobre un receptor de superficie celular no genómico (Blackmore y col., 1990; Blackmore y col., 1991; Blackmore y Lattanzio, 1991). Estos receptores de membrana parecen estar confinados en la cabeza del espermatozoide (Blackmore y Lattanzio, 1991), más concretamente en la región acrosomal (Tesarik y col., 1992a) y además sólo una pequeña subpoblación de espermatozoides expresan receptores para esta hormona (Blackmore y Lattanzio, 1991, Tesarik y col., 1992a).

Ha sido propuesto que la agregación de estos receptores de la membrana, que ocurre tras la unión de la progesterona, es una reacción inicial del mecanismo de transducción de señales para el rápido influjo de Ca^{++} inducido por la progesterona (Tesarik y col., 1992b; Tesarik y Mendoza, 1993). Estudios preliminares han demostrado que la estimulación de estos receptores también parece desencadenar el influjo de Cl^- (Winstrom y Meizel, 1993).

Ha sido sugerido que la calmodulina está implicada en la regulación del influjo de Ca^{++} inducido por la progesterona y que el subsiguiente eflujo del Ca^{++} es conducido al menos en parte por una Ca^{++} -ATPasa sensible a la calmodulina (Potts y col., 1992), ya que el influjo del Ca^{++} inducido por la progesterona es rápido y transitorio (Blackmore y col., 1990).

Además de los estudios realizados en espermatozoides humanos, también ha sido descrita la reacción acrosómica inducida *in vitro* por progesterona en otras especies como el hámster (Llanos y col., 1993), el cerdo (Melendrez y col., 1993) y el caballo (Meyers y col., 1993).

1.4.2. Mecanismos moleculares de la reacción acrosómica

Como consecuencia de los recientes trabajos de fisiología celular que ponen en evidencia la unidad de los mecanismos moleculares de comunicación, independientemente del tipo celular estudiado, numerosos investigadores han desarrollado distintas hipótesis mucho más precisas sobre la inducción de la reacción acrosómica en los espermatozoides mamíferos.

Varias señales moleculares han sido propuestas: la señal del Ca^{++} , modificaciones del pH intracelular, metabolismo y activación de ciertos enzimas específicos, etc. Por lo que la reacción acrosómica podría resultar de la conjunción de todos o algunos de estos mecanismos estudiados y de otros todavía desconocidos.

Regulación iónica durante la reacción acrosómica

Entre los diferentes iones requeridos para la reacción acrosómica y los mecanismos implicados en su regulación, el Ca^{++} ha recibido especial atención. De hecho, ha sido demostrado *in vitro* que el Ca^{++} es obligatorio tanto para la capacitación como para la reacción acrosómica, pero la cantidad requerida para cada fenómeno puede diferir marcadamente (Fraser, 1990a).

Las evidencias sugieren que el Ca^{++} necesario durante la excitosis acrosomal es de origen extracelular (Yanagimachi y Usui, 1974; Fraser, 1982, Yanagimachi, 1982). No obstante, ha sido sugerido una posible movilización de los depósitos intracelulares de Ca^{++} del espermatozoide durante la reacción acrosómica (Berruti y Franchi, 1986), debido a la existencia de depósitos de Ca^{++} en la cara externa de la membrana acrosomal externa y en la cara interna de la membrana plasmática, localización probablemente próxima a las áreas donde la fusión entre las membranas se inicia (Watson y Plummer, 1986).

Actualmente, está bien reconocido que el influjo de Ca^{++} es uno de los primeros eventos críticos en la serie de procesos que dan lugar a la excitosis acrosomal. Un rápido aumento del Ca^{++} intracelular ha sido detectado en espermatozoides de ratón y bovinos tratados con agonistas derivados del ovocito (Lee y Storey, 1988; Florman y Babcock, 1988) y en espermatozoides humanos tratados con fluido folicular o fracciones derivadas (Thomas y Meizel, 1988). Sin embargo, el papel de los canales iónicos, *antiporters* o ATPasas en la regulación de este catión no está claramente descrito.

Respecto a la presencia de canales iónicos en los espermatozoides de mamíferos y su participación en la reacción acrosómica, es un tema de controversia. Mientras ciertos autores sugieren la no-existencia o no-intervención de éstos (Roldan y col., 1986), otros indican que la reacción acrosómica es inhibida por antagonistas de los canales de Ca^{++} (Fraser y McIntyre, 1989) en poblaciones de espermatozoides que reaccionaban espontáneamente o tras la adición de Ca^{++} . No obstante, recientes estudios sugieren que los canales de Ca^{++} juegan un papel esencial en la excitosis acrosomal (Fraser, 1992).

Otro de los mecanismos propuestos para la regulación de la entrada de Ca^{++} ha sido el que una señal desencadenante, liberada por un *factor* apropiado, podría bloquear la Na^+/K^+ -ATPasa y así aumentar la concentración de Na^+ intracelular. Esto podría cambiar la dirección del *antiporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, provocando un rápido aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} , y entonces desencadenar otros procesos (Hyne y col., 1984). No obstante, existen evidencias

que sugieren que estos eventos podría darse en otro orden, es decir, que una entrada de Ca^{++} pudiera preceder al aumento en la concentración de Na^+ (Bhattacharya y col., 1986).

En la regulación del Ca^{++} también puede estar implicada una Ca^{++} -ATPasa, un mecanismo normalmente responsable del bombeo de este ión hacia el exterior. De hecho, varios autores han propuesto que la Ca^{++} -ATPasa juega un importante papel en la reacción acrosómica, ya que un descenso en su actividad podría permitir un aumento en la concentración de Ca^{++} necesaria para desencadenar los siguientes fenómenos (Roldan y Fleming, 1989).

Además, ha sido sugerido la intervención de otros iones que podrían jugar importantes papeles en la exocitosis acrosomal. En el caso del K^+ , su regulación parece estar principalmente relacionada con la actividad de una bomba Na^+/K^+ . Probablemente una alta concentración extracelular de K^+ , similar a la de algunas porciones del tracto femenino, pueda contribuir a impedir el incremento prematuro de la concentración intracelular de Na^+ , mediante el mantenimiento de esta bomba activa (revisado por Roldan y Harrison, 1990). No obstante, en algunas especies, la entrada de K^+ a través de la bomba puede ser necesaria durante la reacción acrosómica (Mrsny y Meizel, 1981, Fraser, 1983).

Últimamente, se ha demostrado que el Na^+ extracelular es también requerido para soportar la reacción acrosómica *in vitro* en espermatozoides de ratón (Fraser y col., 1993) y en otras especies como la cobaya (Hyne y col., 1984, Murphy y col., 1986), siendo estos requerimientos superiores a los de la capacitación (Fraser y col., 1993). De hecho, consistentes evidencias sugieren que un influjo de Na^+ es el acontecimiento clave en el desencadenamiento de la exocitosis en espermatozoides capacitados de ratón (Harrison y Fraser, 1993).

Otro de los primeros eventos en la exocitosis acrosomal, parece ser el incremento del pH intracelular (Fraser, 1992). Según Fraser y col. (1993), un gran aumento en la concentración de Na^+ en los espermatozoides capacitados activaría el *exchange* Na^+-H^+ , lo que daría lugar a este incremento del pH y la consecuente obertura de los canales de Ca^{++} , dando como resultado un influjo de Ca^{++} que desencadenaría la reacción acrosómica. Esta hipótesis coincide con el incremento de pH y Ca^{++} intracelular observado en espermatozoides capacitados de toro expuestos a material solubilizado de la ZP (Florman y col., 1989). Recientes estudios han sugerido que una de la primeras respuestas a la ZP3 es un aumento de la concentración intracelular de Na^+ , lo que daría lugar a un incremento del pH y la subsiguiente activación de los canales de Ca^{++} (Florman y col., 1992).

Papel de los lípidos en la reacción acrosómica

Indudablemente, las modificaciones en los lípidos de membrana juegan un papel fundamental en la exocitosis acrosomal. La participación de los esteroides, (liso)fosfolípidos y ácidos grasos en los eventos que conducen a la reacción acrosómica ha sido bien documentado (revisado por Roldan y Harrison, 1990). Aunque en la mayoría de casos, el papel preciso de estos lípidos no ha sido descrito, varios mecanismos han sido sugeridos a tener en cuenta, como las modificaciones en la fluidez de membrana, propiedades fusigénicas, regulación de la Ca^{++} -ATPasa, etc (revisado por Roldan y Harrison, 1990).

Dentro de los cambios que ocurren previamente a la exocitosis, la acumulación gradual de lípidos fusigénicos, como la lisofosfatidilcolina, ha sido documentado (revisado por Roldan

y Harrison, 1990). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que durante la capacitación de espermatozoides de cobaya se produce un significativo descenso en los niveles de lisofosfatidilcolina, tanto en la membrana plasmática como en la acrosomal externa (Stojanoff y col., 1988). Por otra parte, estos autores también demuestran un incremento en los niveles de fosfatidilcolina, similar al observado en espermatozoides de cerdo tras la incubación en útero (Evans y col., 1980). Como ya se ha mencionado anteriormente, esto sugiere que durante la capacitación, el espermatozoides acumula activamente fosfatidilcolina, a través de la acilación de la lisofosfatidilcolina, la cual será posteriormente atacada por una fosfolipasa A2 dependiente del Ca^{++} y así generar rápidamente lisocomponentes fusogénicos durante los posteriores sucesos de la exocitosis acrosomal (Roldan y Harrison, 1990). También la lisofosfatidiletanolamina podría contribuir, una vez acilada, en el *pool* de fosfatidilcolina.

A parte de los cambios en los lípidos relacionados con la perturbación, desestabilización y eventual fusión de las membranas, algunos de ellos pueden actuar como moléculas mensajeras durante la transducción de señales. Recientes estudios han permitido caracterizar la generación y papel de mensajeros en los sucesos que acontecen tras la entrada de Ca^{++} . Kopf y Gerton (1991) propusieron un sistema de transducción de señales para la inducción de la reacción acrosómica por la ZP3. Sin embargo, el modelo propuesto por estos autores parece demasiado complicado para un fenómeno terminal que ocurre muy rápidamente como es la reacción acrosómica (revisado Yanagimachi, 1994).

No obstante, Roldan y Harrison (1990) propusieron otro mucho más sencillo. Según estos autores, la regulación de los flujos de iones, la hidrólisis de los polifosfoinosítidos (PPI) de la membrana para generar diacilglicerol (DAG) y la activación de fosfolipasas para producir lisofosfolípidos, están estrechamente relacionados con la secuencia de fenómenos que conducirán a la reacción acrosómica.

Ha sido observado que paralelamente a la generación de DAG derivado de los polifosfoinosítidos, el Ca^{++} activa una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina, la cual genera DAG adicional. Parece existir una compleja interacción entre el DAG derivado de los polifosfoinosítidos y el DAG derivado de la fosfatidilcolina, ya que el primero parece estimular la producción de más DAG derivado de la fosfatidilcolina, y viceversa (revisado por Roldan, 1994).

En la mayoría de células, el *target* de la DAG es la proteína kinasa C, enzima regulador clave en los mecanismos de transducción. Sin embargo, la intervención de este enzima en los mecanismos de la exocitosis acrosomal ha sido objeto de debate. Mientras que ciertos autores proponen la participación de este enzima en la reacción acrosómica (Breitbart y col., 1992), otros tienen evidencias de que esta kinasa no está implicada en los acontecimientos que conducen a la fusión (Roldan y Harrison, 1988). Por lo que también ha sido sugerido que en ausencia de la proteína kinasa C, el DAG sirve para estimular la fosfolipasa A2 (Roldan, 1994).

De hecho, la fosfolipasa A2 podría ser un instrumento en la reacción acrosómica, especialmente debido a que su activación podría conducir a la formación de lípidos fusigénicos. Importantes evidencias demuestran que la fosfolipasa A2 es esencial para la exocitosis (Roldan, 1994). La activación de este enzima da lugar a la formación de lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, algunos con una posible actividad fusigénica que podría

acelerar, estimular o inducir la reacción acrosómica (Langlais y Roberts, 1985). Además, algunos de ellos pueden también servir como sustrato para la generación de otros metabolitos activos como el alquil-acetil-glicerofosfolina (también conocido como *platelet activating factor* o PAF) o eicosanoides. Por otra parte, recientes estudios sobre el efecto de PAF exógeno en espermatozoides humanos, sugieren su intervención en la inducción de la reacción acrosómica y en la penetración de ovocitos de hámster libres de ZP (Angle y col., 1993).

Es interesante remarcar que recientes estudios han demostrado que una serie de proteínas pueden también tener un importante papel en la fusión, aunque ninguna de ellas ha sido identificada. Además existen evidencias ultraestructurales que el masivo desplazamiento de las glicoproteínas transmembranales que cubren el acrosoma es, de hecho, un paso previo en la reacción acrosómica (Aguas y Pinto da Silva, 1989).

Papel de enzimas like-tripsina en la reacción acrosómica

Varios investigadores han sugerido que un enzima tipo-tripsina del espermatozoide podría estar implicado en los fenómenos de fusión de membranas de la reacción acrosómica (Dravland y col., 1984, Meizel, 1984,) o en la dispersión de la matriz acrosomal (Shams-Borhan y Harrison, 1981, Perreault y col., 1982, Flaherty y Swann, 1993).

Recientemente, ha sido demostrado que inhibidores de la tripsina bloquean la reacción acrosómica en espermatozoides humanos y de hámster (Pillai y Meizel, 1991, Llanos y col., 1993, Llanos y col., 1993), previniendo el influjo de Ca^{++} , lo que sugiere que un enzima tipo-tripsina podría intervenir en el incremento de Ca^{++} intracelular de los espermatozoides en los primeros eventos de la reacción acrosómica. Además ha sido demostrada la presencia de acrosina activa en la membrana plasmática que cubre el acrosoma en espermatozoides humanos antes de que la reacción acrosómica inicie (Tesarik y col., 1990). Todos estos descubrimientos sugieren que un enzima tipo-tripsina, probablemente la acrosina, interviene en los eventos moleculares de la reacción acrosómica (Llanos y col., 1993).

Es interesante remarcar que aunque la reacción acrosómica progesterona-inducida es bloqueada por los inhibidores de la tripsina (Pillai y Meizel, 1991), la actividad de unión de los receptores con la hormona no se ve comprometida (Tesarik y Mendoza, 1993), por lo que la actividad proteolítica parece ser necesaria en los eventos subsiguientes a la unión receptor-ligando.

También ha sido reconocido en los espermatozoides, un enzima tipo-tripsina que tiene un papel en la penetración de la ZP, a través de una limitada proteólisis de glicoproteínas de la ZP (Fraser, 1982). Se ha sugerido que el enzima tipo-tripsina espermático implicado en la unión y reconocimiento de los gametos es la acrosina o su forma zimógena proacrosina (Töpfer-Petersen y Henschen, 1987; Jones y col., 1988). Sin embargo, no está claro si este enzima o su zimógeno podrían participar en la unión primaria y/o secundaria del espermatozoide a la ZP. En ratón, ha sido sugerido que la acrosina está implicada en ambos tipos de unión (Saling, 1981; Bleil y col., 1988). Por el contrario, otros autores sugieren que un enzima tipo-tripsina podría estar implicado en la reacción acrosómica, pero no en la unión primaria entre los gametos (Llanos y col., 1993).

1.5. HIPERACTIVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Como ya se ha mencionado anteriormente, los espermatozoides permanecen un cierto tiempo en el istmo del oviducto antes de migrar al lugar de fecundación, siendo un número muy escaso los que alcanzan la ampula. Algunos de los espermatozoides que permanecen en el istmo y la mayoría de los que ascienden a la ampula exhiben un tipo especial de movimiento vigoroso. A este cambio en el modelo de movimiento del espermatozoide, Yanagimachi (1981) lo denominó *hiperactivación*, para diferenciarlo del término *activación* que se refiere al inicio del movimiento en los espermatozoides epididimarios.

El movimiento de hiperactivación se caracteriza por un incremento en la asimetría y amplitud de la curvatura flagelar, debido a una gran flexibilidad del flagelo, principalmente de la pieza intermedia, y por una baja progresión cuando son observados en un porta al microscopio óptico (Suarez y col., 1992). Sin embargo, el modelo de movimiento hiperactivado de los espermatozoides no es exactamente el mismo en todas las especies. De hecho, lo más importante en la hiperactivación es el aumento en el empuje generado por el flagelo, y no el modelo particular de movimiento *per se* (Yanagimachi, 1994).

Además, tampoco ha sido posible afirmar si esta hiperactivación es limitada a ciertas especies o si es un fenómeno general en los mamíferos. No obstante, cada vez el número de especies en las que ha sido reconocida es mayor (Yanagimachi, 1988, 1994). De hecho, la hiperactivación ha sido descrita en cada especie mamífera examinada (Katz y col., 1989). Entre estas especies se incluye la ovina (Cummins, 1982; Shams-Borham y Harrison, 1981), bovina (Singh y col., 1983), porcina (Nagai y col., 1984; Suarez y col., 1992).

1.5.1. Significado biológico de la hiperactivación

En la actualidad, es generalmente aceptado que los espermatozoides de prácticamente todos los mamíferos sufren un cambio en el modelo de propagación de la curvatura flagelar como una consecuencia del proceso de capacitación (Katz y col., 1989, Yanagimachi, 1981). Previo a la capacitación, los bateos son casi simétricos y de una amplitud moderada. La transición a la hiperactivación puede ser repentina, pero también puede implicar cambios intermedios en la curvatura (Suarez, 1988).

Cuando espermatozoides hiperactivados son observados al microscopio en medios de baja viscosidad, las trayectorias de éstos son muy curvadas y a menudo trazan un tipo círculo poco definido (Suarez y col., 1983). La causa de esto es la fuerza neta generada por el flagelo que cambia constantemente de dirección, por lo que la hiperactivación bajo condiciones *in vitro* no está bien adaptada para la progresión lineal (Katz y Drobnis, 1990).

Sin embargo, los efectos de los bateos del flagelo hiperactivado en las trayectorias *in vivo* pueden ser bastante diferentes, ya que la geometría de la luz del oviducto es tortuosa y pone al espermatozoides en constante proximidad con la superficie oviductal. De hecho, ha sido posible observar espermatozoides hiperactivados de hámster a través de la pared de la ampula oviductal, lo que reveló trayectorias que progresaban direccionalmente a lo largo de la luz (Katz y Yanagimachi, 1980). La fuerza flagelar constantemente reorientada de estos espermatozoides puede así ayudarles a eludir la retención dentro del epitelio oviductal (Katz y Drobnis, 1990).

Además de facilitar la migración desde el istmo a la ampulla (Katz y Drobnis, 1990), la hiperactivación obviamente proporciona al espermatozoide un fuerte poder de propulsión que parece favorecer su disociación o liberación del reservorio ístmico (Demott y Suarez, 1992; Pollard y col., 1991; Suarez, 1987), así como también para el paso del espermatozoides a través de las envolturas del ovocito, particularmente la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981; 1988, Katz y col., 1989).

La hiperactivación a menudo es considerada como un fenómeno adjunto o consecuencia de la capacitación, debido a que ambos procesos son dependientes del Ca^{++} exógeno y ocurren concomitantemente. Este influjo de Ca^{++} necesario, probablemente tanto para el inicio de la hiperactivación como para la capacitación, asegura que en condiciones normales, estos procesos estén coordinados para proporcionar al espermatozoide todas las capacidades que necesita para alcanzar el ovocito y fecundarlo. Sin embargo, estos fenómenos ocurren en diferentes partes del espermatozoide (Yanagimachi, 1981), y además existen evidencias de que la hiperactivación puede ocurrir independientemente de la capacitación (Yanagimachi, 1981; Suarez y col., 1987, Olds-Clarke, 1990), lo que sugiere que estos procesos calcio-dependientes en el espermatozoides podrían ser controlados separadamente, por compartimentalización y/o por utilización de diferentes proteínas fijadoras de calcio (Olds-Clarke, 1990).

1.5.2. Mecanismos de la hiperactivación

La condición física y composición química del medio influyen marcadamente en el inicio y mantenimiento de la motilidad hiperactivada de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994). El requerimiento de Ca^{++} extracelular para la hiperactivación ha sido descrito en espermatozoides de ratón, cobaya y hámster (Fraser, 1987; Suarez y col., 1987; Yanagimachi y Usui, 1974) y también en el cerdo (Suarez y col., 1992). La presencia de iones de bicarbonato en el medio es beneficioso para la hiperactivación, aunque probablemente no sea esencial (Bhattacharyya y Yanagimachi, 1988; Boatman y Robbins, 1991). Los iones de K^+ (Fraser, 1983) y los tipos de sustratos energéticos (Cooper, 1984; Fraser y Quinn, 1981; Yanagimachi, 1981) también son importantes para el inicio y mantenimiento de la hiperactivación.

Desafortunadamente, muy poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan la hiperactivación. Probablemente, este fenómeno se ocasiona por modificaciones bioquímicas del axonema y/o por alteración del ambiente intracelular que lo rodea. No obstante, ha sido demostrado que tanto el Ca^{++} como el AMPc son importantes reguladores del movimiento de la cola del espermatozoides (Tash y Means, 1983; Ishijima, 1990). Ha sido sugerido que el AMPc es el factor inductor clave de la hiperactivación (White y Aitken, 1989), más que el influjo de Ca^{++} . Un progresivo incremento en los niveles de AMPc precede al inicio de la hiperactivación, siendo el nivel de AMPc dependiente del Ca^{++} (Fournier-Delpech y Thibault, 1993).

Por otra parte, considerables evidencias demuestran que la existencia de alteraciones físicas y químicas en la membrana plasmática de la cola durante la capacitación, como por ejemplo un cambio en la distribución de las partículas proteicas intramembranarias (Koelher y Gaddum-Rosse, 1975), en la fluidez (Wolf y col., 1986) o la metilación de fosfolípidos de la membrana (Llanos y Meizel, 1983), podrían estar relacionadas con la hiperactivación. Según el modelo propuesto por Yanagimachi (1994), algunos de estos cambios en la membrana plasmática de la cola podrían exponer o activar posibles receptores que estimularían la

proteína G, lo que activaría los canales de Ca^{++} . Este influjo transitorio de Ca^{++} en el espermatozoide estimularía la adenilato-ciclasa, dando lugar a un incremento de la concentración intracelular del AMPc e iniciando una cascada de reacciones protein-kinasa. Yanagimachi (1994) también sugiere que la proteína G activada podría activar los canales de Na^+/H^+ (*antiport*), permitiendo un aumento del pH. También Lindemann y Kannous (1989), basándose en sus estudios con espermatozoides desmembrados, propusieron que la hiperactivación podría ser explicada en términos de concentraciones intracelulares de Ca^{++} , H^+ y AMPc. Recientemente, Suarez y col. (1993) han observado un estrecha correlación entre los niveles de Ca^{++} intracelular y la amplitud/frecuencia del bateo del flagelo.

1.6. FECUNDACIÓN

1.6.1. Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito

Todos los ovocitos mamíferos están rodeados por una delgada capa de glicoproteínas, la zona pelúcida. En la mayoría de especies, la ZP está además rodeada por el cumulus oophorus, el cual está todavía asociado al ovocito en el momento de fecundación en la mayoría de especies mamíferas (Yanagimachi, 1988). Sin embargo, en los rumiantes domésticos, el cumulus se pierde rápidamente justo después de la ovulación, de forma que no está presente en el momento del contacto entre el ovocito y los espermatozoides (vaca: Lorton y First, 1979; Crozet, 1984; oveja: Crozet y Dumont, 1984; cabra: Crozet y col., 1987a).

Paso a través del Cumulus oophorus

Los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto son capaces de atravesar el cumulus (Talbot, 1985, Suarez y col., 1984, Cummins y Yanagimachi, 1986). Según los estudios de Cherr y col., (1986), la mayoría de espermatozoides capacitados de hámster atraviesan el cumulus sin haber sufrido la reacción acrosómica. Por lo que el mecanismo de penetración del cumulus más importante parece ser la fuerza mecánica, y no la hialuronidasa liberada durante la reacción acrosómica como se creía anteriormente. Además, también ha sido demostrado que los espermatozoides de algunas especies (rana y erizo de mar) son capaces de atravesar el cumulus sin ninguna intervención enzimática (Talbot y col., 1985).

No obstante, se ha observado que una parte de la hialuronidasa es difundida de los espermatozoides capacitados antes de que se produzca la reacción acrosómica (Joyce y col., 1985) y que la existencia de una porción de la hialuronidasa asociada a la membrana plasmática del espermatozoide (Yanagimachi, 1988, 1989; Crozet, 1991b) podrían facilitar el paso del espermatozoide a través de la matriz de ácido hialurónico en aquellas especies donde el cumulus es persistente tras la ovulación. Asimismo, existen otros enzimas superficiales implicados en la penetración del cumulus como la acrosina (Tesarik y col., 1990), beta-galactosidasa y arilsulfatasa (Nikolajczyk y O'Rand, 1992).

Una vez que los espermatozoides entran en el cumulus presentan un modelo de motilidad conocido como movimiento relacionado con el cumulus. Este movimiento consiste en desplazamientos laterales de la cabeza de baja amplitud y un gran incremento en la frecuencia de bateo flagelar con una trayectoria lineal (Tesarik y col., 1990), el cual es muy diferente del modelo de hiperactivación, generando una fuerza superior (Westphal y col., 1993). Además la combinación del desplazamiento lateral de la cabeza de baja amplitud y la alta fuerza

generada parece producir un efecto *perforador*, el cual actúa sinérgicamente a la presunta digestión enzimática de la matriz del cumulus (Westphal y col., 1993).

En estas especies el cumulus podría actuar como un filtro, seleccionando los espermatozoides capacitados, pero no los reaccionados (Saling, 1989). Asimismo, otras funciones del cumulus han sido descritas como la de actuar de barrera para los espermatozoides morfológicamente anormales (Carrell y col., 1993) o para los parcialmente capacitados (Legendre y Stewart-Savage, 1993).

Interacción del espermatozoide y de la zona pelúcida

Los espermatozoides capacitados se fijan firmemente a la superficie de la zona pelúcida antes de penetrarla, mediante la interacción de moléculas superficiales del espermatozoides y de la ZP (Gwatkin y Williams, 1977). Parece ser que las proteínas fijadoras de carbohidratos median el reconocimiento entre los gametos por fijación con una alta afinidad y especificidad a complejos glicoconjugados de la superficie extracelular del ovocito (Macek y Shur, 1988; revisado por Calvete y col., 1992). Esta irreversible asociación o fijación entre el espermatozoide y el ovocito es precedida por un estado de adhesión reversible entre los gametos, la cual no es especie-específica (Gawtkin, 1977).

La naturaleza química de las moléculas de la zona responsables de esta fijación ha sido estudiada extensamente en el ratón (Wassarman, 1987,1988,1990). En esta especie y probablemente en muchas otras, esta interacción puede ser dividida en 2 fases principales: la fijación primaria que puede ser definida como la interacción de miles de moléculas de ZP3 de la zona y receptores de la membrana plasmática del espermatozoide acrosoma intacto (Bleil y Wassarman, 1986, Wassarman,1990, 1992) y la fijación secundaria que es la interacción entre la glicoproteína ZP2 y los componentes del acrosoma (probablemente acrosina) expuestos tras la reacción acrosómica (Jones y col., 1988; Bleil y col., 1988; Saling, 1989).

Como ya se ha citado anteriormente, la ZP3 sirve no sólo como ligando específico de la fijación primaria, sino también como componente de la ZP responsable de la inducción de la reacción acrosómica (Bleil y Wassarman, 1983, 1986). La fijación de la ZP3 al espermatozoide es específica y saturable (Wassarman, 1987,1988), siendo la *O-linked saccharide moiety* de la ZP3 la responsable de esta fijación (Florman y Wassarman, 1985; Wassarman, 1990) lo que sugiere la existencia de un receptor complementario (R-ZP3) en la superficie del espermatozoide. Es decir, que la interacción entre la ZP y su receptor complementario en el espermatozoide es un ejemplo de adhesión celular mediada por carbohidratos (Miller y Ax, 1990).

Posibles receptores primarios

En la actualidad, la naturaleza de los receptores del espermatozoide que se fijan a la ZP es todavía difícil de definir. No obstante, numerosos componentes han sido propuestos para realizar dicha función (revisado por Gwatkin, 1989; Calvete y col., 1992, Jones, 1990), sugiriendo, la mayoría de los estudios, que estos componentes reconocen específicamente la *moiety* carbohidrato de las glicoproteínas de la zona pelúcida. Asimismo, existen evidencias que sugieren que estos receptores de la ZP3 están localizados en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Bleil y Wassarman, 1986). Estos receptores primarios no

parecen ser una proteína espermática abundante y tampoco parecen localizarse en una región concreta de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto.

Varias proteínas han sido propuestas para ser el receptor primario de la interacción espermatozoide-ovocito: proacrosina (Jones y col., 1988), antígeno PH-20 (Lathrop y col., 1990), galactosiltransferasa (Macek y Shur, 1988; Lopez y col., 1985) y una proteína de 56 KDa (sp56) (Wassarman, 1992). Entre estas proteínas, una que ha recibido considerable atención ha sido una proteína de 95KDa con actividad tirosin-kinasa identificada en espermatozoides de ratón (Leyton y Saling, 1989ab, Saling y col., 1990; Bunch y col., 1992). Proteínas con características similares a ésta última han sido identificadas también en espermatozoides de otras especies como el hombre, toro y gato (Bunch y col., 1992).

Últimamente, también ha sido aislado y caracterizado principalmente en espermatozoides de cerdo, un grupo de proteínas de bajo peso molecular que podrían estar implicadas en la interacción de los gametos como receptores primarios, así como también en la capacitación de los espermatozoides. Estas proteínas pertenecen a una nueva familia de proteínas denominada *spermadhesin* (revisado Calvete y col., 1992).

Numerosos trabajos han descrito que espermatozoides no-capacitados e incluso inmaduros son capaces de fijarse firmemente a la ZP (revisado por Wassarman y col., 1985, Hartmann, 1985), sin embargo, todavía se desconoce si los receptores de estos espermatozoides son idénticos a los de los espermatozoides capacitados. Además, el hecho que espermatozoides acrosoma-reaccionados de algunas especies sean capaces de unirse fuertemente a la ZP (hámster: Yanagimachi, 1981; cobaya: Huang y col., 1981; conejo: Kuzan y col., 1984) hace suponer que la localización de estos receptores en la membrana plasmática que cubre al acrosoma no sea única o la existencia de más de un tipo de receptores para la ZP en la superficie del espermatozoide durante la interacción del espermatozoide-ovocito.

Por otra parte, también ha sido sugerido que las secreciones oviductales parecen modificar los receptores de la ZP y regular la unión entre los gametos (Fraser y Ahuja, 1988).

Penetración de la zona pelúcida

Los espermatozoides deben completar la reacción acrosómica antes de penetrar la ZP (Bedford, 1970; Moore y Bedford, 1983; Yanagimachi, 1981). El mecanismo por el cual el espermatozoide entra y atraviesa la zona todavía no es suficientemente claro, aunque se han propuesto diferentes modelos y teorías.

Hipótesis mecánica

Según esta hipótesis, la penetración a través de las envolturas del ovocito es puramente mecánica, siendo la única función de los enzimas acrosomales la de iniciar o asistir la reacción acrosómica. El único objetivo de la reacción acrosómica es exponer el *perforatorium* (membrana acrosomal interna reforzada por el material subyacente rico en disulfuro). El afilado *perforatorium* corta y abre la zona mecánicamente a medida que el espermatozoide batea su cola vigorosamente, siendo la fuerte motilidad del espermatozoide el único requerimiento para la penetración de la zona. Varias evidencias apoyan esta hipótesis (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

Hipótesis enzimática

Por el contrario, esta hipótesis considera que cada paso de la penetración a través de la ZP es enzima-dependiente. Durante la reacción acrosómica, los enzimas hidrolíticos contenidos en el acrosoma son liberados por el espermatozoide en la superficie de la ZP. Parte de la hialuronidasa difundida digiere el ácido hialurónico de la región externa de la zona (Talbot, 1984). En cambio, la acrosina no disuelve la ZP *per se*, sino que hidroliza glicoproteínas específicas, modificando la textura de la ZP (Dunbar y col., 1985; Urch y col., 1985ab). A pesar de cierta controversia respecto a su localización, la presencia de acrosina en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides reaccionados (Tesarik y col., 1988; Bleil y col., 1988) sugiere que la activación y conversión acelerada de la proacrosina en acrosina activa, en presencia de las glicoproteínas de la ZP, soporta el tránsito del espermatozoide a través de la ZP mediante el ataque proteolítico dirigido contra ésta (Eberspächer y Donner, 1992).

Por otra parte, existen evidencias bioquímicas que sugieren que este enzima tiene, independientemente a la actividad proteolítica, la capacidad de fijarse a la ZP (Topfer-Peterson y Henschen, 1987). Recientemente, ha sido propuesto un modelo de penetración de la ZP en cerdo que consiste en que la acrosina puede funcionar como receptor de fijación secundaria entre el espermatozoide reaccionado y la ZP del ovocito. De este modo, la acrosina puede entonces digerir localmente la red de la ZP y por autodigestión puede liberarse de su dominio fijado a la membrana espermática, permitiendo al espermatozoide libre moverse más profundamente a través de la ZP (Calvete y col., 1992).

Anteriormente, un modelo similar había sido propuesto por O'Rand y col. (1986), en el cual la alternancia de ciclos de fijación-digestión de las proteínas de la ZP y la liberación a partir de la ZP, junto con la motilidad del espermatozoide permitirían la penetración del espermatozoide a través de la ZP. También otro modelo interesante fue el propuesto por Green (1988), según el cual los espermatozoides liberan el enzima acrosomal lisina, que es incapaz de hidrolizar la zona a menos que las uniones no-covalentes de las moléculas de la zona hayan sido rotas por el poder de empuje generado por el espermatozoide hiperactivado.

Debido a que tanto la hipótesis enzimática como la mecánica tenían puntos débiles, lo que parece más probable es que la penetración de la zona se realice mediante la combinación de la acción mecánica aportada por el movimiento hiperactivo del espermatozoides y de la acción enzimática aportada por el material acrosomal, como han sugerido los anteriores modelos. Sin embargo, no se ha podido determinar la importancia relativa de cada uno de los mecanismos (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

Independientemente del mecanismo de penetración, el espermatozoide que atraviesa la zona presenta un movimiento vigoroso de su flagelo acompañado por un movimiento de la cabeza en distintas direcciones (Gaddum-Rosse, 1985), siguiendo una trayectoria oblicua en la mayoría de especies (Wassermann, 1987, Crozet, 1991b).

La especificidad de la interacción espermatozoide-ovocito es muy evidente entre especies distantes, sin embargo, no es estrictamente especie-específica (O'Rand, 1988), ya que espermatozoides de una especie pueden unirse y penetrar la zona de otra especie estrechamente relacionada, e incluso entre especies relativamente distantes (revisado por

Yanagimachi, 1994).

1.6.2. Fusión de los gametos

El espermatozoide fecundante, tras haber atravesado la ZP, cruza el espacio perivitelino rápidamente, entra en contacto y se une a la membrana plasmática del ovocito (oolema) y poco después todo el cuerpo del espermatozoide es incorporado en el citoplasma del ovocito (ooplasma) (Gaddum-Rose, 1985; Phillips y Shalgi, 1982; Shalgi y col., 1989).

En los mamíferos, a diferencia de otros animales, es la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide acrosoma-reaccionado, no la acrosomal interna, la que se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, siendo la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial el lugar donde se inicia la fusión (Moore y Bedford, 1983), por lo que la posición del espermatozoide es tangencial al ovocito (revisado por Crozet, 1991b). A continuación, la región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas al ovocito mediante la fusión de las membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es fagocitada por el ovocito (Yanagimachi, 1994)

Durante la reacción acrosómica, la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial sufre un gran cambio fisiológico que le confiere la habilidad de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito a través de algún mecanismo todavía desconocido (Yanagimachi, 1981,1988,1989; Crozet, 1991b). No obstante, parece razonable asumir que el contenido acrosomal liberado durante la reacción acrosómica altere la membrana que cubre el segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994). De hecho, ha sido propuesto una posible intervención de la acrosina (Dravland y Meizel, 1982; Takano y col., 1993) en este proceso, por el cual esta membrana se convierte en fusigénica. Entre las posibles sustancias mediadoras de la fusión, varias proteínas localizadas en la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial del espermatozoide han sido identificadas (revisado por Yanagimachi, 1994).

Respecto al lugar del ovocito donde se produce la fusión con el espermatozoide, nunca o muy raramente ocurre en la área de la membrana plasmática del ovocito que está encima de la placa metafásica de la 2ª división meiótica (Ebensperger y Barros, 1984), la cual está desprovista de microvellosidades, a diferencia del resto de la superficie del ovocito (Shalgi y Phillips, 1980). Aunque parece ser la membrana plasmática de las zonas intermicrovellosidades, la destinada para la fusión (Moore y Bedford, 1983).

Al contrario que la capacitación reacción acrosómica y las interacciones con las envolturas del ovocito, los requerimientos del medio son mínimos para la fusión del espermatozoide con el oolema (Yanagimachi, 1994). No obstante, los espermatozoides requieren una concentración milimolar de Ca^{++} para la fusión (Fraser, 1987). Asimismo, los iones de K^+ parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la habilidad fusigénica de la membrana del espermatozoide (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988; Boldt y col., 1991). Además, la fusión de los gametos es temperatura dependiente y puede ser reversiblemente bloqueada por un pH ácido (<6) (revisado por Yanagimachi, 1994).

Durante la fecundación, la membrana plasmática del espermatozoide se integra en la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1981; Gaunt, 1983), mientras que la acrosomal interna se incorpora al citoplasma. En los mamíferos, con raras excepciones, la

entrada de la cabeza del espermatozoide dentro del ovocito va seguida por una gradual incorporación de la cola del espermatozoide completa (Gaddum-Rosse, 1985; Phillips, 1991). Es generalmente aceptado que los elementos no-nucleares del espermatozoides integrados son degenerados en el ovocito, y no intervienen en el posterior desarrollo embrionario del cigoto (Hiraoka y Hirao, 1988). También las mitocondrias espermáticas, las cuales son transcripcionalmente competentes cuando entran en el ovocito, rápidamente degeneran (Hiraoka y Hirao, 1988). Sin embargo, algún ADN mitocondrial espermático puede persistir y ser transmitido a la próxima generación (Gyllensten y col., 1991).

Por otra parte, el paso a través de la zona no es esencial para la fusión de los gametos, como es el caso de la FIV de ovocitos libres de zona pelúcida (Yanagimachi y Noda, 1970) o cuando los espermatozoides son microinyectados en el espacio perivitelino (Mann, 1988), siempre que los espermatozoides sean acrosoma-reaccionados para poder fusionarse.

1.7. ACTIVACIÓN DEL OVOCITO

Tras la fusión con el espermatozoide, el ovocito metabólicamente quiescente inicia una serie de fenómenos morfológicos y bioquímicos, referidos como *activación* del ovocito, que permitirán la división y diferenciación celular y la formación de un nuevo individuo. Los signos más fácilmente reconocibles de esta activación en mamíferos es la exocitosis de los gránulos corticales y la reanudación de la meiosis.

Los ovocitos mamíferos pueden ser activados por una gran variedad de estímulos químicos y físicos (revisado por Yanagimachi, 1988,1994). Todos estos estímulos parecen causar un aumento de la concentración intracelular del Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_i$) (Tombes y col., 1992). Aunque los ovocitos mamíferos son potencialmente capaces de activarse e iniciar el desarrollo sin intervención del espermatozoide, en condiciones normales es el espermatozoide el que activa al ovocito.

El mecanismo de esta activación por el espermatozoide no se conoce exactamente, aunque varias posibilidades han sido descritas. Yanagimachi (1987) propuso que la porción de la membrana plasmática del espermatozoide que se incorpora a la del ovocito contenía algunas proteínas específicas que podían causar una perturbación local, y probablemente temporal, de los lípidos de la membrana del ovocito, lo que podría ser el detonante primario de la activación del ovocito. Más tarde, ha sido propuesto que la activación podía ser desencadenada por la unión de un posible ligando del espermatozoide con un receptor del oolema (revisado por Yanagimachi, 1994). Asimismo, ha sido sugerido la existencia de un factor soluble que introducido por el espermatozoide en el citoplasma del ovocito provocaría la activación de éste (Swann, 1990; Stice y Rolb, 1990).

Respecto a los reguladores endógenos de la activación del ovocito en mamíferos, estudios bioquímicos sugieren que la participación del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y del Ca^{++} es necesaria (revisado por Cherr y Ducibella, 1990). En general, se considera que la fusión de los gametos causa periódicos incrementos de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ e hiperpolarizaciones de la membrana (Miyazaki e Igusa, 1981). De hecho, el incremento transitorio del $[\text{Ca}^{++}]_i$, provoca un incremento de la permeabilidad al K^+ de la membrana plasmática y, como consecuencia, cambios sucesivos en el potencial de membrana que se propagaran desde el punto de penetración del espermatozoide al resto de la membrana del ovocito (Crozet, 1991b).

De hecho, ha sido demostrado que la liberación de Ca^{++} inducida por el IP_3 a partir de las reservas de Ca^{++} es la causa del incremento de la $[\text{Ca}^{++}]_i$, en el lugar de penetración del espermatozoide. Además, la liberación de Ca^{++} inducida por el IP_3 es el mecanismo esencial para la generación de ondas y oscilaciones de Ca^{++} en los ovocitos fecundados (Miyazaki y col., 1992), lo que indica que la cascada de hidrólisis de la PIP_2 es la responsable de los incrementos transitorios de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ (Miyazaki, 1991). Asimismo, la continuación de estos repetidos incrementos de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ requiere Ca^{++} extracelular, por lo que Miyazaki (1991) postula que la fusión de los gametos causa un continuo incremento en la permeabilidad del oolema al Ca^{++} extracelular, así como una persistente producción de IP_3 .

1.7.1. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la poliespermia

Los gránulos corticales, los cuales derivan probablemente del aparato de Golgi, son pequeñas y esféricas vesículas limitados por membrana que contienen enzimas hidrolíticos y componentes sacáridos. En el momento previo o tras la ovulación, estos gránulos se localizan alineados justo debajo de la membrana plasmática del ovocito maduro no-fecundado (revisado por Cherr y Dulcibella, 1990; Yanagimachi, 1994).

Durante la fecundación o activación, el ovocito inicia un proceso de exocitosis denominado *reacción cortical*, causado probablemente por el incremento del Ca^{++} citoplasmático libre. Esta reacción cortical consiste en la fusión de estos gránulos con la membrana plasmática del ovocito. De este modo, el contenido de estos gránulos es liberado al espacio perivitelino (Hyttel y col., 1988), induciendo la *reacción zonal*, que consiste en una alteración de las características químicas y físicas de la zona pelúcida, dando lugar a un endurecimiento de su estructura (*zona hardening*) y una modificación de los receptores para los espermatozoide, evitando así la penetración de más espermatozoide (Wassarman, 1987, Crozet, 1991b, Yanagimachi, 1988).

En el ratón, según Wassarman (1987), la reacción zonal es debida a una hidrólisis (inactivación) de la ZP3 por una proteinasa o glicosidasa liberada por los gránulos corticales, lo que produce que los espermatozoide no puedan fijarse firmemente a la ZP, así como debida a una parcial hidrólisis de la ZP2 producida por una proteasa liberada durante la activación (Moller y Wassarman, 1989).

No obstante, la reacción zonal mediada por los gránulos corticales no es el único mecanismo de bloqueo de la poliespermia. Además, a nivel de membrana plasmática se producen una serie de cambios conocidos como *bloqueo vitelino* o *bloqueo de la membrana plasmática del ovocito* que evitan la fusión de más espermatozoide. Desafortunadamente, no se conocen los mecanismos de este bloqueo en mamíferos, no obstante posibles mecanismos han sido examinados (revisado por Yanagimachi, 1988,1994;Cherr y Dulcibella,1990).

La relativa eficacia de la reacción zonal o del bloqueo vitelino para evitar la poliespermia varía en función de las especies (revisado por Yanagimachi, 1988, Crozet, 1991b).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la exocitosis de los gránulos corticales ocurre *explosivamente* tras la fecundación, sin embargo, un considerable número de gránulos en los ovocitos no-fecundados son liberados antes de la fecundación, incluso durante la maduración del ovocito dentro del ovario e *in vitro* (Dulcibella y col., 1989). El significado biológico de

esta prematura exocitosis no está todavía claro, pero podría estar relacionado con la formación del espacio perivitelino, lo que facilitaría la fusión de los gametos (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994).

1.7.2. Reanudación de la meiosis

El núcleo del ovocito, el cual se había quedado parado en la metafase II, completa la 2ª división meiótica tras la fusión de los gametos, pasando por la Anafase II, Telofase II y la expulsión del segundo corpúsculo polar. Esto da lugar a un ovocito con un núcleo haploide y un citoplasma que conserva casi todas las moléculas e informaciones almacenadas durante su crecimiento y que utilizará posteriormente durante los primeros estadios del desarrollo embrionario.

Ha sido sugerido que el mantenimiento del bloqueo meiótico de los ovocitos en metafase II puede depender de la síntesis de proteínas de corta vida, siendo probablemente el incremento transitorio de la $[Ca^{++}]_i$ tras la fecundación, el desencadenante de la degradación de estas proteínas. De hecho, la importancia del aumento de la $[Ca^{++}]_i$ en la progresión de un ciclo celular al próximo ya ha sido reconocido (revisado por Yanagimachi, 1994).

1.8. FORMACIÓN DE LOS PRONÚCLEOS

1.8.1. Descondensación del núcleo del espermatozoide

Uno de los primeros fenómenos que ocurren cuando el núcleo del espermatozoide se incorpora en el citoplasma del ovocito maduro es una rápida desintegración de la membrana nuclear, lo que dará lugar a una exposición directa de la cromatina del espermatozoide al citoplasma del ovocito. La naturaleza del factor(s) responsable de esta rápida desintegración es todavía desconocido.

Un prerrequisito para las posteriores transformaciones en el núcleo del espermatozoide es una reducción de los puentes disulfuro de las protaminas. Una vez que suficientes puentes disulfuros han sido liberados, presumiblemente por acción de la *glutathione* (GSH), la cromatina se expande o descondensa, como respuesta a factores del ovocito todavía no identificados. Durante este proceso, las protaminas (nucloproteínas específicas del espermatozoide) parecen ser eliminadas, incluso antes de que la descondensación de la cromatina sea evidente. El mecanismo de eliminación de estas protaminas durante la fecundación no se conoce exactamente, pero ha sido sugerido que degradaciones enzimáticas o cambios de carga inducidos por la fosforilación de estas proteínas podrían estar implicados en el proceso (revisado por Perreault, 1990; Yanagimachi, 1994).

Esta eliminación gradual de protaminas parece ocurrir previamente a la deposición de las histonas derivadas del citoplasma del ovocito, lo que sugiere que durante un intervalo de tiempo entre la descondensación y la formación del pronúcleo, el ADN del espermatozoide puede estar libre de proteínas (revisado por Yanagimachi, 1994). Por otra parte, se ha considerado que el reemplazamiento de las histonas es esencial para la reactivación de la cromatina espermática, como se evidencia por la replicación del ADN pronuclear.

1.8.2. Formación y desarrollo de los pronúcleos

El núcleo del espermatozoide descondensado y el grupo de cromosomas que quedan en el ovocito después de completar la meiosis son rodeados de nuevo por membranas nucleares y se transforman en el pronúcleo masculino y femenino, respectivamente (revisado por Yanagimachi, 1988, Hyttel y col., 1988, Crozet, 1991b).

La formación de ambos pronúcleos ocurre en la periférica del ovocito y de forma sincrónica, aunque en las primeras etapas la cromatina femenina está en un estado de condensación más acentuado que la masculina. Inmediatamente después de que se forman las membranas nucleares que los rodean, los pronúcleos aumentan de tamaño y adquieren la forma esférica característica (Hyttel y col., 1988).

Si los factores citoplásmicos presentes en el ovocito que controlan el desarrollo del pronúcleo masculino y los que regulan el desarrollo del pronúcleo femenino son idénticos (Wright y Longo, 1988) o diferentes (Yanagimachi, 1981) es todavía una cuestión no resuelta. No obstante, uno de estos factores citoplásmicos ha recibido el nombre de MPGF (*male pronucleus growth factor*) (Thibault y Gerard, 1973), el cual parece encontrarse únicamente en aquellos ovocitos que han completado su maduración citoplásmica.

La cantidad disponible de material citoplásmico necesario para la formación de los pronúcleos masculino y femenino (*pronucleus formative material, PMF*) en un ovocito mamífero parece ser limitada. Asimismo, este PMF no parece ser especie-específico (revisado por Yanagimachi, 1994).

Una vez los pronúcleos están formados, se produce la síntesis de ADN (duplicación de los cromosomas) para prepararse para la primera división mitótica del desarrollo embrionario. Esta síntesis de ADN se inicia casi sincrónicamente en ambos pronúcleos. Asimismo, ha sido establecido que los ovocitos durante su estadio pronuclear sintetizan proteínas nuevas, probablemente usando ARN mensajero materno almacenado (revisado por Yanagimachi, 1994).

1.8.3. Migración de los pronúcleos y formación del huso de la primera división mitótica

Los pronúcleos completamente formados se aproximan en el centro del ovocito o cigoto, con el fin de poder reunir, en el huso de la primera división mitótica, los cromosomas de origen paterno y materno (Hyttel y col., 1988). Tanto los microfilamentos de actina como los microtúbulos son esenciales en esta migración (revisado por Crozet, 1991b; Yanagimachi, 1994).

Los cromosomas paternos y maternos se condensan dentro de los pronúcleos en oposición. En los mamíferos, las membranas nucleares de ambos pronúcleos forman unas ondulaciones muy próximas entre ellos. Estas membranas se rompen y los cromosomas se ordenan en el huso de la primera división mitótica (sincronización metafásica) que se había formado previamente en esta región citoplásmica. (Hyttel y col., 1987).

La alineación de los cromosomas en el huso puede ser considerado como el fin de la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988, 1994), ya que

seguidamente se producirá la separación y migración de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos, formación de las membranas nucleares, la citocinesis y la formación de dos blastómeros idénticos marcando el fin de la primera división embrionaria.

2. CAPACITACIÓN *IN VITRO*

En 1963, Yanagimachi y Chang fueron los primeros que documentaron que los espermatozoides mamíferos podían ser capacitados *in vitro*, concretamente espermatozoides epididimarios de hámster dorado. Aunque el éxito de la fecundación *in vitro* indicaba claramente el éxito de la capacitación, el sistema usado era demasiado inconcreto y complejo para determinar qué había causado la capacitación de los espermatozoides. A partir de que Toyoda et al. (1971a,b) obtuvieran por primera vez una FIV exitosa de ovocitos de ratón usando un medio *químicamente definido*, los medios de FIV y capacitación *in vitro* han sido enormemente simplificados, lo que ayudó a analizar mucho más fácilmente los mecanismos de la capacitación.

Desgraciadamente, no existe un único medio capaz de soportar la capacitación y fecundación *in vitro* en todas las especies. Los espermatozoides y ovocitos de cada especie parecen requerir su propio ambiente específico para realizar sus funciones más efectivamente. De hecho, los espermatozoides de algunas especies, incluyendo al hombre, no requieren ningún componente especial en el medio para la capacitación. Medios basados en simples soluciones salinas equilibradas suplementadas con fuente de energía y proteínas apropiadas son suficientes para la capacitación. Sin embargo, espermatozoides de otras especies requieren sustancias adicionales en el medio para el éxito de la capacitación. Además, el tiempo requerido para la capacitación varía entre especies. Concretamente, la capacitación en rumiantes requiere mucho más tiempo que en roedores y hombre, lo que obliga a utilizar condiciones de cultivo que mantengan la supervivencia y vitalidad de los espermatozoides durante varias horas.

Los sistemas de capacitación *in vitro* tienen como objetivo simular la secuencia de fenómenos que normalmente ocurren en el tracto reproductivo de la hembra. Generalmente, los métodos utilizados en espermatozoides de animales domésticos están basados en modificaciones de técnicas empleadas en especies de laboratorio, donde tanto la FIV como la capacitación *in vitro* han sido mucho más intensamente estudiadas. Los espermatozoides pueden ser capacitados mediante diferentes formas de manipulación implicando distintos tipos de medios.

Entre los medios básicos usados comúnmente para la capacitación *in vitro* destacan el *defined medium* o DM, también conocido como BO (Brackett y Oliphant, 1975), el medio *Krebs-Ringer bicarbonate* modificado o m-KRB (Toyoda y Chang, 1974) y el medio Tyrode modificado (Fleming y Yanagimachi, 1982), así como otras soluciones modificadas de los mismos como el DM-Hepes o DM-H (Crozet y col., 1987b) o el medio *Tyroses/Albumin/Lactate/Pyruvate* o TALP (Bavister y Yanagimachi, 1977). En general, todos estos medios son soluciones modificadas de los medios clásicos, como el Krebs-Ringer o Tyrode, suplementadas con fuentes energéticas apropiadas (glucosa, lactato y piruvato) y albúmina. Especialmente en humana, también son utilizados otros medios de cultivo más complejos como Ham F-10 o el B2.

2.1. AGENTES CAPACITANTES E INDUCTORES DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA *IN VITRO*

2.1.1. Modificación de la osmolaridad del medio

Uno de los primeros sistemas de capacitación utilizado en los rumiantes, adaptado a partir de técnicas desarrolladas en el conejo (Brackett y Oliphant, 1975), fue la incubación de espermatozoides bovinos en un medio de alta fuerza iónica (HIS, *high ionic strength*, 380 mOsm.) descrito por Brackett y col. (1982), el cual desplazaba las proteínas de revestimiento de la superficie del espermatozoide que podían inhibir la capacitación. Aunque esta técnica fue probada exitosamente con el nacimiento de terneros (Brackett y col., 1982; Sirard y Lambert, 1986), estudios posteriores cuestionaron la necesidad de tratamientos hipertónicos para la inducción de la capacitación (Bondioli y Wright, 1983).

Más tarde, Iritani y col. (1984) confirmaron que espermatozoides eyaculados de toro podían ser capacitados mediante una preincubación en un medio químicamente definido e isotónico (290 mOsm.), obteniendo las mayores tasas de fecundación cuando los espermatozoides eran recogidos un día antes de la inseminación, mantenidos durante 14-18 horas a 20°C en un tubo, lavados una vez y entonces pre-incubados durante 8 horas en el medio isotónico m-KRB ($1-1.2 \times 10^8$) en un incubador de CO₂. Estos autores sugirieron que las primeras etapas de la capacitación como la disociación de las proteínas de revestimiento y otros cambios en la membrana plasmática del espermatozoide eran iniciadas durante el almacenamiento de los espermatozoides a 20°C. Concretamente en el caprino, Song y Iritani (1985) obtuvieron la mayor tasa de fecundación normal (57%) de ovocitos madurados *in vitro* con espermatozoides epididimarios mantenidos durante 18 horas a 20-25°C en condiciones semi-anaeróbicas y preincubados durante 6 horas a una concentración de $40-50 \times 10^7$ /ml. No obstante, a pesar de haber sido demostrado su utilidad, estas prolongadas incubaciones reducen marcadamente la viabilidad de los espermatozoides así como la motilidad, lo que limita su utilización (Wheeler y Seidel, 1986).

De todas formas, tanto las tasas de fecundación obtenidas mediante la utilización del medio HIS como del medio isotónico normalmente fueron bajas y con una considerable variación entre machos, por lo que ninguno de estos sistemas ha sido considerado de aplicación general.

2.1.2. Modificación del pH

En el porcino y ovino, los valores del pH usado en los sistemas de capacitación y FIV han sido considerados de gran importancia. De hecho, Cheng (1985) obtuvo la mayor tasa de fecundación de ovocitos ovinos cuando los espermatozoides fueron almacenados a temperatura ambiente (20°C) durante 4 horas, lavados, expuestos a un pH elevado de 7.8 durante 40 minutos en medio 199 modificado (medio 199-SS) antes de ser utilizados para la FIV. Este tratamiento probablemente no sólo disocia las proteínas de la superficie del espermatozoide, sino que también induce la entrada de calcio en las células.

2.1.3. Uso de albúmina sérica bovina

Ha sido frecuentemente demostrado que la exposición de espermatozoides mamíferos a la albúmina sérica bovina (BSA) en una solución salina fisiológica apropiada induce la

capacitación *in vitro* (revisado por Langlais y Roberts, 1985; Langlais y col., 1988; Parks y Ehrenwald, 1990). De hecho, la BSA es incluida de forma de rutinaria en los medios de cultivo utilizados en FIV. Dow y Bavister (1989) sugirieron que la albúmina sérica podía jugar un papel clave en la eliminación del colesterol y/o zinc del espermatozoides, ya que esta proteína tiene una considerable capacidad ligadora de ambas moléculas. Como ya se ha mencionado anteriormente, la gradual eliminación del colesterol de la membrana del espermatozoide por parte de alguno/s de los componentes presentes en los fluidos del tracto reproductor femenino como la albúmina puede ser una parte esencial del proceso de la capacitación (Davis, 1981).

2.1.4. Uso de fluido folicular y oviductal

Fluidos foliculares de varias especies mamíferas poseen la habilidad de capacitar espermatozoides e inducir la reacción acrosómica durante la incubación *in vitro* (Tesarik, 1985; Suarez y col., 1986). Fukui y col. (1983) observaron que el fluido folicular bovino (FFB) podía influir favorablemente sobre la capacitación. También en el bovino, McNutt y Killian (1991) demostraron que el fluido folicular (FF) era capaz de capacitar e inducir la reacción acrosómica. Respecto a los componentes presentes en el FF responsables de este efecto capacitante, Grimek y col. (1984) aislaron proteoglicanos de bajo peso molecular en folículos bovinos. Los proteoglicanos están compuestos por un esqueleto proteico con numerosas cadenas de heteropolisacáridos, las cuales están principalmente compuestas de glicosaminoglicanos (GAG). Varios GAG han sido identificados como efectivos inductores de la capacitación *in vitro* (Lenz y col., 1982; Handrow y col., 1982; Ax y Lenz, 1987). Además, existen otros componentes del FF que pueden iniciar la reacción acrosómica como la albúmina (Lui y col., 1977), la progesterona (Meizel y col., 1990), así como también se ha observado actividad de transferencia de lípidos (Ravnik y col., 1990), lo que podría causar una pérdida de colesterol de la membrana. No obstante, el papel del FF en la capacitación *in vivo* no está todavía claro (Mortimer y Camenzind, 1989).

Por otra parte, en el bovino ha sido demostrado que el fluido oviductal (FOD) estral contiene un factor capacitante que exhibe propiedades similares a las de los GAG *heparine-like*, probablemente la heparina-sulfato (Parrish y col., 1989; Uguz y col., 1992). No obstante, McNutt y Killian (1991) demostraron que FOD luteal capacitaba espermatozoides y también observaron que tanto el FOD luteal y no-luteal capacitaban de manera dosis-dependiente. Asimismo, estos autores observaron que los espermatozoides eran capacitados en FOD, pero la reacción acrosómica no era estimulada a menos que los espermatozoides interaccionaran con sustancias inductoras como la lisofosfatidilcolina, zona pelúcida solubilizada o FF. En este trabajo, McNutt y Killian sugieren que el FF puede contener tanto factores inductores de la reacción acrosómica como capacitantes, requiriendo menos tiempo para capacitar los espermatozoides que el FOD.

2.1.5. Uso del ionóforo de calcio (A23187)

Ha sido demostrado la importancia de un flujo de Ca^{2+} extracelular hacia el interior del espermatozoides en el proceso de la capacitación e inducción de la reacción acrosómica (Yanagimachi y Usui, 1974). El ionóforo de calcio ha sido utilizado con éxito, incrementando directamente el contenido de Ca^{2+} intracelular del espermatozoide e induciendo la reacción acrosómica calcio-dependiente (Green, 1978; Shams-Borhan y Harrison, 1981; Hanada,

1985a). De hecho, el ionóforo de calcio es de especial interés debido a su extendida utilización en varias especies. Concretamente en el caprino, el ionóforo de calcio A23187 ha sido utilizado a menudo por varios autores (Shorgan, 1984, Hanada, 1985b).

En ocasiones, junto a un breve tratamiento (1 minuto) con ionóforo de calcio A23187 (0.1 μM), se añade cafeína u otros inhibidores de la fosfodiesterasa como la pentoxifilina al medio de capacitación para elevar el AMPc del espermatozoides, aumentando el número de espermatozoides que sufren reacción acrosómica (McLaughlin y col., 1992).

Yang y col.(1993), al comparar en espermatozoides bovinos el tratamiento con ionóforo A23187 y con heparina, observó que el tratamiento con ionóforo era más sencillo y producía un mayor número de embriones, sugiriendo que este tratamiento es más ventajoso para producir embriones in vitro que los tratamientos con heparina.

2.1.6. Adición de suero de oveja en celo

La adición de suero de oveja en celo inactivado (56°C) en el medio ha sido propuesto con éxito para la capacitación de espermatozoides de morueco y macho cabrío (Crozet y col., 1987b, De Smedt y col., 1992), mientras que el suero de cabra en celo inactivado fue menos potente (Crozet y col., 1992). La presencia natural de la albumina en el suero, junto a otros factores específicos contenidos en el suero de oveja en celo, además de favorecer la eliminación del colesterol de la membrana del espermatozoide, podrían actuar a otros niveles favoreciendo la capacitación espermática. Además, en este sistema el pH del medio aumenta progresivamente a partir de 6-6.5 del eyaculado, a 7 durante el swim-up, 7-7.5 durante la capacitación, y finalmente 7.5-7.9 en el medio de fecundación.

2.1.7. Electopermeabilización

Tomkins y Houghton (1988) han demostrado que es posible inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos por electopermeabilización, aunque reduciendo significativamente la motilidad. Palermo y col. (1992) indujeron la reacción acrosómica de espermatozoides humanos mediante la incubación durante 24 horas en medio T6 seguido de electroporación e incubación durante pocas horas en medio T6 con 3.5 mM de pentoxifilina, para su posterior utilización en la inseminación subzonal de los ovocitos, obteniendo altas tasas de fecundación.

Por otra parte, Sweeney y Tomkins (1993a,b) observaron que era posible inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de toro sin pérdida de motilidad o viabilidad mediante la sofisticada técnica del Baekonisation. No obstante, aun no se ha descrito el uso de este nuevo método de inducción de la reacción acrosómica en la FIV en especies domésticas.

2.1.8. Liposomas de fosfatidilcolina

Recientemente se ha establecido un método muy efectivo para inducir la reacción acrosómica sin la necesidad de largos periodos de capacitación in vitro en espermatozoides de toro, morueco y caballo (Graham y col., 1987). Este método consiste en la adición de liposomas de difauroylfosfatidilcolina (PC12) en los espermatozoides durante 15 minutos. Previamente, Graham y col. (1986) habían demostrado que los fosfolípidos de fosfatidilcolina que contienen

cadenas de ácidos grasos de 12 carbonos o menos son efectivos en la inducción de la reacción acrosómica de espermatozoides bovinos. La incubación de liposomas de fosfatidilcolina (PC) con cadenas de ácidos grasos tanto de 10 (PC10) o 12 (PC12) carbonos dio lugar a que más del 90% de los espermatozoides exhibieran reacción acrosómica al cabo de 15 minutos. Sin embargo, la PC10 rápidamente redujo la motilidad, mientras que con liposomas de PC12, los espermatozoides permanecían móviles durante varias horas. Asimismo, la tasa de penetración de ovocitos de hámster libres de zona se vio incrementada cuando espermatozoides bovinos fueron tratados con estos liposomas (Graham y Foote, 1987a,b; Graham y col., 1987; Wheeler y Seidel, 1988a,b). No obstante, así como en otros sistemas de capacitación, también la variación entre toros es evidente en espermatozoides frescos tratados con liposomas (Graham y Foote, 1987a,b). Estudios posteriores (Graham y col., 1990) establecieron la especificidad de este tratamiento, especialmente con respecto a la perturbación de compartimientos individuales del espermatozoides como la membrana plasmática en general, la membrana plasmática que cubre el acrosoma y las mitocondrias.

2.1.9. Progesterona

En espermatozoides humanos, se ha demostrado que la progesterona ovárica incrementa el paso de calcio a través de la membrana plasmática espermática y que incrementa el número de espermatozoides acrosoma-reaccionados. Sueldo y col. (1992) observaron que la utilización de progesterona (1 µg/ml) en la FIV humana estaba asociada con un incremento de la fijación a la zona pelúcida, penetración de los ovocitos, motilidad hiperactivada y reacción acrosómica. También Dasgupta y col. (1993) demostraron que la progesterona podía acelerar significativamente la capacitación y la reacción acrosómica. Además ha sido demostrado que la exposición secuencial de los espermatozoides a la pentoxifilina y la progesterona da lugar a una más efectiva estimulación de la capacitación y reacción acrosómica (Dasgupta y col., 1993), aunque estas sustancias afectan a la capacitación a través de mecanismos independientes.

2.1.10. Medio Tyrodes libre de calcio

Estudios realizados por Ijaz y Hunter (1989a) mostraron que el tratamiento de los espermatozoides de toro por lavado en solución salina-BSA (pH 7.6) e incubación durante 4 horas en medio Tyrode libre de calcio (pH 7.6) daba lugar a la capacitación. Asimismo, observaron que este tratamiento podía ser utilizado para la FIV, obteniendo tasas de fecundación del 56%.

2.1.11. Uso del *TEST-Yolk Buffer*

El *TEST-Yolk buffer* ha sido utilizado para capacitar espermatozoides bovinos (Ijaz y Hunter, 1989b,c, 1992). Ha sido sugerido que la actividad capacitante reside en las moléculas TES y Tris. Estos autores concluyen que el almacenamiento de los espermatozoides en este tampón durante 4-48 horas podría dar lugar a la capacitación. De hecho, una tasa de fecundación del 87% fue obtenida tras diluir (1:10) semen fresco de toro en *TEST-Yolk buffer*, refrigerado a 4°C y almacenado durante 8 horas (Ijaz y Hunter, 1989c).

2.1.12. Heparina y otros glucosaminoglucanos

Varios glucosaminoglucanos (GAG) como el *chondroitin sulfate*, *heparin-like material* y ácido hialurónico, han sido identificados en el tracto genital femenino (Lee y Ax, 1984; Lee y col., 1986), siendo considerados como efectivos inductores de la capacitación *in vitro* (Lenz y col., 1982; Handrow y col., 1982; Ax y Lenz, 1987). Asimismo, ha sido observado que la concentración de los GAG en el tracto femenino decrece desde el cérvix hacia las regiones anteriores, observándose también cambios en la concentración y composición de éstos durante el ciclo estral de la hembra (Lee y Ax, 1984; Lee y col., 1986), lo que puede ser biológicamente importante para el espermatozoide.

El efecto de diferentes GAG sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido minuciosamente estudiada en el bovino, siendo la heparina la más potente en inducir la capacitación en espermatozoides bovinos (Handrow et al., 1982). Esta capacidad parece estar relacionada con el contenido en sulfatos de la molécula de heparina (Ax y Lenz, 1987). No obstante, el efecto capacitante de los GAG no es exclusivo de esta especie, ya que también ha sido demostrado en espermatozoides de otras especies como el cerdo (Reyes y col., 1984) y el conejo (Lenz y col., 1983b). En el conejo, al igual que en el bovino, la heparina es también el más potente de los GAG.

Parrish y col. (1988a) han demostrado que la heparina induce la capacitación de los espermatozoides de manera dosis-dependiente, aunque ha sido observado que altas concentraciones de heparina fueron incapaces de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de conejo (Lenz y col., 1983b). Esto es similar a las observaciones realizadas en espermatozoides bovinos, donde concentraciones muy altas de GAG (>250 µg/ml) no fueron efectivas al inducir la reacción acrosómica (Lee et al., 1985). No obstante, se han observado diferencias en los efectos de la heparina en los espermatozoides de distintas especies, ya que mientras en espermatozoides bovinos la heparina estimula la capacitación, en espermatozoides capacitados de hamster parece inducir la reacción acrosómica sin afectar a la capacitación (revisado por Parrish y col., 1989a).

De los distintos métodos de capacitación de espermatozoides que han sido desarrollados y examinados para su utilización en la FIV, la utilización de heparina es probablemente la que mayor atención ha recibido, especialmente en el bovino. Concretamente desde que Parrish y col. (1985a) demostraron que la heparina podía preparar a los espermatozoides (epididimarios y eyaculados) para la reacción acrosómica y la FIV, este método ha sido considerado como uno de los más fisiológicos y repetibles (Parrish y col., 1985b), convirtiéndose así en uno de los métodos más utilizados en la mayoría de los laboratorios. De hecho, el incremento de la tasa de FIV de los ovocitos inseminados con espermatozoides congelados bovinos tratados con heparina ha sido observado por numerosos autores como Lu y Gordon (1988), Leclerc y col. (1992) o Saeki y col. (1995). También en el caprino ha sido observado este efecto beneficioso de la heparina en la capacitación *in vitro* de espermatozoides y en la FIV (Younis y col., 1991; Ling y col., 1992; Cox y col., 1994, Keskinetepe y col., 1994).

Parrish y col. (1985b, 1988a) observaron que los espermatozoides bovinos requerían una incubación con heparina de mínimo 4 horas para incrementar el porcentaje de ovocitos penetrados y para que los cambios relacionados con la capacitación fueran detectados, mediante la habilidad de los espermatozoides a sufrir la reacción acrosómica después de una

corta exposición a la fosfatidilcolina.

Respecto al mecanismo de acción de la heparina, su unión al espermatozoide parece ser necesaria para la inducción de la capacitación. Ha sido demostrado en el bovino que la heparina se une a la membrana mediante una unión del tipo ligando-receptor (Handrow y col., 1984), probablemente mediante proteínas de unión de la membrana plasmática del espermatozoide procedentes del plasma seminal (Miller y col., 1990; Nass y col., 1990; Thérien y col., 1995). De hecho, los espermatozoides eyaculados tienen más lugares de unión a la heparina que los espermatozoides epididimarios (revisado por Miller y Ax, 1990). Asimismo, existen importantes evidencias que sugieren que la heparina estimula la entrada de Ca^{2+} y la alcalinización intracelular en espermatozoides bovinos (Handrow y col., 1986; Parrish y col., 1989a). Leclerc y col. (1992) han demostrado que la heparina reduce la concentración de calmodulina en el espermatozoide durante la capacitación, lo que podría reducir la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa y permitir un incremento del Ca^{2+} intracelular.

La heparina actúa durante la capacitación en los espermatozoides bovinos, facilitando indirectamente la reacción acrosómica, por lo que la heparina ha sido considerada más como un agente capacitante que no un componente inductor de la reacción acrosómica (revisado por Miller y Ax, 1990). Asimismo, ha sido demostrado un efecto del nivel de heparina en la capacitación en los distintos machos (Leibfried-Rutledge y col., 1989), por lo que la dosis y tiempo de incubación con la heparina son importantes factores que pueden afectar la FIV y el subsiguiente desarrollo embrionario (Lu y Gordon, 1988; Fukui y col., 1990).

No obstante, a pesar de su extendida utilización, las condiciones óptimas de este tratamiento no han sido totalmente establecidas. Mientras ciertos autores adicionan la heparina directamente en el medio de FIV (Shi, 1991; Guyader y col., 1990; Marquant-LeGuienne y col., 1990), otros someten a los espermatozoides a una pre-incubación con heparina previa a la inseminación de los ovocitos. En semen congelado bovino, un tiempo de pre-incubación de unos 15 minutos con una concentración de heparina de 10 $\mu\text{g/ml}$ en el medio es considerado generalmente satisfactorio (revisado por Brackett y Zuelke, 1993), aunque algunos autores varían tanto el tiempo (Fukui y col., 1990) como la concentración (100 $\mu\text{g/ml}$, Choi y col., 1991; Lu y Gordon, 1988). Tampoco en el caprino se ha logrado fijar las condiciones óptimas para obtener las mejores tasas de fecundación y división de los ovocitos.

Por otra parte, ha sido demostrado en el bovino que una concentración de glucosa de 5mM retrasa la inducción de la capacitación *in vitro* por la heparina, probablemente debido a que el metabolismo de la glucosa acidifica el pH intracelular, lo que retrasa la alcalinización inducida por la heparina (Parrish y col., 1989a). No obstante, estas concentraciones habituales de glucosa en los medios de cultivo (5mM) sólo inhiben la capacitación durante 4-5 horas. Se ha demostrado que la incubación de espermatozoides bovinos con heparina y glucosa durante 12 horas induce la capacitación, detectada por la sensibilidad de los espermatozoides a la fosfatidilcolina y por su capacidad fecundante (Parrish y col., 1989a). No obstante, Uguz y col. (1992) han sugerido que este efecto de la glucosa podría ser prevenido por la adición de análogos del AMPc o inhibidores de la fosfodiesterasa como la cafeína. De hecho, ha sido demostrado que la cafeína y la heparina actúan sinérgicamente para inducir la capacitación y reacción acrosómica y estimular la FIV de los ovocitos (Niwa y Ohgoda, 1988).

Asimismo, Susko-Parrish y col. (1990) sugirieron que la variabilidad observada entre los

distintos autores que utilizan heparina para la FIV puede ser debida a la presencia o ausencia de penicilamina, hipotaurina y epinefrina en el medio de FIV.

2.1.13. Papel de los β -aminoácidos y catecolaminas

En mamíferos, existen evidencias que indican que las catecolaminas están implicadas en la fecundación (Leibfried y Bavister, 1982). Concretamente, ha sido demostrado que la epinefrina estimula la motilidad de los espermatozoides (Leibfried y Bavister, 1982), induce la reacción acrosómica (Meizel y Working, 1980) e incrementa la penetración de los ovocitos (Leibfried y Bavister, 1982).

Ha sido demostrado que los β -aminoácidos, como los aminoácidos sulfonados, taurina y su precursor, la hipotaurina están presentes en los fluidos seminal y oviductal. Leibfried y Bavister (1982) demostraron que la exposición previa de los espermatozoides de hámster a la hipotaurina era un prerrequisito para la acción de la epinefrina en la capacitación. La hipotaurina incrementa la motilidad de los espermatozoides y la penetración de los ovocitos (Leibfried y Bavister, 1981). En el bovino, Ball y col. (1983) demostraron que la adición de hipotaurina y epinefrina al medio era favorable para la FIV. También en el bovino, la hipotaurina (0.5mM) ha sido utilizada para la capacitación de espermatozoides (Saeki y col., 1990, 1991a, 1991b), pero los periodos de incubación fueron largos (7-8h).

Asimismo, Meizel y Working (1980) demostraron que la penicilamina incrementaba el porcentaje de espermatozoides que sufrían reacción acrosómica en presencia de epinefrina. De hecho, Andrews y Bavister (1988,1989) demostraron que espermatozoides de hámster podían ser capacitados *in vitro* con D-Penicilamina, que es un quelante de cationes divalentes (zinc). Parece probable que el zinc podría inhibir la capacitación de los espermatozoides manteniendo al espermatozoide en un estado metabólico quiescente, similar al que están durante el almacenamiento epididimario.

A pesar de que la adición de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) en el medio de fecundación es una práctica habitual en la mayoría de laboratorios, pocos investigadores han evaluado los efectos de la PHE en la fecundación (Susko-Parrish y col., 1990; Miller y col., 1994). Susko-Parrish y col. (1990) describieron un efecto sinérgico entre los componentes de la PHE y sugirieron que la adición de la PHE disminuía el tiempo para la penetración de los ovocitos, pero no alteraba la máxima penetración de los ovocitos en incubaciones prolongadas de los gametos. Miller y col. (1994) observaron que la adición de PHE promovía la división temprana de los ovocitos y producía una mayor proporción de embriones competentes para el desarrollo *in vitro*, probablemente debido a un efecto anti-oxidante en el medio de fecundación. De hecho, ha sido demostrado que la hipotaurina y epinefrina limitan la formación de superóxidos, lo que inhibe la peroxidación de los lípidos del espermatozoides (Alvarez y Storey, 1983).

2.1.14. Uso de cultivos de células epiteliales del oviducto

Pollard y col. (1991) describieron que los espermatozoides se unían a las células epiteliales del oviducto a los pocos minutos de ser introducidos en el co-cultivo e indicó que esta interacción física era la responsable del mantenimiento de la motilidad y capacidad fecundante del espermatozoides. Asimismo, ha sido demostrado en el bovino que el contacto entre los

espermatozoides y las células epiteliales del oviducto parece alterar las membranas del espermatozoide (Ellington y col., 1989) e inducir la capacitación (Guyader y col., 1989). Ellington y col. (1993) observaron que el co-cultivo con células del oviducto modifica los perfiles proteicos de los espermatozoides bovinos y de caballo.

Varios estudios han sugerido que la incubación de los espermatozoides con células epiteliales del oviducto puede ser un método de capacitación eficiente y uno de los más fisiológicos (Li y col., 1990; Guyader y Chupin, 1991, Ellington y col., 1991, 1992), incluso con células del oviducto congeladas (Goldman y col., 1991). Además, la adición de células epiteliales del oviducto al medio de fecundación incrementa la tasa de división de los ovocitos (Holm y col., 1991; Miller y col., 1994).

2.2. FACTORES QUE AFECTAN LA CAPACITACIÓN *IN VITRO*

2.2.1. Temperatura

La capacitación es un proceso temperatura-dependiente. La temperatura de incubación de 37-38°C, usada en la mayoría de laboratorios, es aparentemente adecuada para soportar la capacitación *in vitro* en la mayoría de especies (revisado por Yanagimachi, 1988, 1994). Sin embargo en los ruminantes y cerdo, donde la fecundación *in vivo* ocurre a una temperatura corporal de 38-39°C, la capacitación *in vitro* puede lograrse mucho más eficazmente a una temperatura ligeramente superior a 38°C. De hecho, una pequeña diferencia de temperatura puede producir una gran diferencia en el estado físico de los lípidos de membrana (Holt y North, 1986).

Concretamente en el bovino, Lenz y col. (1983b) observaron que la frecuencia de FIV era superior cuando la temperatura era de 39°C. Asimismo, es probable que la temperatura además de controlar la eficacia de la capacitación, controle la habilidad de sufrir la reacción acrosómica fisiológica en respuesta a la interacción con la zona pelúcida (First y Parrish, 1987).

2.2.2. Procedencia de los espermatozoides

Aunque tanto los espermatozoides de la cola del epidídimo como los eyaculados son considerados completamente maduros, su comportamiento en los cultivos *in vitro* no es necesariamente el mismo debido a la existencia de diferencias en su habilidad para ser capacitados. Concretamente, los espermatozoides epididimarios bovinos pueden capacitarse en sencillas soluciones salinas (Ball y col., 1983), mientras que los espermatozoides eyaculados no se capacitan a menos que agentes capacitantes sean añadidos al medio (Parrish y col., 1985c, 1986).

Como ya ha sido mencionado previamente, los factores de decapitación presentes en el plasma seminal parecen ser los responsables de estas diferencias. Existen amplias evidencias de indican que algunos de los componentes del plasma seminal se unen muy firmemente a la superficie de los espermatozoides eyaculados, por lo que repetidos lavados con soluciones fisiológicas sencillas no son capaces de eliminarlos (revisado por Yanagimachi 1988, 1994).

En general se considera que los espermatozoides epididimarios fecundan los ovocitos *in vitro*

más fácilmente que los eyaculados (revisado por Yanagimachi, 1994).

2.2.3. Uso de semen fresco o congelado

Wheeler y Seidel (1986) demostraron que el semen fresco requiere un periodo de incubación más largo que el semen congelado. También, Parrish y col. (1984) observaron que los espermatozoides frescos eyaculados requerían un tratamiento con heparina más largo que los espermatozoides congelados. Sin embargo, los espermatozoides congelados-descongelados se deterioran más rápidamente que los frescos. Además, Seaton y col. (1991) obtuvieron mejores tasas de penetración con espermatozoides frescos. Sin embargo, la utilización de semen fresco en los sistemas de FIV presenta el problema de que su calidad es menos predecible debido las posibles diferencias entre eyaculados.

A pesar de que el uso de semen congelado está enormemente extendido en la inseminación artificial y probablemente en la mayoría de laboratorios de FIV, todavía la supervivencia de los espermatozoides es bastante baja. Además, el diluyente empleado para congelar los espermatozoides puede ser un factor que afecte a la capacitación *in vitro* inducida por heparina (First y Parrish, 1987).

2.2.4. Variaciones inter- e intraespecies

Ha sido demostrado que es más difícil capacitar *in vitro* espermatozoides de algunas especies que de otras. Concretamente, la capacitación *in vitro* fue mucho más difícil de lograr en rumiantes que en roedores y en el hombre. Mientras que espermatozoides de algunas especies no requieren ningún componente especial en el medio para la capacitación, otras especies requieren sustancias adicionales en el medio para el éxito de la capacitación.

Asimismo, el tiempo mínimo y medio necesarios para la capacitación *in vitro* difieren considerablemente de una especie a otra. Estas variaciones son probablemente debidas a las diferencias innatas en las características físicas y químicas de la membrana plasmática. No obstante, los tiempos mínimos y medios requeridos para la capacitación, tanto *in vivo* como *in vitro*, no están rígidamente fijados. Dentro de unos límites, los tiempos varían dependiendo de estado fisiológico del animal y composición química del medio.

También han sido descritas considerables variaciones entre diferentes machos, entre eyaculados de un mismo macho e incluso entre espermatozoides de un mismo eyaculado, respecto a la habilidad de sus espermatozoides a ser capacitados (buscar citas). Espermatozoides recogidos de toros (Brackett y col., 1982, Iritani y col., 1986) y de moruecos (Fukui y col., 1988) difirieron en gran medida en su capacidad de fecundar ovocitos *in vitro*. Estas diferencias pueden ser debidas, al menos en parte, por las condiciones subóptimas de capacitación y fecundación. Por lo que algunas modificaciones de las condiciones de cultivo propuestas recientemente parecen atenuar esta variación como por ejemplo aumentando la concentración de Ca^{2+} en el medio de FIV en el ovino (Huneau y Crozet, 1989) o ajustando la concentración de heparina en función de los eyaculados de los diferentes toros (Leibfried-Rutledge y col., 1989). Por el contrario, la heparina a bajas concentraciones (0.05 $\mu\text{g/ml}$) es óptima para seleccionar los toros sementales, en función de las tasas de FIV obtenidas (Marquant-LeGuienne y col., 1990; Blottner y col., 1990; Whitfield y Parkinson, 1992).

Además, las diferencias entre machos no sólo son evidentes en su contribución al proceso de fecundación, sino también en el subsiguiente desarrollo embrionario (Hillery y col., 1990; Eyestone y First, 1989; Marquant-LeGuienne y col., 1990).

Otra posible causa de estas diferencias podría ser las variaciones en la composición del plasma seminal entre machos (Shi, 1991), ya que variaciones a nivel de los factores de decapitación podrían afectar a los espermatozoides eyculados. De hecho, cuando se utilizaron espermatozoides epididimarios, las diferencias entre machos no fueron tan evidentes (Goto y col., 1989).

Además, influencias genéticas en la capacitación y en el tiempo de capacitación deben ser consideradas (revisado por Yanagimachi, 1994).

2.2.5. Presencia del cumulus

En la mayoría de mamíferos, el cumulus persiste alrededor del ovocito no sólo durante la fecundación *in vivo*, sino también durante algún tiempo después que el ovocito ha sido fecundado (revisado por Yanagimachi, 1988). Sin embargo, en los ruminantes el cumulus se pierde rápidamente después de la ovulación, de forma que ya no está presente en el momento del contacto entre el ovocito y los espermatozoides (vaca: Lorton y First, 1979; Crozet, 1984; oveja: Crozet y Dumont, 1984; cabra: Crozet y col., 1987a).

La presencia de cumulus alrededor de los ovocitos no es esencial para la FIV (Ball y col., 1983; Mahadevan y Traunson, 1985; Yanagimachi, 1981), pero puede facilitar la fecundación (Ball y col., 1983). Algunos componentes del cumulus parecen promover la reacción acrosómica de los espermatozoides (Tesarik, 1985; Westrick y col., 1985).

En numerosos sistemas de FIV de ovocitos madurados *in vitro*, los ovocitos son inseminados rodeados del cumulus. De hecho, al comparar diferentes sistemas de capacitación de espermatozoides bovinos, Marquant-LeGuienne y Thibault (1987) encontraron que los ovocitos ovulados desnudos eran fecundados en un porcentaje mucho menor que los ovocitos ovulados rodeados, al menos parcialmente, por células del cumulus. Estos autores sugieren que los espermatozoides no se capacitaron completamente durante el periodo de preincubación y que alcanzaron la capacitación en contacto con las células del cumulus. Es posible que la necesidad de fecundar los ovocitos en presencia de cumulus sea un reflejo de las condiciones subóptimas de los sistemas de capacitación.

2.2.6. Composición del medio de capacitación *in vitro*

Todos los componentes del medio de capacitación deben contribuir, directa o indirectamente, en la capacitación de los espermatozoides. Sin embargo, la ausencia o presencia de algún componente en particular puede no ser crítica para la capacitación, si el resto de componentes y energía endógena puedan soportar la viabilidad de los espermatozoides, la capacitación parece ocurrir. Ha sido demostrado que en medios libres o deficientes en K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , sustratos energéticos exógenos, albúmina o incluso Na^+ y Cl^- , la capacitación tiene lugar (revisado por Yanagimachi, 1988,1994).

No obstante, First y Parrish (1987) indican que la composición del medio puede influir en el

éxito de la fecundación. De hecho, Parrish y col. (1989a) demostraron que la presencia de glucosa (5mM) en el medio interfiere o retrasa la capacitación inducida por heparina. Por el contrario existen componentes que actúan sinérgicamente con la heparina como la cafeína que aceleran la capacitación y reacción acrosómica (Niwa y Ohgoda, 1988).

2.3. VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS PROCESOS DE CAPACITACIÓN *IN VITRO*

Durante la capacitación y reacción acrosómica se producen una serie de cambios en el espermatozoide que pueden ser valorados mediante distintas técnicas laboratoriales. La valoración de estos cambios es de gran importancia en un sistema de FIV para determinar la eficacia del sistema de capacitación *in vitro* utilizado.

Entre las distintas y numerosas técnicas laboratoriales desarrolladas para el análisis de los espermatozoides se encuentran técnicas morfológicas, de marcadores de membrana, de valoración de ciertas funciones del espermatozoides como el test hiposmótico o la capacidad de penetración de ovocitos libres de zona pelucida, etc.

2.3.1. Técnicas morfológicas

La capacidad de los espermatozoides a responder a inductores biológicos es usado como medida de capacitación por muchos investigadores, utilizando la incidencia de reacción acrosómica como un marcador del estado fisiológico del espermatozoides. Numerosas técnicas han sido desarrolladas para evaluar el estado acrosomal de los espermatozoides en varias especies mamíferas (revisado por Cross y Meizel, 1989). No obstante, es necesario y de gran importancia distinguir entre los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica verdadera de los que han sufrido la falsa reacción acrosómica.

Contraste de fases y microscopio DIC

En especies con acrosoma grande como el hámster y el cobaya, la evaluación del estado acrosomal de los espermatozoides mediante la utilización de microscopio de contraste de fases o DIC puede realizarse fácilmente y sin la necesidad de fijar los espermatozoides (Talbot y Franklin, 1976; Cummins y Yanagimachi, 1986). Estas técnicas también pueden ser aplicadas, aunque con dificultad, en especies con acrosomas más pequeños, como en espermatozoides móviles de toro mediante el DIC (Saacke y Marshall, 1968; Aalseth y Saacke, 1986; Pursel y col., 1972) y en espermatozoides fijados de morueco mediante el microscopio de contraste de fases (Shams-Borham y Harrison, 1981) .

Excepto en el cobaya, el movimiento de los espermatozoides debe reducirse para poder valorar el estado acrosomal. Otras desventajas de estas técnicas es que la valoración debe realizarse inmediatamente, así como también la existencia de falsos negativos en el caso de que la pérdida acrosomal no sea completa o en los primeros estadios de la reacción acrosómica.

Por otra parte, estas técnicas requieren pocos espermatozoides para su realización, permiten la valoración simultánea del estado acrosomal y viabilidad del espermatozoide (motilidad), así como el análisis de los espermatozoides en una gran variedad de condiciones y ambientes.

Técnicas de Tinción para microscopio de campo brillante

Debido a que el estado acrosomal en espermatozoides móviles y vivos sólo puede ser valorado en muy pocas especies, distintas técnicas de tinción han sido desarrolladas como métodos alternativos de valoración en el resto de especies. Entre las distintas técnicas disponibles, existen tinciones que permiten la evaluación del estado acrosómico, pero no valoran la viabilidad de los espermatozoides, como la tinción de Wells y Awa (1970), mientras que otras sólo tiñen los espermatozoides muertos sin indicar el estado del acrosoma como las tinciones vitales de Eosina-Nigrosina (Hancock, 1951) o Azul Tripan (Phillips, 1973).

Desafortunadamente no existe ningún colorante capaz de valorar la viabilidad del espermatozoides y el estado acrosómico por sí sólo, por lo que se han utilizado una gran variedad de combinaciones de colorantes para lograr dicho objetivo. Entre las distintas combinaciones desarrolladas para diferenciar las reacciones acrosómicas verdaderas de las falsas se encuentra la Triple Tinción descrita por primera vez en humana (Talbot y Chacon, 1981), la cual también ha sido posteriormente descrita en el caprino (Kusunoki et al., 1984), en el porcino (Vázquez y col., 1989), en el ovino (Garde y col., 1992), en el bovino (Didion y Graves, 1986) y en el caballo (Varner y col., 1987), así como en la mayoría de especies de laboratorio como el ratón (Dudenhausen y Talbot, 1982) e incluso en el ciervo (Garde y col., 1994) entre otras especies salvajes. Esta técnica combina la utilización de un colorante vital como el Azul de Tripan con el colorante acrosomal Rosa de Bengala y el colorante postacrosomal Marrón Bismark, lo que permite clasificar al espermatozoide en cuatro estados o categorías diferentes: 1) espermatozoide vivo con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal de color marrón muy pálido o blanco), 2) espermatozoide vivo que ha experimentado la reacción acrosómica (región acrosomal y post-acrosomal de color marrón muy pálido o blanco), 3) espermatozoide muerto con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región post-acrosomal de color marrón oscuro) y 4) espermatozoide muerto sin acrosoma (región acrosomal y post-acrosomal de color marrón oscuro).

Se han desarrollado otras técnicas de características similares a la Triple Tinción como la Doble Tinción descrita por Didion y col. (1989), pero su utilización no está tan difundida.

Estas técnicas permiten elaborar preparaciones permanentes, lo que permite retrasar su valoración. Asimismo, los reactivos son accesibles y baratos y su valoración sólo requiere la utilización de un microscopio de campo brillante standard. No obstante, estas técnicas presentan ciertos inconvenientes como la larga duración de los protocolos de tinción, la existencia de variabilidad entre los lotes de tinción y de diferencias entre machos.

Microscopía Electrónica de Transmisión (T.E.M.)

La microscopía electrónica de transmisión puede ser utilizada para conocer los cambios ultraestructurales que experimenta el espermatozoides durante la capacitación y reacción acrosómica (Bedford, 1970). Esta técnica también ha sido utilizada para valorar otras técnicas morfológicas, ya que es la técnica que proporciona la información más detallada sobre los cambios que sufre el espermatozoides, especialmente los del acrosoma (Yanagimachi, 1994). No obstante, a la hora de interpretar las observaciones es necesario tomar ciertas precauciones, especialmente respecto a la fijación realizada.

2.3.2. Uso de Fluorescencia

Detección de material intracelular asociado al acrosoma

Un tipo de técnicas de fluorescencia utilizadas para valorar el estado acrosomal es la detección de material intracelular asociado al acrosoma. Dentro de este tipo de técnicas, existen pruebas directas e indirectas.

Las pruebas directas se basan normalmente en la utilización de lectinas. Las lectinas son proteínas y glicoproteínas, principalmente de origen vegetal, que se unen específicamente a restos de carbohidratos de la matriz acrosomal o a la membrana acrosomal externa (Cross y col., 1986; Mortimer y col., 1987), siendo la PSA (*pisum sativum agglutinin*) una de las lectinas más utilizadas (Cross y col., 1986, 1989; Berger, 1990). Para visualizar la localización de las lectinas, éstas son marcadas generalmente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Nicolson y Yanagimachi, 1977).

Las pruebas indirectas se basan en el marcaje mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra antígenos asociados al acrosoma intracelularmente. Estas técnicas se utilizan con frecuencia en espermatozoides de humana y de animales de laboratorio (revisado por Cross y Meizel, 1989), pero no se han desarrollado de la misma manera en las especies domésticas.

Marcadores de membrana

Dentro de los distintos marcadores de membrana utilizados para el estudio del estado acrosomal se encuentra la clorotetraciclina (CTC) (Saling y Storey, 1979). Este antibiótico fluorescente permite no sólo detectar la presencia o ausencia de acrosoma, sino también produce distintos modelos de fluorescencia que reflejan el estado acrosomal y la dinámica de la capacitación. Sin embargo, esta técnica presenta los inconvenientes de que sólo puede ser valorada en las primeras horas después de su realización, debido a la inestabilidad de la fluorescencia, y el que los modelos de la CTC varían entre especies.

Otros marcadores de membrana que han sido utilizados para revelar el estado acrosomal son los anticuerpos contra antígenos expuestos externamente (Saling y col., 1985, Saling y Lakoski, 1985) y los neoglucoconjugados marcados con fluorescencia, generalmente fluoresceína o biotina. Estos últimos son carbohidratos específicos capaces de reconocer proteínas receptoras en las membranas plasmáticas, pudiendo detectar la evolución de proteínas específicas de la membrana del espermatozoide (Sinowatz y col., 1988; Friess y col., 1987).

En general, la utilización de fluorescencia para valorar el estado acrosomal proporciona un mayor contraste e intensidad, por lo que también se han introducido en estas técnicas colorantes nucleares fluorescentes como el Hoeschst 33258 como tinción vital (revisado por Cross y Meizel, 1989; Yanagimachi, 1994) para poder conocer la viabilidad de los espermatozoides. Los dos fluorocromos utilizados pueden ser visualizados individualmente mediante filtros separados o simultáneamente con un microscopio capaz de producir fluorescencia suficientemente intensa.

2.3.3. Fijación espermatozoide-ovocito y tests de penetración de ovocitos

Fijación espermatozoide-ovocito

En FIV humana, Mahadevan y col. (1987) examinaron el número de de espermatozoides unidos a la ZP, sugiriendo que el número de espermatozoides unidos a la zona es funcionalmente importante. La motilidad de los espermatozoides y el número de espermatozoides móviles utilizados para inseminar los ovocitos se correlacionaron significativamente con el número de espermatozoides unidos a la ZP.

En el bovino, Fazeli y col., (1991, 1992) intentaron establecer un test de unión espermatozoide-ovocito para espermatozoides bovinos. Sus resultados mostraron diferencias entre toros en los números relativos de espermatozoides unidos a los ovocitos bovinos, desconociendo si estas diferencias se relacionaban o no con la calidad seminal de los distintos toros.

Tests de penetración de ovocitos

La penetración de la zona pelucida (ZP) de los ovocitos es utilizada en algunos tests como punto final de la capacitación. Aunque el test final de fertilidad de los espermatozoides debería realizarse utilizando ovocitos vivos y normales rodeados por la zona, una valoración preliminar de la fertilidad puede ser realizada utilizando zonas de ovocitos muertos, congelados o las de ovocitos conservados en altas concentraciones de sales neutrales (revisado por Yanagimachi, 1994). En humana, Burkman y col. (1988) desarrollaron el test de la hemizona (*hemizona assay, HZA*) para comparar la capacidad de unión a la zona pelucida de los espermatozoides de un individuo de fertilidad desconocida con los de uno de probada fertilidad.

Para algunos test de fertilidad, el uso de ovocitos normales completamente maduros y con la zona intacta ha sido recomendado. Sin embargo, no siempre se dispone de este tipo de ovocitos, ya sea por razones técnicas o éticas, por lo que pueden ser sustituidos por ovocitos congelados o conservados en sales. Estos últimos presentan un gran espacio perivitelino, y al estar muertos y haber perdido el mecanismo de bloqueo de la poliespermia, un gran número de espermatozoides pueden atravesar su zona y entrar en este espacio. De hecho, ha sido considerado que el número de espermatozoides en el espacio perivitelino es proporcional al grado de capacitación (Boatman y col., 1988). Esta técnica funciona bien en humana y en el hámster, pero no en espermatozoides bovinos (Chian y col., 1991; McBride y col., 1988).

También la utilización de ovocitos de hámster libres de zona pelucida ha sido descrita por varios autores como un posible método de cuantificar la efectividad de los procesos de capacitación *in vitro* (Graham y col., 1986, 1987, Graham y Foote, 1987a,b; Schellander y col., 1989), basándose en que los espermatozoides no pueden penetrar la membrana plasmática de los ovocitos de hámster sin primero haber sufrido la reacción acrosómica. Estos test han sido extensamente utilizados en el análisis de los espermatozoides de humana.

2.3.4. Otras técnicas de valoración espermática

Además de las técnicas desarrolladas para la valoración de la capacitación y reacción

acrosómica, existen otras técnicas que permiten el estudio de otras funciones espermáticas, como la integridad de la membrana o la motilidad, que pueden proporcionar una importante información sobre el estado fisiológico de los espermatozoides. Entre estas técnicas se encuentran la prueba de endósmosis celular o HOS test (*Hypoosmotic Swelling Test*), la cual parece ser un buen indicador de la viabilidad espermática (Jeyendran y col., 1984). Esta prueba mide la capacidad de las membranas del espermatozoides al transporte de fluidos, valorando así la integridad física y funcional de la membrana.

Respecto a la valoración de la motilidad espermática, la introducción en estos últimos años de sistemas de análisis de la motilidad mediante ordenador (*Computer assisted semen analysis, CASA*) ha supuesto una gran avance en la determinación objetiva de las características del movimiento de los espermatozoides.

3. FECUNDACIÓN IN VITRO

El objetivo de la FIV es la penetración del ovocito por parte del espermatozoide para la obtención de un cigoto viable. Así, el éxito de la FIV va a depender principalmente de la consecución de la maduración del ovocito y de la capacitación del espermatozoide, por lo que los diferentes sistemas de FIV requieren la adecuada preparación de los gametos masculino y femenino, así como condiciones de cultivo favorables para la actividad metabólica de ambos gametos.

Una gran variedad de sistemas han sido propuestos en las distintas especies para la FIV, presentando la mayoría de los diferentes protocolos una serie de pasos similares. Generalmente, los espermatozoides son separados del plasma seminal o de los crioprotectores según se trate de semen fresco o congelado, siendo también seleccionados los más móviles en la mayoría de los casos. A continuación, se induce la capacitación espermática utilizando distintos sistemas en un tratamiento previo o en el mismo medio donde finalmente se llevará a cabo la inseminación de los ovocitos.

3.1. PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES PARA LA FIV

3.1.1. Lavado de los espermatozoides

Generalmente en la preparación de los espermatozoides para la FIV, el lavado de semen o separación de los espermatozoides del plasma seminal y su reconstitución en un medio de cultivo es considerado como un paso preliminar en la mayoría de los laboratorios. En el caso del uso de semen congelado, este lavado es también necesario para la eliminación de los crioprotectores y conservantes.

Numerosos han sido los estudios realizados sobre los efectos del plasma seminal en los espermatozoides eyaculados, pero todavía en la actualidad permanecen discutibles. Ciertos autores sugieren que el plasma seminal es importante para el mantenimiento de la motilidad, mientras otros indican que tiene poco efecto o incluso algunos han indicado efectos perjudiciales del plasma en la viabilidad de los espermatozoides (citado por Graham, 1994).

Asimismo, ha sido demostrado que este fluido masculino contiene sustancias estabilizadoras de la membrana del espermatozoide que impiden la capacitación y reacción acrosómica

(revisado por First y Parrish, 1987; Fournier-Delpech y Thibault, 1991; Crozet, 1991a). Oliphant y Brackett (1973) observaron que el lavado de los espermatozoides previo a la incubación aceleraba la capacitación *in vitro*, probablemente por eliminación de estos componentes inhibitorios de la superficie del espermatozoide (Brackett y Oliphant, 1975).

No obstante, parece evidente que los espermatozoides se desprenden de todo el plasma seminal antes de llegar al lugar de fecundación *in vivo*, independientemente de donde se deposite el semen durante el coito. De hecho, es muy improbable que en los momentos próximos a la ovulación penetre plasma seminal en los tubos de Falopio, lo cual se ha evidenciado bioquímica y fisiológicamente (revisado por Hafez, 1989).

De las distintas técnicas de lavado de espermatozoides existentes, la sedimentación por centrifugación de los espermatozoides es uno de los métodos de lavado más rápidos y eficaces (revisado por Gordon, 1994). No obstante, existen evidencias, especialmente en humano, que demuestran que la sedimentación de una población de espermatozoides por centrifugación puede causar la producción de componentes oxígeno reactivos (radicales superóxidos e hidroxilos) dentro del sedimento de espermatozoides lavados, lo que provocaría un daño irreversible en los espermatozoides, perjudicando así su capacidad de fecundación *in vitro* (Aitken y Clarkson, 1988). Este daño subletal se caracteriza por la manifestación retrasada de sus efectos, normalmente disminuyendo la motilidad a lo largo del tiempo (Alvarez y col., 1993).

También en especies domésticas, el lavado de los espermatozoides ha sido asociado con el daño celular (Harrison y White, 1972, Jones y Holt, 1974), por lo que diferentes sistemas de lavado de espermatozoides han sido desarrollados para reducir el efecto perjudicial de la centrifugación. Entre estos métodos se encuentran aquellos que implican también un proceso de centrifugación, pero a través de un medio de alta densidad como la utilización de una solución de Ficoll (Harrison, 1976) que permita eliminar más eficazmente el medio original de los espermatozoides con un mínimo de daño mecánico.

3.1.2. Técnicas de selección de los espermatozoides

En los sistemas de FIV ha sido sugerido, especialmente en la especie humana, que la motilidad espermática es un factor importante en la tasa de fecundación (Mahadevan y Trouson, 1984; Gellert-Mortimer y col., 1988). Por esta razón, varias técnicas han sido desarrolladas para seleccionar los espermatozoides más móviles y viables de una muestra de semen, de especial importancia en semen congelado y en ciertos casos de infertilidad masculina. Entre estas técnicas, el *swim-up* (Lopata y col., 1976; Parrish y col., 1984; Berger y col., 1985) ha sido el método más comúnmente empleado en los laboratorios de FIV (Ng y col., 1992). No obstante, también han sido utilizadas otras técnicas como la filtración en gel de Sephadex (Steno y col., 1985), filtración en esferas de vidrio (Daya y col., 1987), gradientes de albúmina (Ericsson, 1977), gradientes discontinuos de Percoll (Gorus y Pipeleers, 1981).

Técnica del swim-up

Esta técnica se basa en la habilidad de los espermatozoides de nadar hacia arriba en un medio para la selección de los mismos (Lopata y col., 1976; Berger y col., 1985; Tanphaichitr y col.,

1987). Aunque la técnica del *swimp-up* puede seleccionar una muestra de espermatozoides altamente móviles, presenta el inconveniente de una relativamente baja recuperación de espermatozoides.

En estudios de FIV humana, Purvis y Egdetveit (1993) demostraron que colocando los tubos del *swim-up* en un ángulo de 30°, en lugar de colocarlos verticalmente, la recuperación de los espermatozoides aumentaba en un 50-100%.

Respecto al efecto del *swim-up* sobre la FIV, Parrish y col. (1984) describieron por primera vez un incremento de la tasa de fecundación al utilizar esta técnica. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Parrish y col. (1985a,b) y por Keefer y col. (1985). Sin embargo, a menudo esta técnica es omitida en la práctica. De hecho, Catt (1990) obtuvieron un gran número de ovocitos fecundados sin realizar el *swim-up*. La necesidad de realizar esta técnica parece depender de la calidad y motilidad de la muestra de espermatozoides a utilizar.

Varias modificaciones de la técnica del *swim-up* han sido descritas especialmente en la especie humana. Ing y col. (1991) demostraron que la técnica del *swim-down* era más corta, simple y proporcionaba una mejor recuperación de espermatozoides con una alta motilidad que con la técnica del *swim-up*.

Técnicas de filtración en la lana de vidrio

Ha sido demostrado que el semen diluido, cuando es filtrado a través de una capa de pequeñas esferas de vidrio, provoca la retención de los espermatozoides muertos en el filtro; mientras que los vivos pasan a través de él. De hecho, Daya y col. (1987) describieron un consistente método para la separación de los espermatozoides móviles a partir de muestras de semen humano de pobre calidad, mediante la separación a través de una columna de esferas de vidrio. Lechtzin y col. (1991) con semen congelado humano, observaron que esta técnica de separación por filtración era más efectiva que la técnica del *swim-up* para obtener espermatozoides móviles.

También ha sido utilizada la lana de vidrio, en lugar de esferas, por algunos autores. Concretamente, Rana y col. (1989) sugirieron que la filtración de espermatozoides humanos a través de una columna de lana de vidrio seleccionaba una población de espermatozoides con una capacidad de penetración de los ovocitos incrementada. Stubbings y Wosik (1991), con semen bovino congelado, compararon esta técnica con la del *swim-up*, obteniendo resultados similares respecto a la tasa de fecundación y desarrollo embrionario, aunque el tiempo requerido para completar la separación fue mucho menor (3 minutos) en la filtración a través de la lana de vidrio.

Utilización de gradientes de densidad BSA/ Percoll

White y col. (1984) sugirieron que una población de espermatozoides altamente móviles, viables y morfológicamente normales podía ser aislada mediante un gradiente discontinuo de albúmina sérica bovina (BSA). En semen porcino, Estienne y col. (1988) obtuvieron mediante un gradiente discontinuo de BSA una población que presentaba más de un 90% de espermatozoides móviles progresivos.

En la técnica de gradientes de densidad de Percoll, los espermatozoides son separados por equilibrio de acuerdo a su densidad (Bolton y Braude, 1984), recogiendo los espermatozoides con un núcleo denso y homogéneo principalmente en la fracción de mayor densidad del gradiente Percoll.

En la especie humana, se han realizado numerosos estudios comparativos entre esta técnica y la del *swim-up* (Akerlof y col., 1987; LeLannou y Blanchard, 1988, Guerin y col., 1989; Van der Zwalman y col., 1991; Check y col., 1992; Englert y col., 1992). En la actualidad, a pesar de que los resultados obtenidos por los distintos grupos son a menudo contradictorios, debido probablemente a la falta de uniformidad en la preparación de estas técnicas (sobre todo en la del Percoll), esta técnica está ganando aceptación en los laboratorios de FIV. Concretamente Moohan y Lindsay (1993) sugieren que la técnica del Percoll podría ser adoptada como método de elección para la separación de los espermatozoides en las técnicas de reproducción asistida humana.

También en las especies domésticas, la técnica del Percoll ha sido utilizada en los sistemas de FIV (Lessley y Garner, 1983; de Curtis y col., 1986; Utsumi y col., 1988; Berger y Horton, 1988; Berger y Parker, 1989; Mermillod y col., 1992). Sin embargo, existen pocos estudios que comparen la influencia directa de estas distintas técnicas de selección de los espermatozoides sobre la fecundación y desarrollo de los ovocitos en estas especies. No obstante, Seidel y col. (1995) en el bovino observaron que ambos métodos eran satisfactorios, no observando diferencias en las tasas de división de los ovocitos obtenidas mediante la técnica del Percoll y la del *swim-up*.

Uso de ácido hialurónico

El uso de ácido hialurónico ha sido descrito en la selección de espermatozoides móviles bovinos (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1993), sugiriendo que el ácido hialurónico puede ser empleado para mejorar los resultados de FIV.

Larsson y col. (1993) sugirieron que el tratamiento convencional de los espermatozoides mediante el *swim-up* y lavado podía ser sustituido por la migración de los espermatozoides a través de una solución de ácido hialurónico como método de preparación de los espermatozoides para la FIV.

3.1.3. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática

Además de las distintas técnicas desarrolladas para la selección de espermatozoides altamente móviles para la FIV, varios agentes químicos han sido utilizados para estimular y mantener la motilidad de los espermatozoides.

Uno de estos agentes es la cafeína, un inhibidor de la fosfodiesterasa, la cual provoca una acumulación intracelular del AMPc. Este agente aumenta marcadamente la motilidad y respiración de los espermatozoides (Garbers y col., 1971; Ball y First, 1983; El-Gaafary y col., 1990). No obstante, la cafeína parece aumentar la motilidad de los espermatozoides de eyaculados de baja calidad, pero que no tiene o tiene poco efecto en eyaculados de alta calidad (Critser y col., 1984). También un efecto estimulante de la capacidad de penetración de los espermatozoides tratados con cafeína ha sido descrito en estudios de FIV (Ohgoda y

col., 1987; Niwa y col., 1988). Asimismo, un efecto sinérgico de la cafeína y la heparina en la inducción de la capacitación, y posiblemente de la reacción acrosómica, parece dar lugar a un incremento de la tasa de penetración de los ovocitos (Niwa y Ohgoda., 1988).

Otros inhibidores de la fosfodiesterasa como la pentoxifilina (Kay y col., 1993; Moohan y col., 1993) y la teofilina (Fayed y Hattab, 1991) también han sido descritos como estimulantes de la motilidad espermática.

También ha sido sugerido que la *glutathione* (GSH) a una concentración de 5mM puede incrementar la motilidad y fertilidad de los espermatozoides congelados bovinos (Slaweta y Laskowska, 1987), contrarrestando probablemente los efectos de la peroxidación que pueden producirse después de la muerte de los espermatozoides.

La adición al medio de FIV de la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) es una práctica frecuente en un gran número de laboratorios de FIV. De hecho, varios autores han demostrado que la presencia de PHE incrementa significativamente la motilidad espermática y la tasa de penetración (Leibfried y Bavister, 1982; First y Parrish, 1987; Greve y col., 1987; Boatman y col., 1988; Susko-Parrish y col., 1990; Miller y col., 1992, 1994). Sin embargo, Long y col. (1993) no observaron ningún efecto favorable de la utilización de la PHE.

También la adenosina y sus análogos han sido considerados como agentes capaces de aumentar la motilidad de los espermatozoides, estimulando la producción de AMPc (Garbers y Kopf, 1991).

En algunas especies, ha sido demostrado que agentes como el *platelet-activating factor* PAF incrementan la motilidad de los espermatozoides y la tasa de fecundación, aunque el mecanismo por el que interacciona con los gametos permanece incierto (Roudebush y col., 1993).

3.2. PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS PARA LA FIV

3.2.1. Procedencia de los ovocitos

Los ovocitos utilizados en los programas de FIV pueden ser ovocitos ovulados o bien foliculares. Los primeros presentan la ventaja de haber sido madurados *in vivo*, lo que permite un mayor rendimiento de la FIV. Sin embargo, la obtención de este tipo de ovocitos requiere intervención quirúrgica y someter a las hembras a tratamientos de superovulación, encareciendo considerablemente el proceso. Por el contrario, la utilización de ovocitos foliculares, especialmente los obtenidos a partir de ovarios recogidos en el matadero, permite la obtención de un gran número de ovocitos, facilitando la puesta a punto de las técnicas de maduración y fecundación *in vitro* sin la necesidad de costes demasiado elevados.

3.2.2. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos foliculares de ovarios de matadero

Obtención de los ovocitos

Las principales técnicas utilizadas para la recogida de ovocitos a partir de ovarios procedentes

del matadero han sido: la *disección* del folículo, que permite recuperar un alto porcentaje de ovocitos manteniendo al máximo la integridad del cumulus (Lonergan y col., 1991); la *aspiración* del folículo, es una técnica mucho más rápida que la anterior, pero disminuye el porcentaje de ovocitos recuperados por ovario, así como la calidad del cumulus (Leibfried-Rutledge y col., 1985; Lonergan y col., 1991) y las *técnicas de recogida en masa* que permiten obtener un gran número de ovocitos en muy poco tiempo, pero procedentes de folículos muy diversos, lo que hace necesaria una selección muy estricta de los ovocitos (Martino y col., 1994b).

Además de la técnica de recogida de los ovocitos, existen diversos factores que afectan, no sólo al número de ovocitos recogidos, sino también a la calidad de éstos. Uno de estos factores es la edad de la hembra. De hecho, ha sido sugerido que la calidad y número de ovocitos procedentes de hembras prepúberes es inferior a los de las adultas (Wright y col., 1976; Dalhausen y col., 1981; Mermillod y Saumande, 1992; Palma y col., 1993). Asimismo, algunos autores han descrito que la estimulación hormonal con FSH de las hembras parece mejorar la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Cheng, 1985; Lu y col., 1991), aunque otros no observaron ningún efecto (Galli y Moor, 1991). Otro de los factores que pueden influir en la calidad de los ovocitos es el diámetro del folículo del que proceden (Crozet y col., 1986; Crozet, 1989), siendo los folículos de tamaño medio, los más aconsejables para proporcionar ovocitos que den resultados consistentes en los estudios de FIV (Staigmiller, 1988).

No obstante, una estricta selección de los ovocitos permitiría la obtención de ovocitos con una máxima competencia para la MIV. Para ello, se siguen generalmente criterios morfológicos como el aspecto y cantidad de células del cumulus y el aspecto del citoplasma (Leibfried y First, 1979).

Sistemas de maduración in vitro (MIV) de ovocitos foliculares

Medios de cultivo

Una gran cantidad de medios de cultivo han sido utilizados para la MIV, desde soluciones salinas hasta medios más complejos, siendo actualmente el TCM-199, el medio de elección de los sistemas de MIV (revisado por Staigmiller, 1988; Greve y Madison, 1991; Brackett y Zuelke, 1993).

Sistemas de co-cultivo

Ha sido demostrado la importancia del co-cultivo con células de la granulosa sobre la maduración del ovocito (Staigmiller y Moor, 1984). De hecho, la suplementación del medio de maduración con este tipo de células se ha llevado a cabo en numerosos estudios, considerándola esencial para adquirir una plena competencia de desarrollo de los ovocitos de vaca (Crister y col., 1986a; Lu y col., 1987a, Fukui y Ono, 1988, 1989), de oveja (Staigmiller y Moor, 1984, Crozet y col., 1987b) y de cabra (De Smedt y col., 1992; Martino y col., 1995).

No obstante, un efecto similar al co-cultivo con células de la granulosa es posible mediante el cultivo en un volumen reducido de un grupo de ovocitos rodeados por las células del

cumulus (Crister y col., 1986b, Sirard y col., 1988; Greve y Madison, 1991; Younis y col., 1991).

Suplementos del medio de maduración

El medio es suplementado generalmente con suero fetal bovino (FCS) o suero de hembra en celo, al 10 ó 20%. El suero aporta factores no determinados que son importantes en el proceso de la maduración (Trounson, 1992). Algunos de estos factores son hormonas, sobre todo esteroideas (Sirard y col., 1988, Stubbings y col., 1989; Takagi y col., 1991), factores de crecimiento (Takagi y col., 1991) o insulina (Stubbings y col., 1990).

Se han realizado numerosos estudios sobre la importancia de las hormonas en la MIV, centrándose en los efectos de la adición de gonadotropinas y esteroides sobre la maduración (Fukui y Ono, 1989), formación del pronúcleo masculino (Mattioli y col., 1991), división embrionaria (Younis y col., 1989) y posterior desarrollo embrionario (Galli y Moor, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos en estos estudios son a menudo confusos y contradictorios. Esto se debe, al menos en parte, a las diferentes concentraciones y fuentes comerciales de las hormonas añadidas, así como a las diferentes concentraciones de hormonas y esteroides que se encuentran en los diferentes lotes de suero.

Condiciones de cultivo

En los rumiantes, una temperatura de 38.5-39°C (temperatura similar a la corporal) es la más utilizada en los sistemas de MIV (revisado por Staigmiller, 1988; Greve y Madison, 1991).

Respecto al pH y osmolaridad del medio de MIV, los ovocitos soportan márgenes relativamente amplios (Boone y Shapiro, 1990), siendo los valores óptimos entre 7.2-7.4 para el pH y entre 285-320 mOsm para la osmolaridad (Staigmiller, 1988).

La composición de la atmósfera para una maduración óptima ha sido establecida al 5% de CO₂ en aire y con una humedad del 95% (Crosby y col., 1981; Leibfried-Rutledge y col., 1987). No obstante, también es posible realizar el cultivo en aire si el medio está tamponado con Hepes (Crozet y col., 1987b).

El tiempo de maduración depende de cada especie, siendo en los ovocitos de vaca y oveja entre 24-26 horas (revisado por Staigmiller, 1988; Greve y Madison, 1991). En la cabra, existen evidencias de que el tiempo de incubación es ligeramente más largo (Song e Iritani, 1987), obteniendo los mejores resultados con tiempos de 24-25 o 27 horas (Song e Iritani, 1988; Younis y col., 1991; Chauhan y Anand, 1991; De Smedt y col., 1992; Martino y col., 1994a,b).

3.3. INSEMINACIÓN DE LOS OVOCITOS

Varios sistemas de inseminación han sido desarrollados, siendo el co-cultivo de los gametos en microgotas de medio TALP o DM, el método más comúnmente utilizado, especialmente en el bovino. Generalmente, las microgotas son cubiertas con aceite estéril de silicona o parafina para evitar la evaporación y prevenir la entrada de microorganismos y realizando la incubación de los gametos a una temperatura de 38.5-39°C en una atmósfera del 5% de CO₂

para mantener el pH del medio adecuado (Ball y col., 1983; First y Parrish, 1987; Leibfried-Rutledge y col., 1989; Boone y Shapiro, 1990; Gordon, 1990; Greve y Madison, 1991; Trounson, 1992; Brackett y Zuelke, 1993). Un sistema de inseminación similar ha sido utilizado también en el caprino (Younis y col., 1991; Mogas, 1994).

En el ovino, Crozet y col. (1987b) desarrollaron un sistema de inseminación en tubos de medio DM tamponado con Hepes, lo que permite prescindir de la incubación en CO₂. Este sistema también ha sido aplicado con éxito en el caprino (De Smedt y col., 1992; Martino y col., 1994b).

3.4. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA EFICACIA DE LA FIV

Es evidente que el fallo en la consecución de la maduración del ovocito o de la capacitación del espermatozoide dará lugar al fracaso de la FIV. No obstante, la concentración de espermatozoides, el tiempo de interacción de los gametos, el medio utilizado así como otros muchos factores como la temperatura, el pH, la presencia del cumulus o incluso el macho utilizado como donante de semen pueden interferir significativamente en el éxito de la FIV y en el subsiguiente desarrollo embrionario de los cigotos

3.4.1. Concentración de espermatozoides en el medio de inseminación

En los sistemas de FIV, un gran número de espermatozoides son depositados junto a los ovocitos, oscilando la relación ovocito/espermatozoide normalmente entre 1×10^4 a 1×10^6 , lo que puede dar lugar a una elevada incidencia de la poliespermia (Crozet, 1984; 1991a; First y Parrish, 1987), la cual es una de las principales causa de fracaso de la FIV.

Esta necesidad de inseminar con un gran número de espermatozoides se debe principalmente a que las condiciones *in vitro* no permiten mantener la motilidad de los espermatozoides a baja concentración, así como también se debe probablemente a que los habituales sistemas de capacitación *in vitro* son poco efectivos, obteniéndose un bajo porcentaje de espermatozoides capacitados (Crozet, 1991b). No obstante, el número de espermatozoides que rodean a los ovocitos capaces de fecundarlos es a menudo lo suficientemente alto como para incrementar la probabilidad de que muchos espermatozoides penetren la zona pelucida y membrana plasmática del ovocito antes de que se pueda completar el establecimiento del bloqueo de la poliespermia (First y Parrish, 1987).

Por otra parte, los ovocitos incubados con una alta concentración de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación, están expuestos a la acción de enzimas hidrolíticos liberados por los espermatozoides moribundos o ya muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial de desarrollo.

3.4.2. Tiempo de co-cultivo de los gametos

Es generalmente aceptado la necesidad de retirar los ovocitos del co-cultivo lo antes posible para evitar la acción de los enzimas hidrolíticos liberados por los espermatozoides muertos o moribundos. No obstante, el tiempo óptimo de co-cultivo de los gametos puede variar también en función de la interacción de varios factores como la eficacia del sistema de capacitación y fecundación e incluso del sistema de maduración *in vitro*, así como las

diferencias existentes en el tiempo requerido por los espermatozoides individualmente para completar la capacitación (Parrish y col., 1988b).

Aunque también ha sido demostrado que existen diferencias entre machos en el tiempo requerido para la capacitación (Parrish y col., 1988b) y por lo tanto para la penetración de los ovocitos, un periodo de co-cultivo de 24 horas proporcionó una frecuencia de penetración y desarrollo pronuclear equivalente para todos los toros (Leibfried-Rutledge y col., 1989). Asimismo, algunos autores sugieren que el co-cultivo de los espermatozoides y los ovocitos durante 24 horas mejora los resultados de división y desarrollo embrionario respecto a tiempos de co-cultivo inferiores (Younis y col., 1991, Rehman y col., 1993). De hecho, en el bovino, el tiempo de co-cultivo de los gametos es de generalmente 18-24 horas (revisado por Greve y Madison, 1991; Brackett y Zuelke, 1993).

Por otra parte, ha sido sugerido que un periodo excesivo de maduración o un prolongado tiempo de incubación con los espermatozoides puede aumentar la incidencia de la poliespermia debido a que el envejecimiento de los ovocitos reduce su capacidad de bloquear la poliespermia (Cheng, 1985; Pavlok y col., 1988; Crozet, 1991a; Chian y col., 1992). Además, la eficacia para desarrollar este bloqueo es menor en ovocitos madurados *in vitro* que en los madurados *in vivo* (Leibfried-Rutledge y col., 1987).

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE GAMETOS, FECUNDACIÓN IN VITRO Y CULTIVO DE EMBRIONES

1.1. OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma, P-4417) + gentamicina (50mg/l) a 35-37°C en recipientes isotérmicos. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio fue siempre inferior a una hora. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces en PBS + gentamicina a 38.5°C.

Los ovocitos se obtuvieron mediante la técnica del *slicing*, la cual consiste en realizar sucesivos cortes transversales y longitudinales en los ovarios, permitiendo la liberación de los ovocitos en el medio. Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban una o más capas completas y compactas de células del *cumulus* y un citoplasma de aspecto homogéneo y de un tamaño aproximado de 140 µm.

Una vez seleccionados, los ovocitos se lavaron 3 veces y se transfirieron a las microgotas del medio de maduración. Todo el proceso se realizó a una temperatura del laboratorio de 35°C. El cultivo de los ovocitos se realizó a 38,5°C durante 27 horas en una atmósfera del 5% de CO₂ en aire saturada de humedad.

1.1.1. Medio de maduración de los ovocitos

Para la obtención y lavado de los ovocitos previos a la maduración, se utilizó el medio TCM199/Hepes (Sigma, M-2025) suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico y 50 µg/ml de gentamicina. Este medio se ajustó a un pH de 7,4 y se esterilizó con un filtro de membrana de porosidad de 0,22 µm en una cabina de flujo laminar.

El medio utilizado para la maduración de los ovocitos fue el anterior enriquecido con un 20% de suero de cabra en celo inactivado (56°C durante 30 minutos), 10 µg/ml de FSH porcina (OVAGEN), 10 µg/ml de LH ovina (suministrada por Beckers y col.) y 1 µg/ml de 17β-estradiol (SIGMA, E-2257).

El medio de maduración se colocó en placas de Petri de 60mm de diámetro en forma de microgotas de 50 µl de medio cubiertas con aceite de parafina (SIGMA, M-3516) unos 30-45 minutos antes del cultivo de los ovocitos para que el medio se equilibrase con la atmósfera del incubador (5% de CO₂, 95% de aire, saturada de humedad) y así mantener un pH constante y una temperatura adecuada.

1.2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Se obtuvieron los eyaculados de 3 machos cabríos adultos de la raza Murciano-Granadina de probada fertilidad, pertenecientes a la granja de experimentación de la Facultad de Veterinaria de la U.A.B., con la ayuda de una vagina artificial y se transportaron al laboratorio a 37°C en menós de 15 minutos.

Una vez en el laboratorio, se valoró inmediatamente el volumen y motilidad masal de los eyaculados. A continuación se mezclaron los eyaculados a partes iguales y se procesaron según una modificación del método descrito por Younis y col. (1989). Este método consistió en primer lugar en realizar un lavado y selección de los espermatozoides más móviles mediante la técnica del *swim-up*. Para ello, se depositaron 50 µl de la mezcla de eyaculados en el fondo de un tubo cónico que contenía 2 ml de medio de lavado HEPES-TALP. Tras una hora a 38,5°C se recogió 0.6 ml de la parte superior del tubo y se centrifugó a 200xg durante 10 minutos.

Después de descartar el sobrenadante, el sedimento resultante se resuspendió (1:1) en el medio HEPES-TALP con heparina (100 µg/ml), alcanzando así una concentración aproximada de unos 100×10^6 de espermatozoides/ml. Esta pre-incubación se realizó a 38,5°C durante 45 minutos.

1.2.1. Medio de lavado y pre-incubación espermática

El medio utilizado para lavar los espermatozoides fue el medio HEPES-TALP descrito por Parrish y col.(1986), cuya composición se muestra en la tabla 1.

Para la pre-incubación de los espermatozoides tras su lavado, se utilizó el medio HEPES-TALP, pero suplementado con 100 µg/ml de heparina sódica (SIGMA, H-3393).

1.3. FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Después de 27 horas de maduración, los ovocitos se depositaron en las microgotas del medio de fecundación TALP suplementado con hipotaurina (1 µg/ml). Al final de la pre-incubación de los espermatozoides, se valoró la concentración espermática y una alícuota (aprox. 5µl) de la suspensión se introdujo en las gotas de fecundación a una concentración final aproximada de 4×10^6 espermatozoides/ml. El co-cultivo se realizó en microgotas de 100 µl (14-16 ovocitos/gota) durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en aire saturada de humedad.

1.3.1. Medio de fecundación.

Para la fecundación *in vitro*, se realizaron microgotas de 100 µl de medio TALP (solución Tyroides modificada descrita por Parrish y col.,1986; ver tabla 1) suplementado con 1 µg/ml de hipotaurina (SIGMA, H-1384) y se cubrieron con aceite de parafina, introduciéndose en el incubador de CO₂ unos 30-45 minutos antes del inicio del co-cultivo.

Tanto el medio HEPES-TALP como el medio TALP fueron ajustados a un pH de 7,4 y esterilizados con el mismo sistema descrito anteriormente.

1.4. CULTIVO DE EMBRIONES

A las 24 horas de la inseminación, los ovocitos se lavaron y fueron separados de los espermatozoides adheridos con la ayuda de una pipeta, en el medio TCM-199/Hepes suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, 50 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de piruvato sódico y un 10% de suero de cabra en celo. Seguidamente, se transfirieron al cultivo

en monocapa de células de la granulosa para su posterior desarrollo.

Después de 24 horas de co-cultivo (48 horas post-inseminación) se evaluó la división de los ovocitos, clasificándolos en embriones de 2 (Figura 1a) y de más de 2 células (Figura 1b). El porcentaje de división se calculó dividiendo el número de embriones obtenidos (de 2 y de >2 células) entre el número total de ovocitos examinados.

1.4.1. Medio de cultivo de los embriones

Los embriones se cultivaron en una monocapa de células de la granulosa. Para ello, se aspiraron células de la granulosa de los folículos que presentaban menos signos de atresia y se lavaron 3 veces en el medio TCM-199/Hepes suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico y 50 µg/ml de gentamicina. A continuación, una alícuota de estas células se depositó en microgotas de 100µl del medio TCM-199/Hepes suplementado con 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, 50 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de piruvato sódico y un 10% de suero de cabra en celo y se cubrieron con aceite de parafina. Se cultivaron durante 48 horas a 38,5°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en aire saturada de humedad con el fin de obtener una monocapa de células.

Tabla 1: Composición de los medios TALP y HEPES-TALP.

SOLUCIÓN MADRE		gr/l
NaCl		6,660
KCl		0,238
CaCl ₂ .2H ₂ O		0,294
MgCl ₂ .6H ₂ O		0,051
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		0,027
Penicilina G		0,030
Rojo Fenol		0,010

(mg/ml)	HEPES-TALP	TALP
NaHCO ₃	0,16	2,1
Glucosa	0,9	0,9
Piruvato Sódico	0,112	0,02
HEPES	2,38	-
Albúmina Sérica Bovina (BSA)*	6,0	6,0
Lactato Sódico (µl/ml)	3,68	1,7

*(SIGMA, A-6003)

2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1. VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*.

Con el objetivo de valorar el estadio nuclear a las 17 horas de la inseminación, se extrajo de las gotas de fecundación una muestra de ovocitos, de los cuales se separaron los espermatozoides adheridos por agitación en la misma solución de citrato sódico al 3%, se fijaron en ácido acético (90%) y etanol (1:3, v/v) durante 24 horas a 4°C, se tiñeron con lacmoid al 1% en ácido acético al 45% y se observaron al microscopio de contraste de fases.

Los ovocitos con alguna cola de espermatozoide en el citoplasma se consideraron PENETRADOS y se clasificaron en tres grupos: NORMALES ó 2PN (pronúcleo masculino, pronúcleo femenino y cola del espermatozoide)(Figura 2), POLIESPÉRMICOS (2 o más colas de espermatozoide en el citoplasma con las respectivas cabezas condensadas o parcialmente descondensadas o con los pronúcleos ya formados) (Figura 3), y ANORMALES (penetrados por un espermatozoide pero con alguna alteración o retraso en la formación de los pronúcleos, es decir, cabeza del espermatozoide no descondensada o en fase de descondensación, telofase II, cromatina femenina anormalmente descondensada) (Figura 4).

2.2. VALORACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

2.2.1. Procesado de las muestras de espermatozoides

Durante las distintas fases del procesamiento de los espermatozoides, se tomaron muestras con el objetivo de valorar su motilidad, vitalidad y reacción acrosómica.

En primer lugar se tomó una alícuota de 50 µl de la mezcla de los eyaculados y se diluyó en 2 ml de HEPES-TALP para valorar, además de los parámetros anteriormente citados, el porcentaje de formas anormales y la concentración espermática por medio de una cámara de Neubauer (muestra inicial).

A continuación, se recogieron alícuotas de 100 µl de la suspensión de espermatozoides inmediatamente después del lavado, de la pre-incubación con heparina, y por último tras 17 horas de co-cultivo de los espermatozoides con los ovocitos.

2.2.2. Valoración de la motilidad

La estimación de la motilidad se realizó en una pequeña gota (10 µl) de la suspensión de los espermatozoides colocada entre un portaobjetos y un cubre previamente calentados a 37-38°C, usando un microscopio de contraste de fases (x200) equipado con una platina calentable (37-38°C).

En las fases del proceso previas al co-cultivo con los ovocitos, la motilidad fue considerada como el porcentaje de espermatozoides que presentaban un movimiento progresivo (motilidad individual, %MI), mientras que tras el co-cultivo, debido a que prácticamente no se apreciaba motilidad progresiva, la motilidad fue considerada como el porcentaje de espermatozoides que presentaban cualquier tipo de movimiento (progresivo, circular, errático, rotatorio, movimiento del flagelo sin progresión, movimiento de la cabeza etc.)(%móviles).

2.2.3. Valoración de la vitalidad y la reacción acrosómica.

La vitalidad y la reacción acrosómica de los espermatozoides fueron estimadas usando una técnica simplificada de la triple tinción (*triple stain technique*, T.S.T.) descrita para el caprino por Kusunoki y col. (1984).

Esta técnica consistió en diluir una alícuota de la suspensión de los espermatozoides en un volumen igual del medio HEPES-TALP conteniendo 1% de Azul Tripán (Merck, 11732) e incubar a 37°C. Tras 15 minutos de incubación, se realizaron 2 extensiones en portaobjetos pre-calentados y se secaron al aire. Seguidamente, los portas fueron lavados con agua y una vez secados, las extensiones fueron fijadas con una solución al 3% de glutaraldehído (Merck, 1.04239.) tamponada con cacodilato sódico 0,1 M (SIGMA, C0250) con un pH de 7,4 a temperatura ambiente durante 30-45 minutos, lavadas en agua y secadas al aire. A continuación, las extensiones fueron teñidas con una solución del 0,5% de marrón Bismark (Fluka, 14990) en etanol al 30%, con un pH de 2,8 a 40°C durante 10 minutos, lavadas brevemente en agua y secadas al aire. Finalmente, las extensiones fueron teñidas en una solución al 0,8% de Rosa Bengala (Fluka, 11950) tamponada con 0,1 M de tampón Tris (Panreac, 141940) con un pH de 5,3 a 24°C durante 20 minutos, lavadas con agua y secadas al aire.

En este método, los acrosomas de los espermatozoides son teñidos con el Rosa Bengala para evaluar su estado acrosomal, mientras que para la distinción de los espermatozoides vivos de los muertos se usa el Azul Tripán. El marrón Bismark se utiliza en este método para teñir la región post-acrosómica evitando que el Rosa Bengala la tiña y así dar un mejor contraste para poder diferenciar los vivos de los muertos.

Después del proceso de tinción, los espermatozoides se observaron con un microscopio óptico de campo claro ($\times 1000$) contándose 200 espermatozoides por porta (400 espermatozoides/muestra). Los criterios de valoración en función de la vitalidad espermática y estado acrosomal permitieron la clasificación de los espermatozoides en las siguientes 4 categorías:

- 1) espermatozoides vivos con acrosoma normal (región post-acrosómica marrón claro con acrosoma rosa) (Figura 5a).
- 2) espermatozoides vivos sin acrosoma normal (región post-acrosómica marrón claro con región acrosomal no teñida o acrosoma dañado) (Figura 5b).
- 3) espermatozoides muertos con acrosoma normal (región post-acrosómica marrón oscuro con acrosoma rosa) (Figura 5c).
- 4) espermatozoides muertos sin acrosoma normal (región post-acrosómica marrón oscura con región acrosomal no teñida de rosa, teñida de azul-marrón oscuro o acrosoma dañado) (Figura 5d).

2.2.4. Validación de la T.S.T. simplificada con otras técnicas de valoración de la vitalidad y reacción acrosómica.

Simultáneamente a la toma de muestras de espermatozoides para determinar la viabilidad y la reacción acrosómica mediante la T.S.T simplificada, se tomaron 2 alícuotas de la misma suspensión de espermatozoides: una para determinar la vitalidad espermática mediante la tinción de Eosina-Nigrosina (Hancock, 1951) (Figura 6) y otra para valorar el porcentaje de células con acrosoma normal mediante el uso de la lectina PSA (pisum sativum agglutinin) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (Figura 7).

La tinción con Eosina-Nigrosina consistió en incubar una alícuota de la suspensión de espermatozoides con un volumen igual de la solución que contenía el colorante durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se extendió la muestra sobre dos portaobjetos pre-calentados, los cuales se dejaron secar al aire. Posteriormente, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos), contando 200 células/porta en un microscopio óptico de campo claro (x1000). La solución del colorante contenía un 1,67% de eosina Y (Panreac, 251299), un 10% de nigrosina (Merck, 15924) y un 3% de citrato sódico (BDH, 30128).

Para realizar la técnica de la lectina FITC-PSA, se realizaron 2 extensiones de la suspensión de espermatozoides sobre portaobjetos pre-calentados y se dejaron secar al aire. A continuación se fijaron las extensiones en etanol (99%) durante una hora. Una vez secadas al aire, se depositó y extendió sobre cada portaobjetos un volumen de 100 µl de la solución de FITC-PSA (100 µg/ml) (SIGMA, L-0770) y se incubó durante 20 minutos en la oscuridad. Tras la incubación, las extensiones se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se montaron los cubreobjetos con una solución al 90% de glicerol en PBS. Para determinar el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, se observaron en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 450-480 nm (x1000), contándose 200 espermatozoides por porta (400 espermatozoides/muestra).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos expresados en porcentaje o fracción fueron sujetos a la transformación de la raíz cuadrada del arcoseno y analizados mediante análisis de la varianza a dos vías (tratamiento y réplica), utilizando el Modelo Lineal General (GLM) del programa estadístico SAS (SAS Institute, 1990).

La significación estadística se fijó en un valor de probabilidad máximo del 0.05% para todos los parámetros. Cuando se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento, se realizó la comparación de las medias por el método LSD (Steel y Torrie, 1985), utilizando el mismo programa estadístico.

Los cifras referentes a los datos de los distintos parámetros seminales fueron expresadas como LSMeans (Least Square Means) ± error estándar de la LSMeans, mientras que las cifras referentes a los resultados de fecundación y división de los ovocitos fueron expresadas como porcentaje o frecuencia.

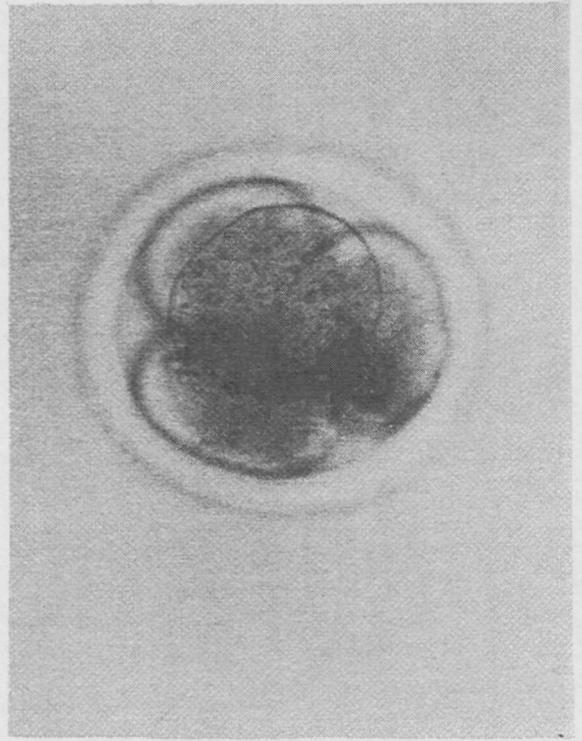
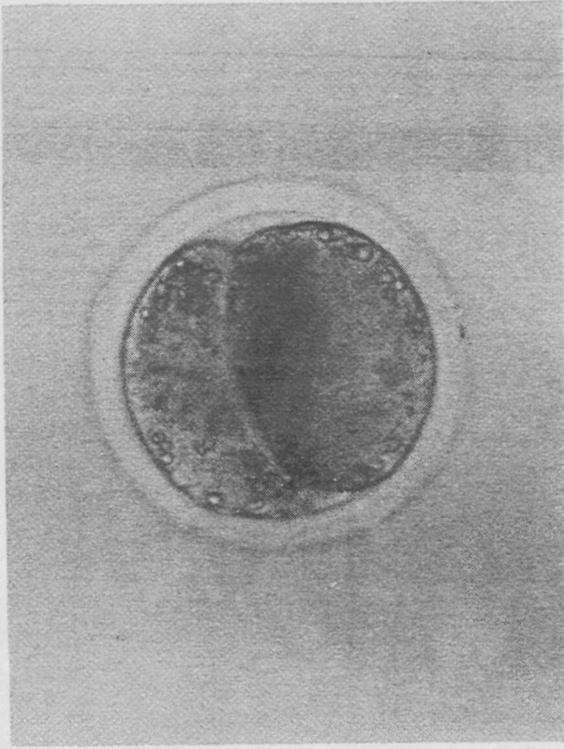


Figura 1a: Embrión de 2 células de cabra prepúber
Figura 1b: Embrión de 4 células de cabra prepúber

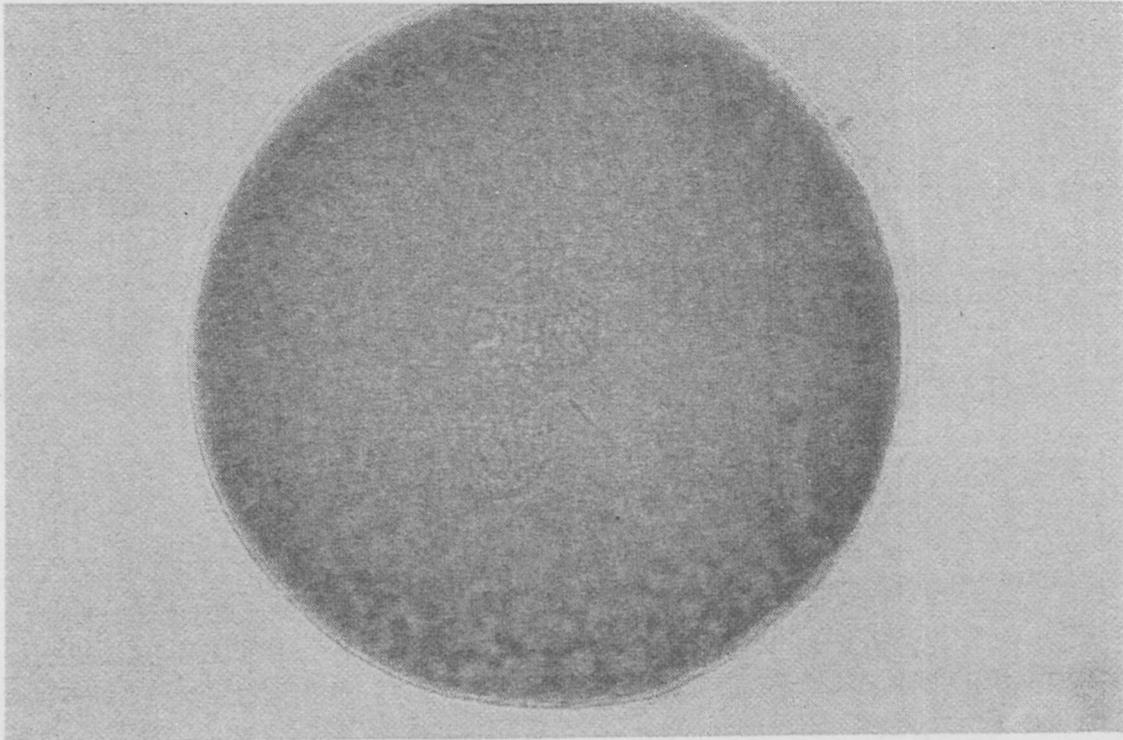


Figura 2: cigoto normalmente fecundado 17 horas post-inseminación. se pueden observar 2 pronúcleos totalmente formados y restos de la cola del espermatozoide

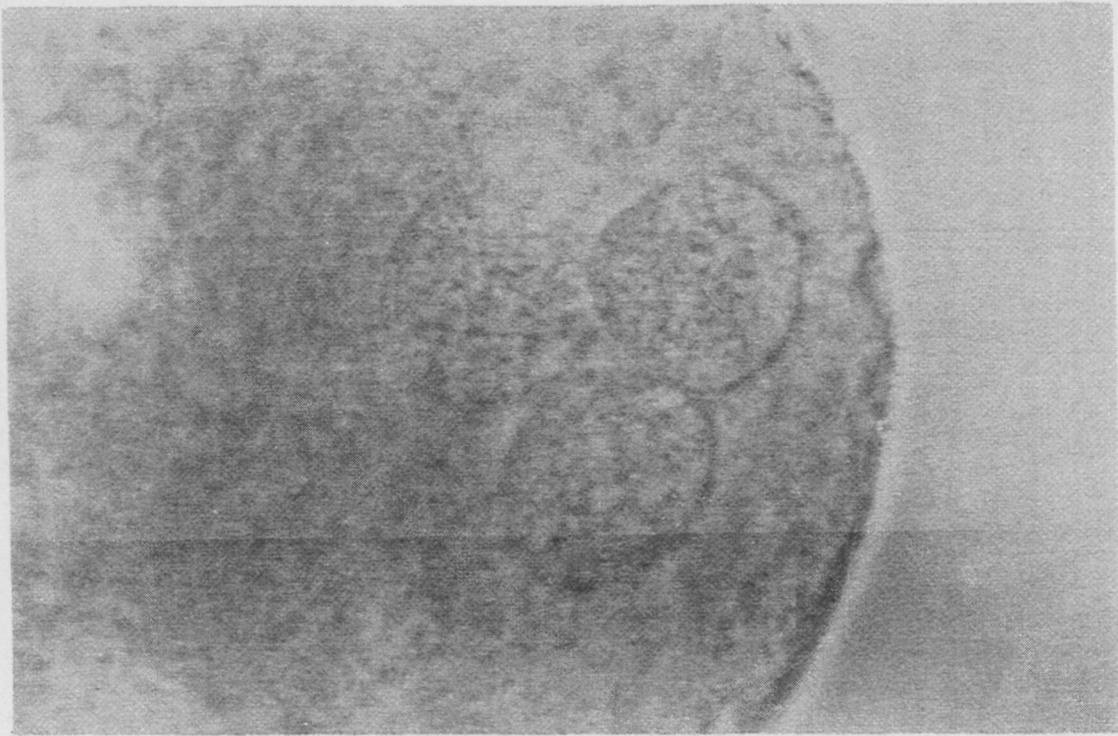


Figura 3: cigoto poliespérmico. Se observan 3 pronúcleos y una cola de espermatozoide. La segunda cola se encuentra en otro plano

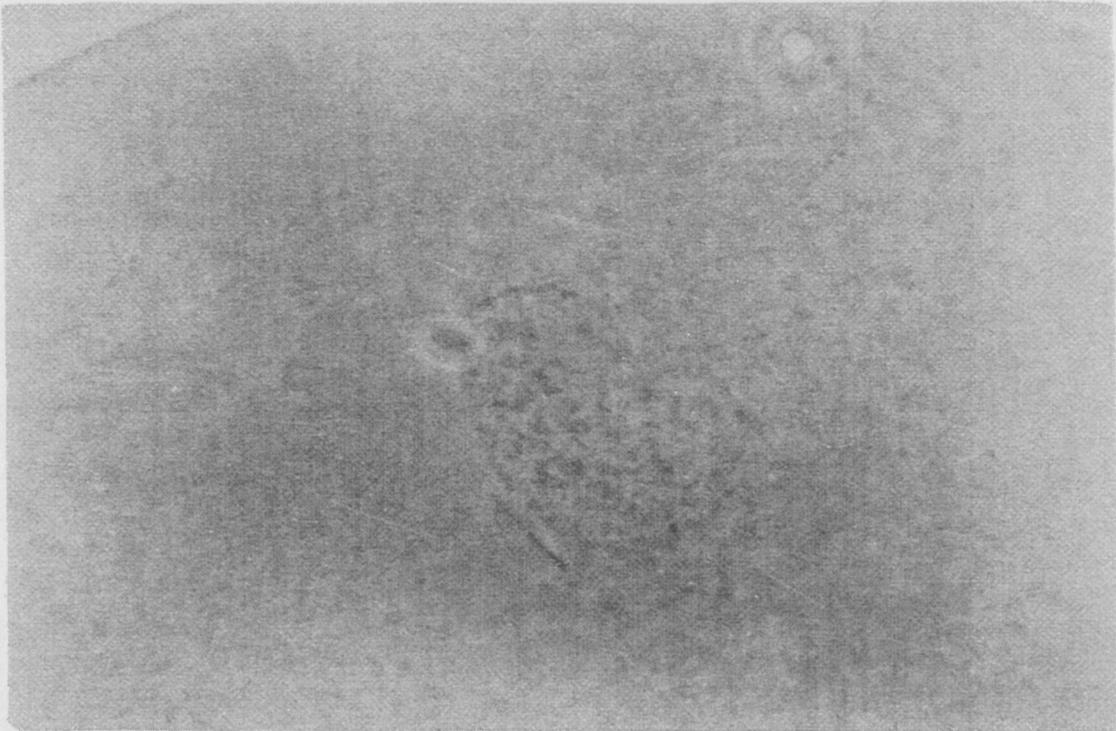


Figura 4: cigoto anormalmente fecundado. Se observa el pronúcleo femenino totalmente descondensado junto con una cabeza de espermatozoide no descondensada y la cola correspondiente.

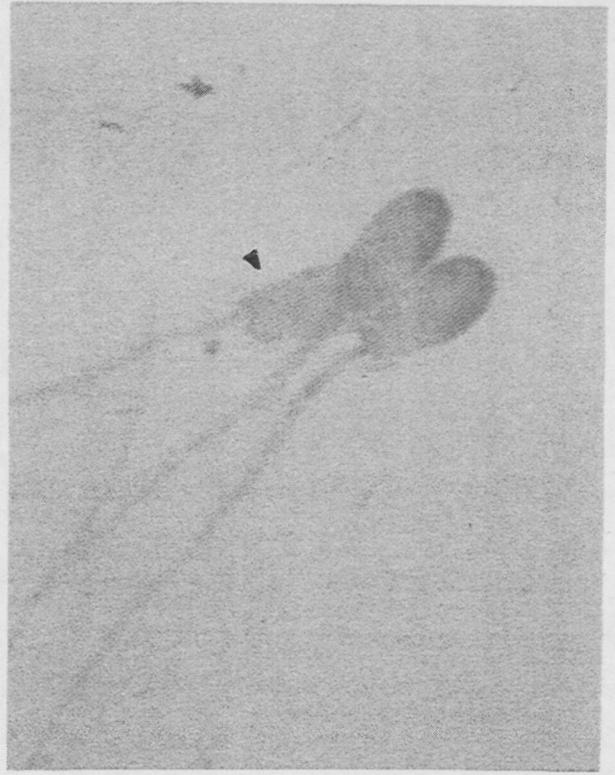


Figura 5a: espermatozoide vivo con acrosoma **Figura 5b:** espermatozoide vivo sin acrosoma

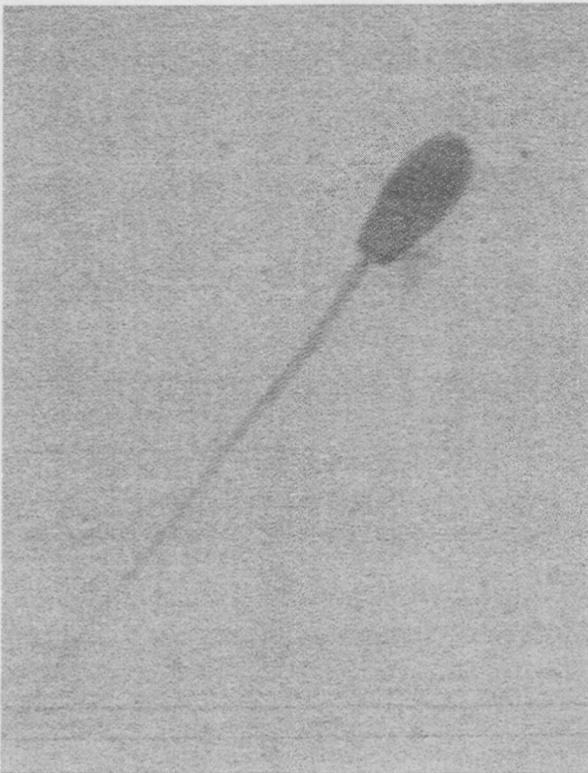


Figura 5c: espermatozoide muerto con acrosoma

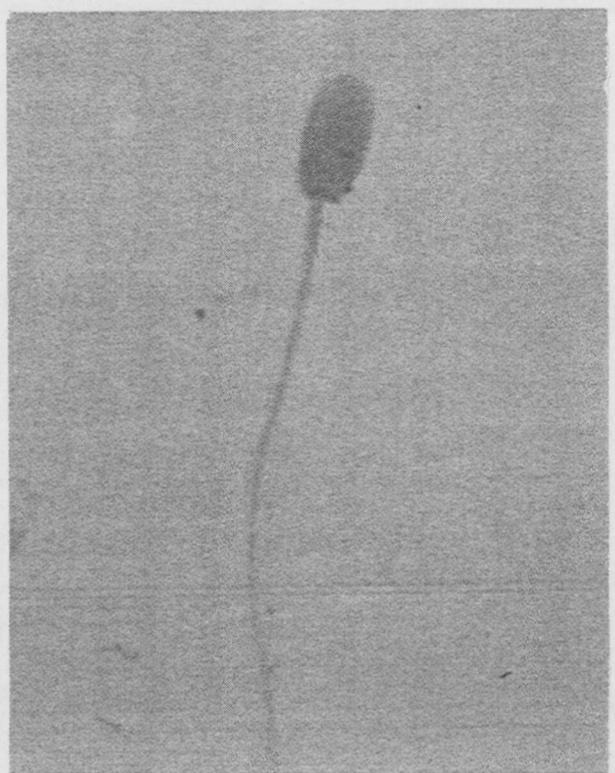


Figura 5d: espermatozoide muerto sin acrosoma

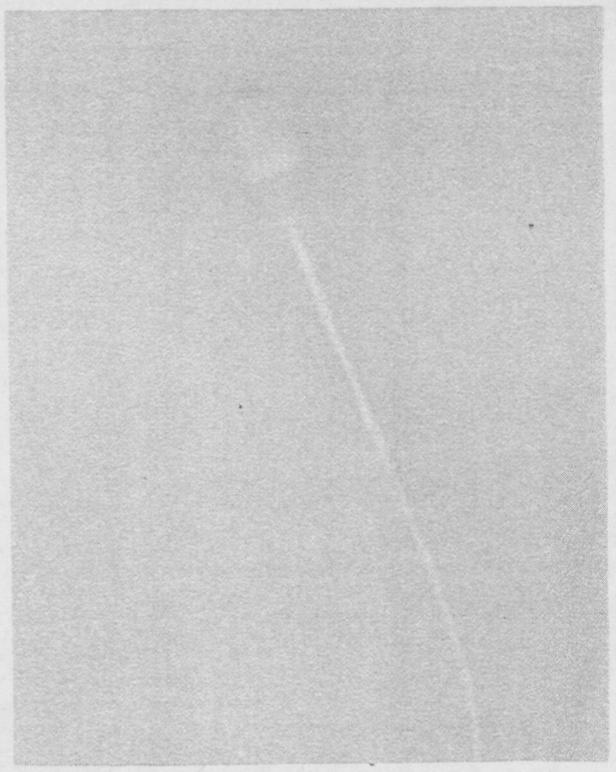
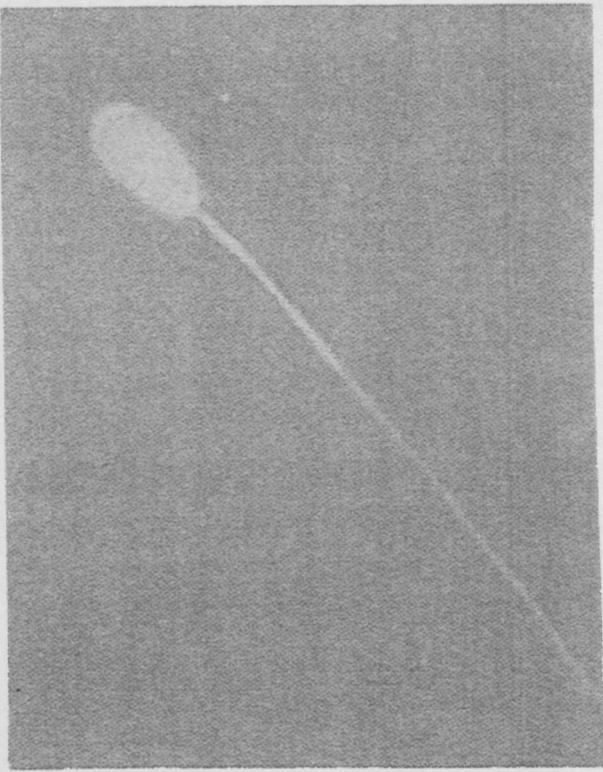


Figura 6: determinación de la vitalidad espermática mediante la tinción de Eosina-Nigrosina.
(a) vivo; (b) muerto



Figura 7: determinación de la integridad del acrosoma mediante la técnica PSA-FITC.
(a) con acrosoma; (b) sin acrosoma