



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

**ESTUDIO DE LA  $\beta$ -CICLODEXTRINA COMO  
INDUCTOR DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN  
CONEJOS**

**TESIS FINAL DE MÁSTER**

**Ana María Echeverry Ospina**

**DIRECTOR: José Vicente Salvador Antón**

**Valencia, diciembre de 2008**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Parámetros de motilidad evaluados por el método CASA (Quintero y col, 2003).	<b>8</b>
<b>TABLA 2.</b> Valores medios de concentración, porcentaje de motilidad y formas anormales del semen fresco.	<b>11</b>
<b>TABLA 3.</b> Parámetros CASA para los 4 tratamientos a las 2 y 20 horas.	<b>13</b>
<b>TABLA 4.</b> Inducción de la reacción acrosómica entre tratamientos.	<b>14</b>
<b>TABLA 5.</b> Análisis por clusters (VARCLUS), para los parámetros de motilidad proporcionados por el CASA.	<b>15</b>
<b>TABLA 6.</b> Medios de los parámetros con mayor información en las 4 subpoblaciones.	<b>17</b>
<b>TABLA 7.</b> Porcentaje de espermatozoides capacitados dentro de las 4 subpoblaciones.	<b>17</b>
<b>TABLA 8.</b> Capacidad fecundante de los espermatozoides tratados con $\beta$ -ciclodextrinas.	<b>19</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Cámara de Neubauer.	<b>7</b>
<b>FIGURA 2.</b> Adhesión de los espermatozoides al óvulo.	<b>19</b>
<b>FIGURA 3.</b> Embrión en estadio de 2-células.	<b>19</b>
<b>FIGURA 4.</b> Mórula temprana 60h post-cultivo	<b>19</b>

## RESUMEN

El objetivo general de este trabajo es valorar la utilización de las  $\beta$ -ciclodextrinas como agente capacitante en espermatozoides de conejo. Para ello se trataron los espermatozoides en 4 tratamientos: 1. TALP, 2. TALP + dextrina, 3. TALP + dextrina centrifugado y 4. TALP centrifugado añadiendo ionóforo de calcio (A23187) para inducir la reacción acrosómica a 2 y 20 horas. Una vez realizadas las pruebas se utilizaron los espermatozoides tratados con  $\beta$ -ciclodextrinas-centrifugados por su parámetros cinéticos (VCL y ALH), así como por disponer de una subpoblación de espermatozoides en vías de capacitación (11, 75%, VAP y ALH elevados, y STR baja) y por su elevada respuesta a la reacción acrosómica con ionóforo de calcio (56%) para probar la capacidad fecundante de estos con óvulos maduros. Desgraciadamente, tras la fecundación in vitro se demostró que las alteraciones causadas por este tratamiento no conducen a un proceso de capacitación adecuado, probablemente los espermatozoides son capacitados prematuramente lo cual no permite una adecuada adhesión a la zona pelúcida por tanto solo unos pocos llegaron a activar el óvulo, desarrollándose un 16% a 2 células y tan sólo un 8,7% a mórula temprana frente a un tratamiento convencional con el que se obtuvo 51% y un 45% respectivamente. Por lo tanto las condiciones evaluadas en este trabajo para el uso  $\beta$ -ciclodextrinas, éstas no pueden ser consideradas como agente capacitante eficaz.

## 1. INTRODUCCIÓN

Tras la eyaculación los espermatozoides la mayor parte de los espermatozoides de mamífero no son capaces de fecundar un ovocito. Es necesario que sufran toda una serie de cambios que le permitan alcanzar el ovocito y penetrarlo. Éste proceso se conoce como capacitación, *in vivo* tiene lugar en el tracto reproductivo de la hembra, en el útero o en las trompas de Falopio (Austin, 1951 y Chang, 1951). En el proceso de capacitación se activan y suceden una serie de mecanismos que conllevan la modificación de la fisiología celular del espermatozoide, así la pérdida de colesterol de la membrana espermática y el flujo de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{HCO}_3$  provocan el reordenamiento de los lípidos de membrana y la activación de las fosfolipasas C, PLA2 y PLC $\gamma$ 1 que desencadenarán un proceso típico de modificación de la actividad enzimática de las quinasas de proteína A, responsables de la fosforilación de proteínas y la pérdida de los factores decapacitantes provenientes de las secreciones epididimarias y del plasma seminal (Breitbart y Naor, 1999; Guraya, 2000, Visconti y col., 2002).

La capacitación involucra, además, modificaciones estructurales como la polimerización de la actina (Leclerc y col., 1998), la modificación y fusión de las membranas acrosomales externa e interna, desencadenando así el inicio de la reacción acrosomal esencial para la penetración del ovocito (Töpfer-Petersen y col., 2000). Así como modificaciones a nivel del flagelo que se caracterizan por cambios en su patrón de movimiento, proceso conocido como “hiperactivación espermática” (Katz y col., 1986; Yanagimachi, 1994; Ho y Suárez, 2001). Los movimientos de los espermatozoides son más rápidos, menos progresivos y con un mayor desplazamiento lateral de la cabeza que favorecerán su desplazamiento y unión al los receptores de la zona pelúcida del ovocito (Talbot y col., 1985; Katz y col., 1987; Yanagimachi, 1994; Bedford, 1998). Cabe señalar que los espermatozoides no capacitados no logran atravesar el cúmulo quedando atrapados en su superficie, hecho que algunos autores, como Florman y First (1988) proponen como un mecanismo más de selección de gametos.

La reacción acrosomal es un proceso excitotónico inducido fisiológicamente por la interacción del espermatozoide con una proteína específica de la zona pelúcida (ZP3) (Langlais y Roberts, 1985; Rodeheffer y Sur, 2004). Tras la unión a la proteína ZP3 a

los receptores de membrana acrosomal se produce la liberación de las enzimas acrosomales y la exposición de moléculas presentes en la membrana acrosomal interna que serán fundamentales tras la penetración de la zona pelúcida para la fusión del espermatozoide con el oolema. (Yanagimachi, 1988; Cross y Meizel, 1989; Allen y Green, 1997; Hammadeh y col, 1999; Rossatti y col, 2004).

No se conocen las condiciones o factores que desencadenan y controlan directamente la capacitación del espermatozoide en el tracto genital femenino. Pero si se sabe que hay ciertas enzimas tales como  $\beta$ - glucoronidasa, proteasas y neuroaminidasas, arisulfatasa, fucosidasa y acetilhexosaminadosa, anhidrasa carbónica y otras sustancias como esteroides sulfato, glicosaminoglicanos, catecolaminas, taurina e hipotaurina, implicadas en la misma (Quintero, 2003).

Los sistemas de capacitación *in vitro* tienen como objetivo simular la secuencia de fenómenos que normalmente ocurren en el tracto reproductivo de la hembra. Los espermatozoides pueden ser capacitados mediante diferentes formas de manipulación, implicando distintos tipos de medios o sustancias. Yanagimachi y Chang (1963) fueron los primeros en conseguir la capacitación de espermatozoides maduros *in vitro* en un medio específico de capacitación. Este experimento fue realizado en espermatozoides de epidídimo de hámster, el cual fue incubado *in vitro* en presencia de fluido folicular en solución Tyrode's durante 3 horas o más, los cuales se capacitaban completamente. Donde la mayoría de los capacitados mostraban reacción acrosómica y una fuerte motilidad, que se veía reflejada a la hora de ponerlos en contacto con los ovocitos, ya que el espermatozoide empezaba a penetrar la zona pelúcida.

Actualmente es habitual utilizar para la capacitación *in vitro* medios como el Krebs-Ringer bicarbonato modificado (Toyoda y Chang, 1974), el DM (Brackett y Oliphant, 1975) y el medio Tyrode modificado (Fleming y Yanagimachi, 1982), así como otras soluciones modificadas de los mismos como el medio Tyrode-albumina-lactato-piruvato o TALP (Bavister y Yanagimachi, 1977) o el DM-Hepes (Crozet y col., 1987). Los medios citados anteriormente suelen ser suplementados con agentes capacitantes como el BSA, fluido folicular, ionóforos de calcio, liposomas de fosfatidilcolina, glucosaminoglucanos,  $\beta$ -aminoácidos y catecolaminas, entre otros. A continuación se describen brevemente algunos de ellos y el posible mecanismo que lleva a desencadenar el proceso de capacitación.

La **presencia del cúmulo** alrededor de los óvulos maduros no es esencial para la fecundación *in vitro* (FIV) pero puede facilitar la fecundación ya que algunos componentes del cúmulo pueden promover la reacción acrosómica de los espermatozoides, pudiendo subsanar las deficiencias de los sistemas de capacitación. Se ha observado que la progesterona encontrada en las células del cúmulo colabora para que se lleve a cabo la capacitación y reacción acrosómica.

**Medio Tiroide libre de calcio** : es una solución salina con cloruro sódico y potásico, sulfato de magnesio y bicarbonato sódico (pH: 7,6). La osmolaridad y el pH permiten las modificaciones de membrana que favorecen la entrada de calcio.

**BSA**: la presencia de BSA es eficaz en la mejora de la tasa de fecundación en diversas especies: ratones, marmotas y vacuno. La BSA podía jugar un papel clave en la eliminación del colesterol y zinc de los espermatozoides. La BSA es incluida de forma rutinaria en los medios de cultivo utilizados para la FIV.

**Fluido folicular y oviductal**: el fluido folicular (FF) de varias especies de mamíferos puede inducirla debido a la presencia de glucoaminoglucanos, y albúmina.

**Heparina y otros glucosaminoglucanos (GAG)**: se ha identificado varios GAG en el tracto genital femenino, siendo considerados como efectivos inductores de la capacitación. La concentración de GAG en el tracto reproductor femenino decrece desde el cérvix hacia las regiones anteriores, observándose cambios en la concentración y composición de estos durante el ciclo estral de la hembra. La heparina es el GAG más potente a la hora de inducir la capacitación en espermatozoides bovinos. En bovino, la heparina se une a la membrana mediante una unión del tipo ligando-receptor probablemente mediante proteínas de unión de la membrana procedentes del plasma seminal, reduciendo la actividad de la calcio-ATPasa y permitiendo la entrada de calcio extracelular.

Finalizado el proceso de capacitación *in vitro* es posible desencadenar la reacción acrosómica mediante:

**Ionóforo de calcio (A23187)**: el ionóforo incrementa directamente el contenido del calcio intracelular del espermatozoide e induce la reacción acrosómica.

**Liposomas de fosfatidilcolina**: se ha demostrado que las cadenas de ácidos grasos de 10 (PC10) o 12 carbonos (PC12) son efectivos inductores de la reacción acrosómica de espermatozoides bovinos.

**Aminoácidos y catecolaminas:** taurina, hipotaurina, penicilamina y epinefrina. Es habitual en muchos protocolos la incubación en presencia de hipotaurina y epinefrina lo que produce una estimulación de la movilidad de los espermatozoides e induce la reacción acrosómica.

De los métodos que se han puesto a punto hasta el momento para poder valorar el estado de capacitación de los espermatozoides, tanto el patrón de motilidad como la inducción de la reacción acrosómica son utilizados como indicadores. Por un lado el análisis de la motilidad sería útil para detectar cambios en el patrón de movimiento de los espermatozoides y por otro lado la detección de la reacción acrosómica supone que el proceso de la capacitación ha sido completado.

Los resultados demuestran la presencia específica y definida de subpoblaciones en eyaculados de conejo los cuales pueden ser fácilmente definidos por sus características de motilidad, ayudados por el análisis por clusters, el cual ha servido para encontrar subpoblaciones en eyaculados en diferentes especies como en el hombre (Davis y col., 1995), el caballo (Quintero y col., 2003) y jabalíes (Abaigar y col., 1999; Quintero y col., 2004). Recientes estudios en conejos (Quintero y col., 2006), confirman que las subpoblaciones espermáticas difieren unas de otras, en su patrón de movimiento y quizás en su fisiología. En el presente estudio se identificaron 4 subpoblaciones, las cuales mostraban el mismo patrón una con espermatozoides más capacitados (subpoblación 1) y los no capacitados (subpoblación 4). Esto es debido a que el porcentaje de espermatozoides incluidos en los subgrupos, cambia siguiendo unos patrones fijos cuando los eyaculados son sometidos a procesos como congelación/descongelación, capacitación *in vitro* o incubación con sustancias como caféina o el bicarbonato (Holt, 1996; Abaigar y col., 1999).

No obstante, el porcentaje de espermatozoides reaccionados en una población de espermatozoides capacitados podría no correlacionarse con su potencial de fecundación. Reyes (1992) y Romar (2001) han observado que tan sólo cuando se alcanza la máxima respuesta a la inducción de la reacción acrosómica es posible correlacionarlo con su potencial de fecundación. Ya que una reacción acrosómica prematura conduciría a la pérdida de los factores de adhesión espermática a los receptores, comprometiendo así la unión entre el espermatozoide y el ovocito.



Trabajos recientes, (Guneet Makkar y col., 2003 y Cortés, 2003) demuestran la importancia del test A.R.I.C (Acrosome reaction following ionophore challenge) o diferencia entre el porcentaje de espermatozoides que sufren reacción acrosómica espontánea e inducida en la predicción de fertilización. Cuando esta diferencia es menor del 10% la probabilidad de fertilización es prácticamente cero.

Habitualmente, la capacitación *in vitro* de los espermatozoides de conejo se realiza mediante una incubación de los espermatozoides en medios de cultivo como el DEM, Ham's F-10 en torno a 37,5°C. En general la máxima capacidad fecundante *in vitro* es obtenida tras 16-20 horas de incubación, alcanzando niveles de reacción acrosómica del 20% y de fecundidad del 80% sobre óvulos maduros. Agentes capacitantes como la heparina, BSA o catecolaminas no parecen ser desencadenantes efectivos del proceso de capacitación en conejo (García, 2001).

En los últimos años varios grupos de investigación han demostrado que las ciclodextrinas modificar (sustraer o añadir) colesterol a las membranas celulares y concretamente a los espermatozoides (Christian y col., 1997, Moore y col., 2005). La adición de la  $\beta$ - ciclodextrina ayuda a la mejora de la motilidad y viabilidad en los espermatozoides congelados en caballos (Combes y colaboradores, 2000), en cerdos (Zeng y Terada, 2001a; 2001b), en toros (Purdy y Graham, 2004) y en moruecos (Morrier y col., 2004; Mocé y Graham, 2006).

## **2. OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es valorar la utilización de las  $\beta$ -ciclodextrinas como agente capacitante en espermatozoides de conejo.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los productos químicos utilizados para la elaboración del medio fueron de grado reactivo procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

### **3.1. Diluyente de semen y medios de inducción de la capacitación.**

Para la realización de los medios se utilizó agua ultrapura, como medio de dilución. Y se midió el pH y la osmolaridad de los mismos (pH 6,8 y 300 mOsm/kg).

Diluyente de semen:

Tris-citric-acid-glucose: 0,25 M de Tris[hydroxymethyl]aminomethane, 88 mM de ácido cítrico y 47 mM de D (+) glucosa (Viudes-de-Castro y col., 1999).

TALP: solución salina de Tiroides con 25mM de bicarbonato sódico.

TALP-dextrinas: solución de 0,228mg  $\beta$  - ciclodextrinas en 25 ml de TALP.

### **3.2. Recuperación del semen**

El semen se recuperó mediante vagina artificial de 5 machos adultos de la línea A (New Zealand White, seleccionada desde 1980 por tamaño de camada al destete en base a un índice familiar, Estany col., 1989), entrenados y alojados en la granja experimental del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). La frecuencia de recuperación durante el periodo experimental fue un eyaculado por día, dos días a la semana. Los eyaculados de los 5 machos fueron mezclados en cada una de las sesiones de trabajo y distribuida la mezcla entre los diferentes grupos experimentales.

### **3.3. Evaluación del semen**

Tras la recuperación del semen, se hizo un pool con todos los eyaculados, se eliminó el tapón mucoso y se procedió a su evaluación:

**3.3.1. Concentración:** se tomó una alícuota del pool y se fijó (dilución 1:50) con glutaraldehído al 0.25 % (en solución tamponada de fosfato Dulbecco's; DPBS), (Pursel and Jonson, 1974) y se procedió al conteo de espermatozoides en una cámara de Neubauer (Figura 1).

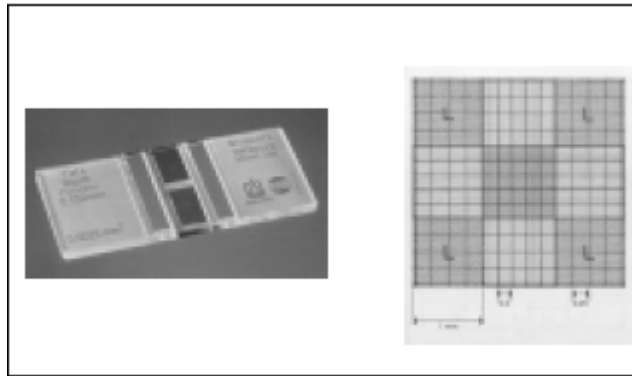


Figura 1. Cámara de Neubauer

- 3.3.2. Porcentaje de formas anormales:** de la dilución con glutaraldehído para contar concentración, se ponen 10  $\mu$ l en un portaobjetos con su cubre y se cuentan 100 espermatozoides a 400x en un microscopio óptico de contraste de fases. Contando los espermatozoides normales, con cola en látigo, con gota citoplasmática proximal y gota citoplasmática distal.
- 3.3.3. Estado del acrosoma:** se evaluó mediante un microscopio óptico de contraste de fases (400x), partiendo de la dilución con glutaraldehído utilizada para evaluar la concentración. Y sobre un mínimo de 100 espermatozoides se evaluó cuáles tenían el acrosoma dañado y cuáles no.
- 3.3.4. Movilidad:** se evaluó mediante un sistema CASA (VIMAS, Microptic®, Barcelona). Para ello una alícuota de semen diluido fue depositada en una cámara Makler atemperada a (37- 38°C). Y en el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALHMed, ALHMax, DNC, DNM, AI, AV, MADAbs, MADAlg, BCF, HLO, HHI y HME (Tabla 1).

PARÁMETRO	Unidad	DEFINICIÓN
Velocidad curvilínea (VCL)	µm/sg	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea (VSL)	µm/sg	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria.
Velocidad media (VAP)	µm/sg	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y VAP.
Índice de oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y VCL.
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMed)	µm	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMax)	µm	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Dance (DNC)	µm	Producto de la VCL por la ALHMed.
Dance medio (DNM)	µm	Cociente entre ALHMed y LIN.
Índice de angularidad (AI)	%	Valor porcentual del ángulo que forma un segmento de la trayectoria con la siguiente.
Velocidad angular media (AV)	(µm/sg)	Es el resultado de (VCL x AI)/100.
Desplazamiento angular medio absoluto (MADAbs)	Grados angulares	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente en valor absoluto.
Desplazamiento angular medio algebraico (MADAIg)	Grados angulares	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente, teniendo en cuenta su signo, siendo positivo al sentido contrario de las agujas del reloj.
Frecuencia de batida de la cabeza (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.
Menor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HLO)	µm	Menor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media.
Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HHI)	µm	Mayor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media.
Oscilación media de la cabeza del espermatozoide (HME)	µm	Valor medio de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media.
Máxima amplitud de la oscilación de la cabeza espermática (HMX)	µm	Distancia máxima en función del tiempo empleado entre 2 cruces sucesivos.
Armónico básico de la oscilación de la cabeza espermática (HBS)	µm	Distancia media en función del tiempo empleado entre 2 cruces sucesivos.
Amplitud del armónico (H_Y)	µm	Distancia mínima en función del tiempo empleado entre 2 cruces sucesivos.

Tabla 1. Parámetros de motilidad evaluados por el método CASA (Quintero y col., 2003).

#### 3.4. Inducción de la reacción acrosómica con ionóforo (A23187):

La inducción de la reacción acrosomal se realizó con 10 µl de ionóforo de calcio A23187 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), que se le agregaban a 100 µl de muestra a tiempo cero y a las 2 horas de incubación a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. En los diferentes tratamientos. El porcentaje de espermatozoides reaccionados por muestra se calculó

restando el porcentaje de espermatozoides reaccionados de la muestra control a tiempo 0.

### **3.5. Fecundación *in vitro***

**3.5.1. Recuperación de los ovocitos:** los ovocitos fueron recuperados de conejas *post-mortem* mediante lavado oviductal, a las 14 horas de la inducción de la ovulación con 1µg de acetato de buserilina (Viudes de Castro y col., 2005; Zhao y col., 2006). Brevemente, los oviductos fueron perfundidos con 5 ml de DPBS sin cloruro cálcico y BSA (1g/L). Una vez recuperados los ovocitos fueron lavados tres veces en DPBS+BSA y puestos finalmente en el medio TALP-modificado (TALP-FIV) para su co-incubación con los espermatozoides de los diferentes procedimientos. El TALP-FIV es una solución salina de Tirodes con bicarbonato sódico (25mM), BSA (0,6%), lactato sódico (0,3% v/v) y piruvato sódico (34mg/L).

**3.5.2. Co-incubación ovocitos y espermatozoides:** los ovocitos fueron co-incubados en TALP-modificado con las diferentes muestras de espermatozoides según el tratamiento durante 4 horas a 37,5°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> saturada de humedad. Tras la co-incubación, los posibles cigotos fueron lavados dos veces con Ham's-F10 y cultivados en el mismo medio suplementado con un 20% de FBS (suero fetal de bovino) durante 60 horas en las mismas condiciones de la co-incubación. Se realizaron 5 repeticiones de cada uno de los grupos evaluados.

Finalmente se evaluó el número de ovocitos fecundados, según el porcentaje de estos en estadio de 2 células a las 24 horas y en estadio de mórula temprana a las 60 horas del inicio de cultivo.

### **3.6. Diseño experimental**

#### **3.6.1. Experimento 1: Efecto del medio de capacitación sobre la motilidad espermática**

En este experimento se tomaron 5 alícuotas del pool de eyaculados de 5 machos (100 µl), que fueron procesadas de la siguiente forma:

Tratamiento 5: dilución del semen 1:4 (v:v) con medio TRIS-cítrico-glucosa con BSA (TRIS-BSA) . Grupo control.

Tratamiento 1: dilución del semen 1:4 (v:v) con medio TALP

Tratamiento 2: dilución del semen 1:4 (v:v) con medio TALP +  $\beta$ -ciclodextrinas (TALP-DEXTRINA).

Tratamiento 3: dilución del semen 1:1 (v:v) con medio TALP y centrifugación de la muestra, eliminación del sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400  $\mu$ l de TALP+  $\beta$ -ciclodextrinas.

Tratamiento 4: dilución del semen 1:1 (v:v) con medio TALP y centrifugación de la muestra, eliminación del sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400  $\mu$ l de TALP.

### **3.6.2. Experimento 2: Efecto del medio de capacitación tras incubación a 2 y 20 horas con inducción de reacción acrosómica con Ionóforo**

Una vez preparadas las muestras se dejaron incubarse a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 2 y 20 horas. Transcurridos los cuales se evaluaron parámetros de motilidad mediante un sistema CASA, normalidad acrosómica y tasa de capacitación mediante la inducción de la reacción acrosómica con ionóforo.

### **3.6.3. Experimento 3: Efecto del medio de capacitación sobre el potencial de fertilización *in vitro***

Los espermatozoides del medio tratado con  $\beta$ -ciclodextrinas durante dos horas que habían demostrado una elevada sensibilidad a la inducción de la reacción acrosomal con ionóforo, espermatozoides cultivados durante 20 horas en Ham's F-10 + BSA (4g/L) y espermatozoides no tratados fueron co-incubados con óvulos maduros para establecer su potencial de fecundación. La eficacia del proceso de capacitación-fecundación fue valorada a las 24 y 60h, registrando el número embriones desarrollados hasta el estadio de 2 células y mórula temprana respectivamente.

## **3.7. Análisis Estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza para evaluar el efecto del tratamiento y el tiempo de incubación sobre los parámetros de motilidad y sobre la inducción de la reacción

acrosómica con Ionóforo A 23187. El análisis se realizó con el paquete estadístico SAS con el procedimiento PROC GLM (SAS, 1996).

El **estudio de las subpoblaciones** espermática en los grupos de tratamientos, los datos fueron procesados por el paquete estadístico SAS según el procedimiento descrito por Quintero y col. (2007). El primer paso se realizó por medio del procedimiento VARCLUS para seleccionar los parámetros espermáticos a utilizar de los que son obtenidos en el análisis de imagen del sistema CASA (Vimas 5.1). Siguiendo los resultados del VARCLUS (Tabla 3), se eligió el parámetro dentro del cluster que conserva la máxima información del total de los parámetros. Para ello, se analizaron los valores del  $R^2$  del propio cluster y del  $R^2$  del cluster más cercano. Una vez seleccionadas los parámetros seminales, el procedimiento FASTCLUST fue utilizado para distribuir los espermatozoides de forma individual a cada una de las subpoblaciones. La distribución de los espermatozoides entre los tratamientos fue analizada mediante Chi-cuadrado.

Por último, la capacidad fecundante de los espermatozoides para producir embriones a 24h y 60 horas fue evaluada mediante un test de chi-cuadrado con corrección de Yates.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El semen fresco utilizado para los experimentos presentaba los siguientes parámetros medios de calidad espermática para concentración, porcentaje de mótils totales y formas anormales. (Tabla 2).

	<b>Media <math>\pm</math> SE</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
<b>Concentración (x 10<sup>6</sup>/mL)</b>	181.7 $\pm$ 16.92	145.61 – 217.76
<b>Mótils totales (%)</b>	70.0 $\pm$ 4.10	61.31 – 78.79
<b>Formas anormales (%)</b>	17.4 $\pm$ 1.17	14.88 – 19.87

Tabla 2: Valores medios de concentración, porcentaje de motilidad y de formas anormales del semen fresco.

#### ***4.1. Experimento 1: Efecto del medio de capacitación sobre la motilidad espermática.***

En el análisis de parámetros del CASA para los cuatro tratamientos (Tabla 3), se observa que no hay diferencia significativa entre tratamientos para un tiempo de incubación de dos horas en cuanto al porcentaje de móviles totales. Pero se puede observar que el tratamiento 3 presenta valores elevados de los parámetros de velocidad (VAPt, VCLt y VSLt) y de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) acorde con lo esperado de espermatozoides capacitados que han desencadenado un proceso de hiperactividad. La incubación durante 20 horas desencadenó que ningún espermatozoide de los medios 3 y 4 sobreviviese, por lo que sólo se analizaron los resultados del grupo 1 y 2 a 20 horas (Tabla 3). Tanto el tratamiento 1 como el 2 presentan valores similares para los parámetros de motilidad para dos horas de incubación. Pero tras 20 horas de incubación, el tratamiento 2 presenta un mayor porcentaje de móviles totales que el tratamiento 1 (49.70 % vs. 18.69 %;  $P < 0.05$ ). Tan sólo se observó un ligero incremento en la velocidad curvilínea y en el desplazamiento lateral de la cabeza (VCL y ALH) para el tratamiento 3 (TALP- $\beta$ -ciclodextrinas-centrifugado) pero no suficiente para interpretar que tras dos horas de incubación se había desencadenado la hiperactivación de los espermatozoides. En general, no se observaron diferencias relevantes entre tratamientos para los parámetros cinéticos de motilidad aunque el tratamiento 4 (TALP-centrifugado) es el que peores parámetros cinéticos presentó (Tabla 3). En general, se observa una pérdida de movilidad y velocidad en los espermatozoides tras ser incubados 20 horas.



Tratamientos	Tiempo = 2 Horas				Tiempo = 20 horas	
	1	2	3	4	1	2
<b>Móviles totales (%)</b>	62.07 ± 4.45	61.73 ± 4.70	67.13 ± 5.32	53.98 ± 5.32	18.69 ± 5.67 <sup>a</sup>	49.70 ± 6.21 <sup>b</sup>
<b>VAPt (µm/s)</b>	29.19 ± 2.68 <sup>ab</sup>	32.99 ± 2.83 <sup>ab</sup>	36.82 ± 3.21 <sup>a</sup>	25.19 ± 3.21 <sup>b</sup>	11.16 ± 2.80	7.35 ± 3.07
<b>VCLt (µm/s)</b>	53.36 ± 4.49 <sup>b</sup>	56.44 ± 4.73 <sup>ab</sup>	<b>70.23 ± 5.37<sup>a</sup></b>	49.18 ± 5.37 <sup>b</sup>	24.84 ± 6.42	16.29 ± 7.04
<b>LIN (%)</b>	44.35 ± 2.17 <sup>a</sup>	44.67 ± 2.28 <sup>a</sup>	38.46 ± 2.59 <sup>ab</sup>	33.91 ± 2.59 <sup>b</sup>	31.17 ± 2.85	34.89 ± 3.12
<b>VSLt (µm/s)</b>	22.64 ± 2.29 <sup>ab</sup>	25.98 ± 2.42 <sup>a</sup>	27.37 ± 2.74 <sup>a</sup>	18.44 ± 2.74 <sup>b</sup>	7.48 ± 2.32	4.10 ± 2.54
<b>STRt (%)</b>	67.82 ± 2.43 <sup>a</sup>	67.43 ± 2.56 <sup>a</sup>	63.96 ± 2.90 <sup>ab</sup>	55.94 ± 2.90 <sup>b</sup>	49.27 ± 3.94	51.13 ± 4.31
<b>WOBT (%)</b>	57.69 ± 1.84 <sup>a</sup>	58.79 ± 1.94 <sup>a</sup>	52.93 ± 2.20 <sup>ab</sup>	50.06 ± 2.20 <sup>b</sup>	51.00 ± 2.05	55.45 ± 2.24
<b>ALH (µm)</b>	3.00 ± 0.24 <sup>ab</sup>	3.14 ± 0.25 <sup>ab</sup>	3.54 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.29 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.25	1.24 ± 0.27
<b>BCF (Hz)</b>	11.70 ± 0.77	12.23 ± 0.79	12.06 ± 0.97	11.13 ± 0.90	8.55 ± 1.69	6.68 ± 1.85

Tabla 3. Parámetros CASA para los 4 tratamientos a las 2 y 20 horas. <sup>ab</sup> Diferentes letras entre filas representa diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

*Inducción de reacción acrosómica (RA) con Ionóforo A23187*

Al tratar los espermatozoides con Ionóforo, se observa que en todos hay una RA, pero en los tratamientos 3 y 4 hay un mayor nivel de acrosomas reaccionados (Tabla 4). Estos resultados sugieren con el tratamiento con TALP- $\beta$ -ciclodextrinas centrifugado (tratamiento 3) y el TALP-centrifugado (tratamiento 4) durante dos horas es suficiente para lograr que más del 50% de los espermatozoides hayan sufrido cierto grado de capacitación y por tanto que reaccionen ante el ionóforo. Siendo por tanto ambos procedimientos una alternativa a la capacitación espermática *in vitro*.

Tratamiento	Reacción acrosómica Porcentaje	
	Media $\pm$ SE	Intervalo de confianza
<b>1</b>	26.5 $\pm$ 2.72 <sup>b</sup>	21.06 - 31.93
<b>2</b>	33.6 $\pm$ 2.72 <sup>b</sup>	28.20 - 39.07
<b>3</b>	<b>56.5 <math>\pm</math> 2.72<sup>c</sup></b>	51.06 - 61.93
<b>4</b>	<b>65.1 <math>\pm</math> 2.72<sup>d</sup></b>	59.70 - 70.57
<b>5</b>	16.2 $\pm$ 2.72 <sup>a</sup>	10.77 - 21.64

Tabla 4. Inducción de la reacción acrosómica entre tratamientos: Tratamiento: 1)TALP, 2)TALP+DEX, 3)TALP+DEXcent, 4)TALPcent, y 5) Fresco

**4.2. Experimento 2: Estudio de las subpoblaciones espermáticas en los diferentes medios de capacitación.**

Tras el análisis de los parámetros de motilidad por medio de clústers, se seleccionaron los parámetros más informativos de los suministrados por el programa CASA (Vimas 5.1.) (Tabla 5): ALHMed, STR, BCF, HLO, DNM, MADAlg, AI, VAP y MADAbs.

HIERARCHICAL CLUSTERING	SPERM MOTILITY DESCRIPTORS	R <sup>2</sup> WITH OWN CLUSTER (OC)	R <sup>2</sup> WITH NEXT CLOSEST (NC)	PROPORTION (1-R <sup>2</sup> <sub>oc</sub> /1-R <sup>2</sup> <sub>nc</sub> )
<b>CLUSTER 1</b>	<b>*ALHMED</b>	0,9316	0,6237	<b>0,1818</b>
	ALHMAX	0,8643	0,4477	0,2457
	DNC	0,8966	0,6568	0,3012
	HHI	0,7324	0,5477	0,5916
<b>CLUSTER 2</b>	VSL	0,839	0,562	0,3676
	LIN	0,9229	0,6322	0,2097
	<b>*STR</b>	0,8783	0,2661	<b>0,1659</b>
<b>CLUSTER 3</b>	<b>*BCF</b>	1	0,1295	0
<b>CLUSTER 4</b>	<b>*HLO</b>	1	0,1562	0
<b>CLUSTER 5</b>	<b>*DNM</b>	1	0,2283	0
<b>CLUSTER 6</b>	<b>*MADALG</b>	1	0,2168	0
<b>CLUSTER 7</b>	WOB	0,8685	0,6096	0,3369
	<b>*AI</b>	0,8685	0,2701	<b>0,1802</b>
<b>CLUSTER 8</b>	VCL	0,8857	0,7341	0,4296
	<b>*VAP</b>	0,8844	0,4644	<b>0,2159</b>
	AV	0,9106	0,582	<b>0,2139</b>
	HME	0,7556	0,5267	0,5164

Tabla 5: Análisis por clusters (VARCLUS), para los parámetros de motilidad proporcionados por el CASA. “R<sup>2</sup> WITH OWN CLUSTER (OC)” da la correlación del parámetro de motilidad con su propio clúster. “R<sup>2</sup> WITH NEXT CLOSEST (NC)” da la correlación más alta del parámetro de motilidad con un componente del cluster. “PROPORTION (1-R<sup>2</sup><sub>oc</sub>/1-R<sup>2</sup><sub>nc</sub>)”. \*Indica el parámetro con mayor información dentro de su cluster correspondiente.

Los datos de los parámetros de motilidad analizados por clusters dan lugar a 4 subpoblaciones de espermatozoides móviles (Tabla 6). Las características de motilidad para cada una de las subpoblaciones pueden ser descritas de la siguiente forma:

- **Subpoblación 1:** Esta subpoblación se caracteriza por una velocidad de la trayectoria media alta (VAP) asociada a un elevado desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), con un índice de rectitud muy bajo (STR). Indicando que en esta subpoblación se encuentran los espermatozoides más activos y probablemente capacitados en términos de movilidad.
- **Subpoblación 2:** En esta subpoblación los espermatozoides presentan los valores más bajos de VAP, ALH y BCF. Por tanto, dentro de esta subpoblación se encontrarían los espermatozoides menos activos y podrían estar en proceso de apoptosis.
- **Subpoblación 3:** Estos espermatozoides se caracterizan por valores altos de progresividad (VAP), bajos de STR y valores intermedios de ALH entre la subpoblación 2 (espermatozoides menos activos) y la subpoblación 4 . Podría interpretarse como una población en proceso de capacitación.
- **Subpoblación 4:** Los espermatozoides de esta subpoblación presentan un movimiento progresivo (VAP alta) y menor desplazamiento lateral (ALH y BCF bajas). Podría interpretarse como una población de espermatozoides normal de acuerdo con sus valores cinéticos que son equivalentes a los obtenidos post-eyaculación.

Las subpoblación 4 representa el grupo de espermatozoide que muestra valores cinéticos más típicos de eyaculados que de espermatozoides capacitados. Valores de VAP y ALH entre 48 y 58 $\mu$ m/s, y 2,2 y 3,2  $\mu$ m respectivamente han sido observados por Lavara y col. (2005, 2008a y 2008b) y Quintero y col. (2007).

Subpoblación	VAP	ALHMED	STR	AI	BCF	HLO	DNM	MADALG
1	48.97	9.06	9.510	38.00	22.52	0.08	321.08	-16.51
2	13.45	2.21	38.17	34.07	18.64	0.02	13.28	-52.18
3	40.99	5.80	27.50	40.68	21.75	0.10	62.05	-7.37
4	44.52	3.78	81.65	44.59	16.44	0.21	10.14	-3.47

Tabla 6. Medias de los parámetros con mayor información en las 4 subpoblaciones.

Tratamiento	Subpoblaciones				Total
	1	2	3	4	
1	12	942	165	1221	2340
	0.12	9.48	1.66	12.28	23.54
	0.51	40.26 <sup>d</sup>	7.05 <sup>a</sup>	52.18 <sup>b</sup>	
	15.19	27.69	17.31	22.18	
2	18	792	202	1185	2197
	0.18	7.97	2.03	11.92	22.10
	0.82	36.05 <sup>c</sup>	9.19 <sup>b</sup>	53.94 <sup>bc</sup>	
	22.78	23.28	21.20	21.53	
3	20	547	207	987	1761
	0.20	5.50	2.08	9.93	17.72
	1.14	31.06 <sup>b</sup>	11.75 <sup>c</sup>	56.05 <sup>c</sup>	
	25.32	16.08	21.72	17.93	
4	8	557	102	554	1221
	0.08	5.60	1.03	5.57	12.28
	0.66	45.62 <sup>d</sup>	8.35 <sup>b</sup>	45.37 <sup>a</sup>	
	10.13	16.37	10.70	10.06	
5	21	564	277	1558	2420
	0.21	5.67	2.79	15.68	24.35
	0.87	23.31 <sup>a</sup>	11.45 <sup>c</sup>	64.38 <sup>d</sup>	
	26.58	16.58	29.07	28.30	
Total	79	3402	953	5505	9939
	0.79	34.23	9.59	55.39	100.00

Tabla 7. Porcentaje de espermatozoides capacitados dentro de los tratamientos en las 4 subpoblaciones.

En la tabla 7, se puede observar que para todos los tratamientos hay un predominio de espermatozoides de la subpoblación 4 que corresponden con espermatozoides con valores normales en sus parámetros cinéticos. Desgraciadamente, la subpoblación 1 (presumiblemente capacitada) no muestra diferencias entre tratamientos y el porcentaje de espermatozoides presentes es muy bajo. Por el contrario, las diferencias más importantes pueden observarse en la subpoblación 2, cuyas características cinéticas difieren notablemente de ser las óptimas para un espermatozoide (baja movilidad, escaso desplazamiento). Así la combinación del medio TALP-centrifugado genera la mayor proporción de espermatozoides de esta población (45%). Por el contrario, los tratamientos 5 (control) y 3 (TALP-β-ciclodextrinas-centrifugado) presentan la mayor

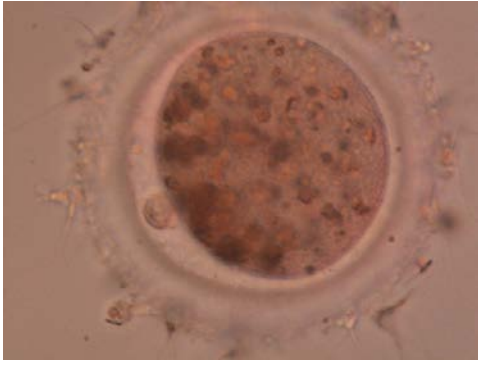
proporción de espermatozoides en la subpoblación 3 (en vías de capacitación, más de un 11%) aunque los valores obtenidos no parecen relevantes en relación con los otros tratamientos.

**4.3. Experimento 3: Capacidad fecundante de los espermatozoides tratados con  $\beta$  ciclo-dextrinas.**

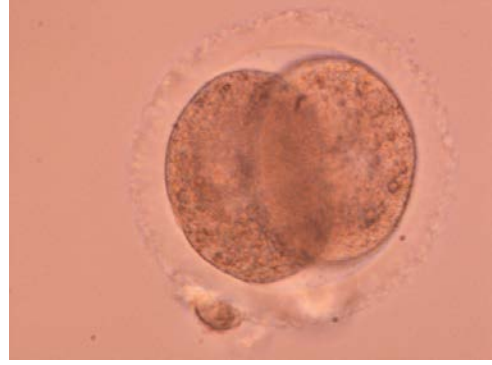
Para este ensayo se seleccionó el tratamiento 3 (TALP- $\beta$ -ciclodextrinas-centrifugado, atendiendo fundamentalmente a su índice de reacción acrosómica y a sus valores cinéticos de motilidad. Los espermatozoides tratados  $\beta$ -ciclodextrinas-centrifugado (Tabla 8) (Figura 2) tan sólo consiguieron fecundar o activar (Figura 3) al 16% de los óvulos, desarrollándose un 8,7% de ellos al estadio de mórula (Figura 4). Lo que resultó un porcentaje notablemente inferior al obtenido con espermatozoides tratados con procedimiento clásico (Ham's F10 durante 16 horas). Resultados que demuestran que el tratamiento utilizado en este trabajo no desencadena una capacitación válida para fecundar óvulos maduros. Probablemente, la acción de las  $\beta$ -ciclodextrinas y la centrifugación provoca una capacitación prematura que conlleva una elevada respuesta al ionóforo pero que como observó (Reyes, 1992; Romar, 2001) no permite a los espermatozoides cuando alcanzan la zona pelúcida unirse y atravesarla.

<b>Tratamiento</b>	<b>Nº de óvulos maduros</b>	<b>2 células</b>	<b>Mórula</b>
<b>Sin tratamiento</b>	50	(2) 4% <sup>b</sup>	(0) 0% <sup>b</sup>
<b>Dextrinas</b>	69	(11) 16% <sup>b</sup>	(6) 8,7% <sup>b</sup>
<b>Ham's F10 16 horas</b>	51	(26) 51% <sup>a</sup>	(22) 45% <sup>a</sup>

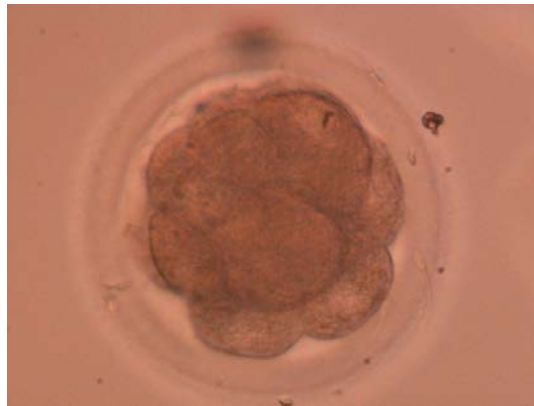
Tabla 8. Capacidad fecundante de los espermatozoides tratados con  $\beta$  ciclo-dextrinas.



**Figura 1. Adhesión de los espermatozoides al óvulo**



**Figura 2. Embrión en estadio de 2-células.**



**Figura 3. Mórula temprana 60h post-cultivo**

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ El tratamiento con las TALP- $\beta$ -ciclodextrinas+centrifugación y TALP-centrifugación modifican ligeramente los parámetros cinéticos de los espermatozoides y la composición de las subpoblaciones espermáticas y provocan tras 2 horas incubación un elevado índice de respuesta al ionóforo. No obstante, en ningún caso puede interpretarse como una mejora relevante del proceso de capacitación *in vitro*. El primero presenta signos de hiperactividad en términos de VCL y ALH mientras que el segundo parece afectar negativamente a los espermatozoides.
- ✓ Cuando se evaluó la capacidad fecundante de los espermatozoides tratados con TALP- $\beta$ -ciclodextrinas+centrifugación frente a un tratamiento clásico pudo observarse que los espermatozoides de este tratamiento mostraban una baja capacidad fecundante no acorde con la reacción acrosómica obtenida frente al ionóforo. Por lo que cabe concluir que el tratamiento utilizado en este trabajo altera las membranas espermáticas pero no desencadena un proceso de capacitación adecuado.



## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Allen, A; Green, D.P. 1997. The mammalian acrosine reaction: gateway to sperm fusion with the oocyte? *Bioassays*. 19: 241-247.
- Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-596.
- Bedford, J.M. 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28: 108-120.
- Bedford, J.M. 1998. Mammalian fertilization misread ? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol. Reprod.* 59: 1275-1287.
- Bracket BG and Oliphant G 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa invitro. *Biology of Reproduction* 12 260–274
- Breitbart, H.; Naor, Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev. Reprod.* 4:151-159.
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature*. 168:997-998.
- Chang, M.C.1959. Fertilizing of rabbit ova in vitro. *Nature*.184:466-467.
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H. 1997. Use de cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Research* 38: 2264-2272.
- Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. J. 2000. *Reproduction Fertil; Suppl* 56:127-132.
- Cortés, G.M, 2003. Tesis doctoral sobre el Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad Complutense de Madrid.
- Cross, N.L.; Meizel, S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 41, 635-641.
- Fleming, A. & Yanagimachi, R. (1984). Evidence suggesting the importance of fatty acid and the g fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the cromosome reaction of ginea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229: 485–489.
- Florman; H.M; First, N.L.1988. The regulation of acrosomal exocytosis. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Develop. Biol.* 128:453-463.

García, R., Rosales, A., Hernández, O., Chavarría, M., Reyes, A., Rosado, A. 2001. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit Spermatozoa. *Andrología* 33, 113–121

Guneet, M., Hung E., Shu, W. y Chung, P. 2003. The significance of the ionophore-challenged acrosome reaction in the prediction of successful outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination. *Human Reproduction*, Vol. 18, No. 3, 534-539.

Guraya SS. 2000. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol.* 199:1-64.

Hernández, P.J., Fernández, R.F., Torres, H.J.G. . 2005. Capacitación y Reacción Acrosomal in vitro de espermatozoides post-descongelados de Ovino. *Rev. Salud Anim.* Vol. 27 No. 1: 41-47.

Ho, H.C.; Suarez S.S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reprod.* 122: 519-526.

Kats, D.F.; Cherr, G.N.; Lambert, H. 1986. The evolution of hamster sperm motility during capacitation and interaction with the ovum vestments in vivo. *Gamete Res.* 14, 333-341.

Kats, D.F.; Drobnis, É.Z.; Balts, J., Cherr, G.N. Yudin, A.I.; Core, R.A. and Chem, L.Y. 1987. The biophysics of sperm penetration of the cumulus and zona pellucida. En: *New Horizons in Sperm Cell Research*. Mohri, H (ed.). Sci. Soc. Press, pp 13. Japón.

Langlais, J.; Roberts, K.D. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12: 183-189.

Lavara, R., Baselga, M., y Vicente, J.S, 2004. Estimación de las componentes de Varianza para las características seminales en conejo. *Análisis Preliminares*. UPV.

Lavara, R., Mocé., Lavara, F., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S. 2005. Do of seminal quality correlate with results of on – farm inseminations in rabbits. *Theriogenology*, 64, 1130 – 1141.

Leclerc, P.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. 1998. Interaction between Ca<sup>2+</sup>, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J. Androl.* 19:434-443.

Mocé, E., Graham, J., Schenk, J. 2006. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosoma reaction. *Theriogenology*; 66 (4): 929–36.

Morrier A, Thériault M, Castonguay F, Bailey JL. 2004. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting. Vancouver, Canada. P 239, Abstr. 636.

Moore, A.I., Squires E.L., Graham, J.K. 2005. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to stallion sperm plasm membranes improves cryosurvival.- *Cryobiology* 51: 241-249.

Purdy PH, Graham JK. 2004. *Cryobiology*; 48:36-45.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation *Theriogenology* 1: 63-68.

Quintero, M.A. 2003. Tesis doctoral en Estudio sobre la Dinámica de Poblaciones Espermáticas de semen de Caballo, Cerdo y Conejo. Universidad de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

Quintero M., Rigau, T., Rodríguez, J.E. 2007. Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reprod Dom Anim* doi:10.1111/j.1439-0531.

Reyes, S.M. 1992. Capacitación espermática y reacción acrosómica in vitro en bovinos. *Monografías de Medicina Veterinaria*, Vol.14 (2).

Romar, A.R. 2001. Tesis doctoral sobre el efecto de las células oviductales y del cumulus oophorus sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación in vitro en la especie porcina. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria.

Rodeheffer, C.; Shur, B.D. 2004. Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Develop.* 13: 503-512.

Rosatti, M.I.; Beconi, M.T.; Córdoba, M. 2004. Proacrosin-acrosin activity in capacitated and acrosome reacted sperm from cryopreserved bovine semen. *Biocell* 28: 311-316.

SAS, 1996: SAS/STAC Software. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

- Urdaneta, A. 2005. Tesis doctoral en la Utilización de compuestos Tiol en la producción in vitro de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes. Universidad de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
- Y. Toyoda, M.C. Chang, Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro, *J. Reprod. Fertil.* 36 (1974) 125–134.
- Yanagimachi, R. and Chang, M.C. 1963. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 200:281-282.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction* E. Knobil y J.D. Neilly (ed) 1: 135–185.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *In the Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189–317.
- Zeng WX, Terada T. 2001a. *Reprod Fertil Dev*; 12:223-228.
- Zeng WX, Terada T. J. 2001b. *Andrology*; 22:111-118.