

51262.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

Facultad de Estudios Superiores "ZARAGOZA"

**EXPRESION DE CARBOHIDRATOS EN LA MEMBRANA DE
ESPERMATOZOIDES DE CERDOS FERTILES Y SUBFERTILES**

Tesis que presenta

Biol. Exp. IRMA JIMENEZ MORALES

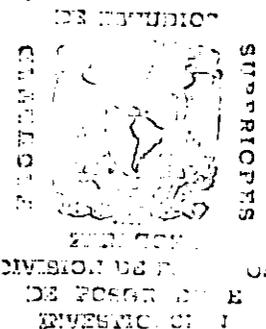
Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA DE LOS SISTEMAS HUMANOS)

DIRECTORA

DRA. REYNA C. FIERRO PASTRANA



AGOSTO, 2001



467

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

A los miembros del jurado:

Dra. Reyna C. Fierro por el invaluable respaldo que por años me ha brindado, así como por su persistencia y profesionalismo.

Dra. Rocío Ortiz por su amistad, entusiasmo, dedicación y empeño que la caracterizan y que ha sido para mí el mejor ejemplo a seguir.

Dr. Mario Altamirano por su atención y dedicación constante, fundamentales para la realización de este trabajo.

Dr. Miguel Betancourt por sus comentarios, sugerencias y sobre todo por el apoyo que siempre me ha brindado.

Dr. Edelmiro Santiago quien juiciosamente me ayudó a la organización y revisión del trabajo.

Mil gracias.

Resumen

La fertilización es un proceso de eventos moleculares que involucran el reconocimiento y fusión de gametos. La unión se inicia con el reconocimiento de proteínas glicosiladas presentes tanto en la zona pelúcida (ZP), como en la superficie del espermatozoide. Hasta la fecha se han propuesto diversas proteínas/glicoproteínas de la superficie del espermatozoide como moléculas que intervienen en el reconocimiento del ovocito. Estudios para identificar residuos de azúcares en la membrana plasmática y acrosomal, mostraron la presencia de N-acetilglucosamina, glucosa, manosa y galactosa. Por otro lado, se demostró que varios monosacaridos inhiben la unión y la penetración del espermatozoide a la ZP. Además, se encontró que algunos pacientes con problemas de fertilidad presentan disminución en la expresión de glicoproteínas con residuos de manosa en el glicolema espermático. Por esto, el objetivo de este trabajo consistió en determinar los cambios en la proporción y distribución de carbohidratos en la membrana de espermatozoides de cerdos fértiles y subfértiles durante la capacitación y la reacción acrosomal. Se analizaron 58 eyaculados de cerdo de diferentes razas y edades clasificados como buenos sementales por evaluación espermática. Se formaron dos grupos de acuerdo con sus registros de producción, 39 fueron considerados "eyaculados fértiles" (EF) y los 19 restantes "eyaculados subfértiles" (ES). Su edad osciló entre 8 y 42 meses. El análisis de la movilidad, viabilidad y morfología espermática no mostró diferencia significativa entre ambos grupos. Se determinó la distribución de residuos de carbohidratos mediante microscopía de fluorescencia y se cuantificó la intensidad de fluorescencia (IF) por medio de citometría de flujo (CF)

utilizando las lectinas WGA, Con-A y UEA marcadas con isotiocianato de fluoresceína. **WGA.** Esta se unió a la cabeza y al flagelo de EF fresco; después de la capacitación, la fluorescencia se concentró en la cabeza y al término de la RA la fluorescencia disminuyó. En los ES no se observaron cambios en el patrón de fluorescencia. Los resultados de CF en EF mostraron que la IF disminuye progresivamente después de la capacitación y la RA, mientras que en los ES sólo disminuye durante la capacitación. **Con-A.** Esta se localizó en toda la cabeza y la pieza media de EF frescos, la fluorescencia se desplazó a la región acrosomal durante la capacitación y después de la RA el marcaje se concentró en el borde del acrosoma. Los resultados de CF muestran un incremento en los residuos de manosa durante la capacitación y una ligera disminución después de la RA. En los ES no se observaron variaciones en la unión de esta lectina ni después de la capacitación ni de la RA. Tanto la movilización de los glicoconjugados de manosa hacia el acrosoma como el incremento en el IF podría ser un indicador de la capacitación espermática y la modificación de este parámetro podría ser indicador de subfertilidad en cerdos. **UEA.** Al microscopio, no fue posible observar ninguna fluorescencia debida a la unión de esta lectina. Sin embargo, los resultados de CF mostraron que existen ligandos para UEA en EF frescos; estos disminuyen con la capacitación y se mantienen al mismo nivel después de la RA. En ES se observó el mismo nivel inicial de residuos de fucosa que en EF, sin embargo, estos no disminuyen después de la capacitación sino hasta que se lleva a cabo la RA. La retención de los residuos de fucosa en la membrana de ES capacitados podría estar relacionada con la baja fertilidad de estos cerdos.

Tabla de Materias.

DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN	V
TABLA DE MATERIAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.	1
ESPERMATOGÉNESIS.....	1
ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE.....	2
MEMBRANA PLASMÁTICA.....	3
EL GLICOLEMA DEL ESPERMATOZOIDE.	6
ADQUISICIÓN DE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE.	7
MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.....	8
CAPACITACIÓN.	8
REACCIÓN ACROSOMAL.	11
FERTILIZACIÓN.	13
ESTUDIOS CON LECTINAS.....	14
CITOMETRÍA DE FLUJO.	17
JUSTIFICACIÓN.	19
OBJETIVOS.....	20

HIPÓTESIS.....	21
MATERIAL Y MÉTODO.....	22
MUESTRAS DE SEMEN.....	22
SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	22
EVALUACIÓN ESPERMÁTICA.....	23
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	24
LECTINAS.....	25
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	25
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
RESULTADOS.....	27
CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA.....	27
EVALUACIÓN ESPERMÁTICA.....	28
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	29
CERDOS FÉRTILES.....	30
CERDOS SUBFÉRTILES.....	36
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	41
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52

INTRODUCCIÓN.

Espermatogénesis.

El espermatozoide es una célula especializada, cuyo propósito fundamental es conducir la información genética masculina hacia el gameto femenino para unirse y formar un nuevo organismo. En los mamíferos, los espermatozoides se producen dentro de los túbulos seminíferos por medio del proceso llamado espermatogénesis.

Esta etapa es una secuencia de eventos citológicos que requiere de la producción continua de células precursoras llamadas células "tallos", así como de la reducción del número cromosómico diploide. En la mayoría de los mamíferos este proceso se efectúa durante toda la vida reproductiva del macho, en especies estacionales, la espermatogénesis puede ser interrumpida o modificada por factores ambientales, los cuales son traducidos a señales hormonales que estimulan o inhiben el proceso (Knobil y Neill, 1994).

La espermatogénesis puede ser dividida en tres etapas:

- a) Multiplicación de las células tallo (espermatogonias) por el proceso de mitosis.
- b) Reducción del número cromosómico diploide a haploide por el proceso de meiosis
- c) Diferenciación de las células precursoras a células especializadas llamadas espermatozoides.

La espermatogénesis requiere de un medio ambiente especializado dentro de los túbulos seminíferos, el cual es producido por las células de Sertoli. Este tipo celular es de gran importancia ya que forma la barrera hemato-testicular y proporciona el soporte para la migración progresiva de las células en proliferación desde la base hacia el lumen o luz del túbulo seminífero (Garner y Hafez, 1993; Knobil y Neill, 1994).

Los principales cambios que ocurren durante la espermatogénesis son:

- ❖ Formación del acrosoma
- ❖ Cambios nucleares
- ❖ Desarrollo del flagelo
- ❖ Reorganización del citoplasma, membrana y organelos.

Estructura del Espermatozoide.

Los espermatozoides de mamíferos son células alargadas que constan de una cabeza aplanada, que contiene al núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular, ambas estructuras, están unidas por el cuello. La célula espermática está completamente cubierta por el plasmalema o membrana plasmática (Garner y Hafez, 1993). En la mayoría de las especies animales los espermatozoides tienen tamaño y forma uniforme, miden aproximadamente entre 60 y 65 μm de longitud (Fig. 1).

La cabeza del espermatozoide se caracteriza por presentar un núcleo de forma oval y plano que contiene cromatina altamente condensada. La cabeza se divide en región acrosomal y post-acrosomal. El acrosoma es una

estructura situada entre la membrana plasmática y la parte anterior del núcleo. Contiene enzimas hidrolíticas que son de importancia durante la fertilización, entre las que se encuentran la proacrosina, hialuronidasa y esterases. El acrosoma está subdividido en segmentos: el apical, el principal y el ecuatorial. El flagelo está compuesto por el cuello o pieza conectora, la pieza media, la principal, y la terminal. El cuello forma una placa basal en la superficie posterior del núcleo. La región del flagelo entre el cuello y el anulus es la pieza media, el centro de la pieza media junto con toda la longitud de la cola forma el axonema, que es el responsable del movimiento (Fig. 2) (Garner y Hafez, 1993).

Membrana Plasmática.

La membrana plasmática del espermatozoide está constituida por agrupaciones de moléculas lipídicas y protéicas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor. La bicapa lipídica constituye la estructura básica y actúa como una barrera relativamente impermeable al flujo de la mayoría de moléculas hidrosolubles (Holt, 1995). Las moléculas protéicas están incluidas en la bicapa lipídica y realizan diversas funciones, entre las que se encuentran:

- ❖ Transporte de moléculas específicas hacia el interior o exterior de la célula.
- ❖ Actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones.
- ❖ Funcionan como receptores en la traducción de señales.

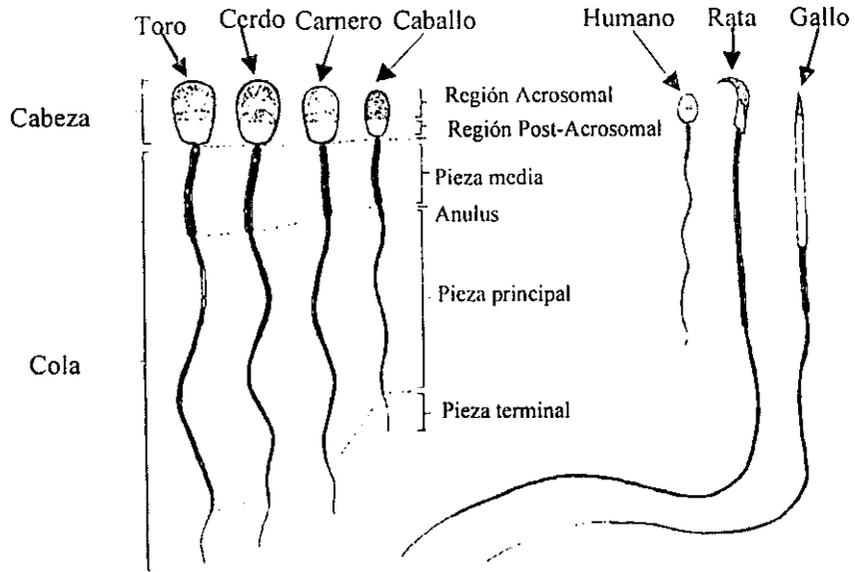


Figura 1. Esquema de diferentes tipos de espermatozoides.

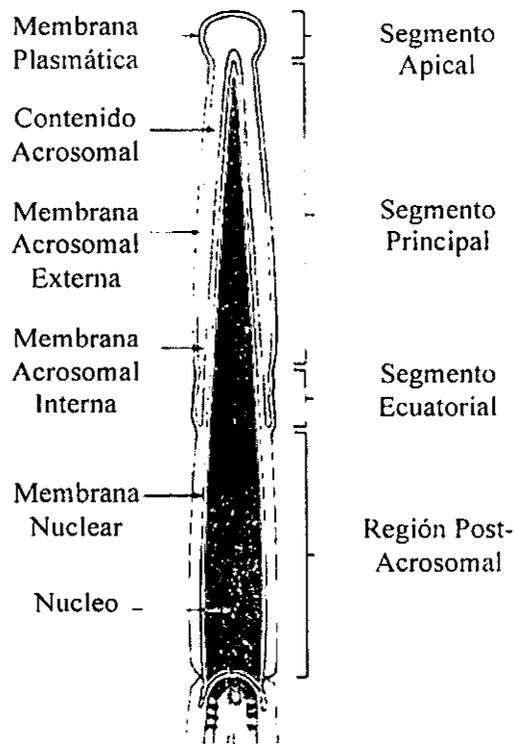


Figura 2. Esquema de la parte anterior del espermatozoide de ...

Las membranas también contienen carbohidratos, que en la mayoría de los casos son cadenas de azúcares simples o polisacáridos. Una de las funciones de estas moléculas consiste en servir como elementos de reconocimiento por parte de otras células u organismos.

La membrana plasmática del espermatozoide se caracteriza por estar subdividida en regiones denominadas dominios que difieren en composición y función. La diferenciación ultraestructural de los dominios de la membrana plasmática es conocida en varias especies incluyendo al humano. La naturaleza heterogénea de la superficie del espermatozoide se ha demostrado por medio de estudios con lectinas, anticuerpos específicos y por contenido de esterol en la membrana, lo que ha permitido identificar cambios estructurales en ella. Existen evidencias de que la organización y composición de la membrana plasmática varía entre diferentes regiones de la superficie. En los mamíferos el principal dominio de la membrana plasmática se localiza en la región acrosomal y en la región postacrosomal (Knobil y Neill, 1994).

El glicolema del espermatozoide.

El glicolema o glicocalix está formado por residuos de carbohidratos unidos a lípidos y a proteínas. El 92 % de las cerca de 300 diferentes proteínas de la membrana extracelular están glicosiladas, y forman el glicolema del espermatozoide junto con los glicolípidos. Se considera que la mayoría de las interacciones entre el espermatozoide y su ambiente están involucradas con el glicolema del espermatozoide (Schröter *et al.*, 1999).

Por medio de microscopía electrónica el glicolema del espermatozoide mostró ser una capa delgada y heteromorfa que varia en espesor de 20 a 60 nm (Bearer y Friend, 1990). Diversos estudios han mostrado que la superficie del espermatozoide no es homogénea, está formada por diferentes dominios funcionales, por lo que refleja una distribución espacial característica y regulada de sus componentes. Esto sugiere que tanto su heterogeneidad, su microgeografía y/o compartimentalización es parte de la compleja funcionalidad que presenta el espermatozoides durante su existencia pos-testicular (Bearer y Friend, 1990; Schröter *et al.*, 1999; Yanagimachi, 1994).

Adquisición de la capacidad fertilizante.

En los mamíferos la fertilización involucra una secuencia de interacciones entre los gametos masculino y femenino, tales como la adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP), la unión y penetración del espermatozoide a través de la zona y finalmente la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito. Los espermatozoides al salir del testículo no tienen la capacidad de fertilizar al ovocito, por lo que requieren de ciertos eventos: la maduración, la capacitación y la reacción acrosomal (RA).

Maduración del espermatozoide.

En los mamíferos, los espermatozoides formados en el testículo son inmaduros, incapaces de moverse y no tienen la capacidad de fertilizar al ovocito. Los espermatozoides adquieren estas propiedades al pasar por el epidídimo, donde sufren cambios fisiológicos y morfológicos importantes que los preparan para el proceso de la fertilización. A esta serie de eventos se les conoce como maduración. Los cambios en la maduración del espermatozoide dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de tránsito. Se han recuperado fluidos de cada región del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y se ha observado que presentan diferencias en estructura y composición bioquímica.

Durante la maduración, la membrana plasmática sufre modificaciones, en la composición y organización de sus componentes, se favorece la actividad flagelar y la capacidad de unión a la ZP, la redistribución de los sacáridos y glicoproteínas de la superficie de los espermatozoides y el aumento en la cantidad de ácido siálico (Knobil y Neill, 1994; Suzuki, 1990).

Capacitación.

La capacitación se considera como la serie de modificaciones bioquímicas y biofísicas que sufre el espermatozoide durante su paso a través del tracto reproductor femenino. Esta da como resultado la activación del espermatozoide y la sensibilidad de la célula para responder adecuadamente al reconocimiento del ovocito para poder realizar la fertilización (Yanagimachi, 1994).

El proceso de capacitación involucra cambios en la composición y orientación de las moléculas de superficie incluyendo principalmente a las glicoproteínas y a los lípidos de membrana, los cuales son importantes en el metabolismo, además de que estos pueden actuar como segundos mensajeros.

Durante la capacitación ocurre una remoción de glicoproteínas periféricas así como una redistribución de glicoproteínas integrales y de fosfolípidos, también ocurre una disminución de colesterol. Estos cambios son necesarios para que el espermatozoide pueda realizar la RA (Lee y Wong, 1986; Yanagimachi, 1994). Se requiere de calcio extracelular para terminar la capacitación. La concentración de calcio intracelular aumenta durante la capacitación mediante la enzima ATPasa dependiente de calcio (Fraser y McDermott, 1992). Su acción directa sobre la membrana es la de permitir la fusión entre la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa y propiciar la RA. El calcio provoca una desestabilización de la membrana plasmática y permite la formación de intermediarios con capacidad de fusión (Cheetham *et al.*, 1990). Una vez finalizado el proceso de capacitación, la RA se puede inducir.

Después de pasar a través de las células cúmulo, el espermatozoide se une a la ZP mediante receptores que se encuentran en la membrana plasmática. Únicamente en algunas especies como el ratón y el hámster los espermatozoides con acrosoma intacto y capacitado son capaces de unirse a la ZP. Sin embargo, en otras especies como el conejo y el cobayo, sólo los espermatozoide que previamente han realizado la RA son capaces de

mantener la capacidad de unión a la ZP por varias horas (Cummins y Yanagimachi, 1986).

Es importante recalcar que durante la capacitación se producen modificaciones estructurales en el espermatozoide como son:

- ❖ La eliminación de componentes superficiales que se adhieren al espermatozoide al estar en contacto con el plasma seminal, factores descapacitantes (Legault *et al.*, 1979).
- ❖ Disminución de la carga neta superficial del espermatozoide, probablemente debida a la supresión de ácido siálico y a algunos compuestos sulfatados (Legault *et al.*, 1980; Rosado *et al.*, 1973).
- ❖ Modificaciones en la distribución de carbohidratos superficiales (Tesarik, 1986).
- ❖ Cambios en la organización de partículas intramembranales (Mercado *et al.*, 1974).

La totalidad de estos cambios se reflejan en el aumento de la permeabilidad de la membrana a los iones de calcio. Se considera que la capacitación termina cuando las modificaciones estructurales de las membranas acrosomales permiten iniciar los mecanismos de fusión que constituyen al inicio de la RA (Langlais *et al.*, 1981; Meizel, 1995).

En diferentes especies de mamíferos se han identificado patrones característicos en la movilidad espermática asociados con la etapa final de la capacitación y el inicio de la RA tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos se conocen como *hiperactivación*, ya que los espermatozoide adquieren un movimiento

muy vigoroso denominado como movilidad tipo látigo, caracterizado por un aumento en la frecuencia y la amplitud del movimiento flagelar. Esto proporciona un empuje para la penetración a través de la ZP. La importancia funcional de la hiperactivación podría incluir la regulación del transporte espermático en el oviducto y la generación de la fuerza necesaria para la penetración de la capa que rodea al ovocito, las células de la granulosa y la ZP (Kay y Robertson, 1998; Nagai *et al.*, 1984; Yanagimachi, 1994).

Reacción Acrosomal.

La RA es un proceso natural que presenta el espermatozoide después de la capacitación. La RA consiste en la ruptura y fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por una vesiculación extensa en el segmento anterior del acrosoma, lo cual permite la liberación de las enzimas acrosomales hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina. La fusión de estas membranas provoca que quede expuesta la membrana acrosomal interna (Fig. 3).

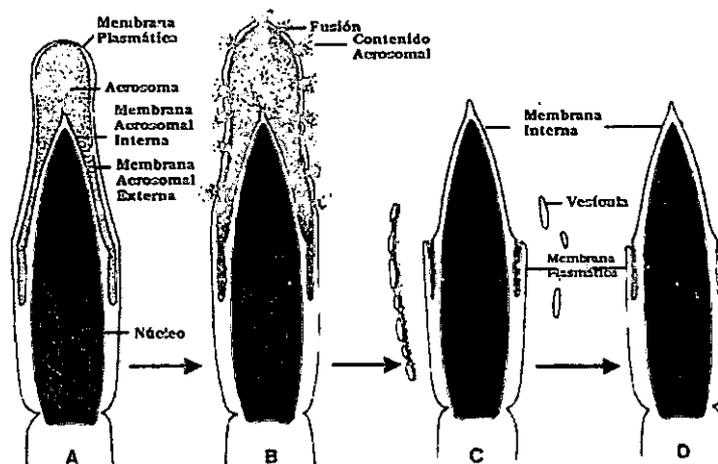


Figura 3. Diagrama esquemático de la Reacción Acrosomal.

La RA ocurre cuando se establece el primer contacto directo entre el espermatozoide y el ovocito. Esto ocurre después de la penetración de la capa de células cúmulo y la corona radiada, que son fenómenos de reconocimiento especie-específico. La fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa comienza en un área limitada entre el borde y el segmento ecuatorial, continua extendiéndose de lado por encima de la cabeza, lo que produce una desestabilización del capuchón acrosomal que provoca la liberación de su contenido el cual pasa por aberturas que se encuentran por todo lo largo de esta área (Brucker y Lipford, 1995; Yanagimachi, 1994).

Se ha demostrado que tanto la progesterona como la ZP son sustancias esenciales, para desencadenar una serie de señales intracelulares que culminan con la RA. Además de estas moléculas, existen otros agentes químicos como el ionoforo de calcio A-23187 que se utilizan como inductores de la RA. El Ca^{2+} es indispensable en la inducción de la RA, se sabe que hay incremento en la concentración de calcio intracelular poco antes de la RA (Brucker y Lipford, 1995).

En espermatozoides de erizo de mar la matriz extracelular que cubre al ovocito induce la RA por un flujo de calcio que pasa por canales operados por voltaje (Schackman y Shapiro, 1981). Hay evidencias que muestran aumento transitorio en el influjo de calcio en espermatozoides que no han iniciado la RA y en espermatozoides que entran en contacto con las proteínas de la ZP (Storey *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la activación de canales de calcio dependientes de voltaje es un requisito para la realización de la excitosis acrosomal inducida por ZP (Florman *et al.*, 1984). Por otro lado también se

ha observado que la progesterona induce el flujo de calcio en espermatozoides capacitados (Meizel, 1995).

Fertilización.

La fertilización en mamíferos es el resultado de una serie compleja de eventos moleculares los cuales permiten que el espermatozoide capacitado reconozca y se una a la ZP del ovocito. Existen evidencias de que la interacción entre el espermatozoide y el ovocito es un evento de unión receptor-ligando mediado por carbohidratos.

Una de las etapas decisivas en la fertilización es el reconocimiento y la interacción entre moléculas complementarias presentes en el espermatozoide y la ZP. La unión inicial entre los gametos implica el reconocimiento de proteínas glicosiladas presentes tanto en la ZP como en la superficie del espermatozoide. La especificidad de especie podría estar relacionada con la modificación de los carbohidratos en la superficie del ovocito y de la unión coordinada de las proteínas del espermatozoide capacitado (Miller y Ax, 1990; Tulsiani *et al.*, 1997). En algunas especies de mamíferos se ha propuesto que diversas glicoproteínas de la superficie del espermatozoide actúan como moléculas receptoras. Estudios en ratón han permitido la identificación de diversos receptores en el gameto masculino (Loeser y Tulsiani, 1999; Tulsiani *et al.*, 1997).

Tanto la RA como la fusión de gametos están restringidas por dominios de superficie, lo que sugiere que los constituyentes de la membrana en estas regiones son de importancia crucial en la fertilización. Los cambios

producidos en las glicoproteínas de la membrana son de gran interés debido a que estabilizan y mantienen los dominios de membrana del espermatozoide (Boue *et al.*, 1992). Las modificaciones de estas glicoproteínas ocurren durante la maduración, capacitación y la RA en algunas especies. Además se han identificado uniones a oligosacáridos en la región acrosomal, principalmente se ha observado la presencia de fucosa en varias glicoproteínas por lo que se considera que este carbohidrato está involucrado en el proceso de reconocimiento en la fertilización de mamíferos (Bellvé y O'Brien, 1983).

Estudios con Lectinas.

Las células pueden ser identificadas por las estructuras presentes en su superficie, en particular por los carbohidratos membranales, localizados generalmente en la periferia de estructuras protéicas así como de lípidos. Una manera de demostrar la presencia de azúcares en la superficie celular es utilizando proteínas que se unen a carbohidratos llamadas lectinas, que son ampliamente utilizadas para identificar y aislar moléculas de la membrana plasmática que contienen carbohidratos (Damjanov, 1987; Flesch *et al.*, 1998; Vazquez *et al.*, 1996). Las porciones glucídicas se encuentran unidas de manera covalente pero su distribución es compleja. En ésta interviene la estructura de la proteína o del lípido y también la síntesis y el metabolismo de las glicoproteínas que están bajo el control de enzimas como las glicosiltransferasas y las hidrolasas. Las uniones establecidas pueden ser del tipo N-glicosídico sobre un residuo de asparagina, o bien del tipo

O-glicosídico sobre el grupo hidroxilo de una serina o de una treonina. Los glúcidos fijados pueden ser hexosas (manosa, galactosa, fucosa), hexosaminas (D-glucosamina, D-galactosamina) o ácidos siálicos derivados del ácido neuramínico (Alberts *et al.*, 1994; Gahmberg *et al.*, 1992).

Se han realizado estudios con lectinas marcadas en algunas especies de mamíferos como el hámster, cobayo, rata, conejo, bovino, cerdo y caballo (Ahluwalia *et al.*, 1990; Koehler, 1981). En la mayoría de las especies examinadas se observa una fijación de las lectinas en membranas específicas. WGA (*Triticum vulgare*), se encontró principalmente en la membrana plasmática y para visualizar el acrosoma las lectinas más utilizadas son RCA (*Ricinus communis*), Con-A (*Concanavalina ensiformis*), PNA (*Arachis hypogea*), PSA (*Pisum sativum*) y MPA (*Maclura pomifera*), lo cual evoca la presencia de residuos de glucosa, manosa, galactosa y D-galactosamina, así como de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico (Ahluwalia *et al.*, 1990; Flesch *et al.*, 1998; Lee y Ahuja, 1987).

En cerdo se han realizado algunos estudios con las lectinas Con-A, WGA y PNA para evaluar la integridad del acrosoma (Vázquez *et al.*, 1996). Existe pocos estudios en donde se evalúan cuantitativamente las poblaciones de espermatozoides en los procesos de capacitación y RA *in vitro*. En humano, también se han realizado estudios con lectinas marcadas pero en la mayoría de los casos estos análisis se han realizado mediante microscopía de fluorescencia; los estudios en citometría de flujo y ultra estructurales son escasos.

Estudios con citometría de flujo y microscopía electrónica en espermatozoides humanos demostraron que la fijación de las lectinas sobre

las membranas plasmática y acrosomal depende del grado de avance en el tiempo de la capacitación y la RA. Se encontró que los residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico se localizan principalmente sobre toda la membrana plasmática del espermatozoide, la galactosa se encontró a nivel de la membrana externa del acrosoma; los residuos de manosa y de fucosa se localizaron principalmente sobre la membrana interna del acrosoma (Fierro *et al.*, 1996).

A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre la capacitación y la RA, estos fenómenos son tan complejos que todavía quedan muchas interrogantes por contestar. En humanos algunos investigadores han empezado a correlacionar los resultados de la evaluación espermática con la aparición o desaparición del marcaje con las lectinas. Por ejemplo, los espermatozoides que no fijan PNA por lo general presentan alto porcentaje de formas anormales al ser estudiados en microscopía electrónica (Ravid *et al.*, 1990), además se encontró una disminución en la expresión de Con-A en pacientes que presentan problemas de fertilidad (Tesarik *et al.*, 1991; Youssef *et al.*, 1996).

El estudio individual de los componentes estructurales de los espermatozoides, no predice efectivamente su capacidad fertilizante. La combinación de diferentes técnicas pueden predecir satisfactoriamente la calidad del semen, diferenciar células vivas de las muertas y valorar la integridad acrosomal. Para desarrollar estas técnicas se requiere de tiempo para su preparación y valoración, además, en la mayoría de los casos, el número de células que se analizan para su evaluación no es mayor de 200.

Una técnica que nos permite analizar con precisión miles de células en unos segundos es la citometría de flujo.

Citometría de Flujo.

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener datos multiparamétricos sobre las características físicas y químicas de las células en suspensión. Este es capaz de medir las propiedades ópticas de las células mediante la tinción con fluorocromos que se unen específicamente a un constituyente celular. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar y pasan una a una por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad (laser) a 488nm. Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo, uno o varios detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman la señal a pulsos eléctricos, también se recoge la luz dispersada por la célula, que está en función del tamaño, forma y estructura de la misma.

A diferencia de otras técnicas, el citómetro mide características celulares individuales de un gran número de células (500 a 10 000 células por segundo) y además permite medir características de poblaciones en muestras heterogéneas (Watson y Erba, 1994). El citómetro de flujo puede medir simultáneamente cinco parámetros para cada célula: la dispersión de la luz hacia el frente (FSC), dispersión lateral de la luz (SSC) y tres regiones espectrales de emisión de fluorescencia (FL 1-3). Para cada evento que pasa a través del láser, el citómetro de flujo emite un valor relativo a FSC, SSC y FL

tomando en cuenta la cantidad y la dirección de la dispersión de la luz incidente así como la emisión de fluorescencia (Haynes, 1988).

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información a cerca de la estructura, función y viabilidad de la célula. Algunos de los fluorocromos utilizados se unen covalentemente, y se usan para marcar proteínas, lípidos o bien otras moléculas biológicas, los cuales deben ser suficientemente selectivos y reactivos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina y ficoeritrina.

La citometría de flujo se puede emplear para estudiar características estructurales y funcionales de células o partículas en suspensión. Las aplicaciones fundamentales de esta técnica se dan en biología y medicina, para la identificación de antígenos celulares, el estudio del contenido de ADN, el análisis morfológico y la viabilidad celular, entre otras (Graham *et al.*, 1990).

JUSTIFICACIÓN.

La fecundación no puede efectuarse en caso de alguna anomalía en los procesos que preceden a la penetración del ovocito como la capacitación y la RA. Estos procesos son tan complejos que todavía existen muchas interrogantes por contestar.

Estas etapas se acompañan entre otros fenómenos, de cambios de la topografía de los glúcidos del glicolema (Crozet, 1994), que está constituido por las partes glicosídicas de las glicoproteínas y de los glicolípidos membranales.

En granjas especializadas en inseminación artificial y en los centros productores de semen se encuentran cerdos con problemas reproductivos (subfértiles), que no han podido ser detectados con los métodos tradicionales de evaluación espermática, este mismo problema existe en el humano. Por ello, resulta necesario identificar factores alternativos que permitan predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

En los últimos años se han utilizado algunas lectinas para identificar la presencia de carbohidratos en las membranas de espermatozoides de algunos mamíferos, sin embargo, son muy pocos los estudios realizados en cerdo y al parecer, no se ha reportado un seguimiento de las membranas de estos espermatozoides que permitan relacionar la presencia de ciertos carbohidratos con su capacidad fecundante.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la expresión de carbohidratos en la membrana de espermatozoides de cerdos durante la capacitación y la reacción acrosomal.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Observar la distribución de residuos glicosídicos en espermatozoides de cerdos Fértiles y Subfértiles durante la capacitación y la reacción acrosomal mediante microscopía de fluorescencia.

Cuantificar y comparar los residuos glicosídicos en espermatozoides de cerdos Fértiles y Subfértiles durante la capacitación y la reacción acrosomal mediante citometría de flujo.

HIPÓTESIS.

Se sabe que durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal suceden varios cambios a nivel de membrana por lo que se espera encontrar una redistribución de los carbohidratos, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa en el transcurso de dichos procesos.

Así mismo, se sabe que los carbohidratos juegan un papel muy importante en el reconocimiento de los gametos, por lo que se espera encontrar diferencias en cuanto a la distribución de carbohidratos de espermatozoides de cerdos fértiles y subfértiles.

MATERIAL Y MÉTODO.

Muestras de semen.

Se obtuvieron 58 muestras de semen de cerdos de 12 granjas locales. Los eyaculados se obtuvieron por el método de la mano enguantada, posteriormente se filtraron por medio de una gasa para obtener únicamente la fracción rica. Para su transporte al laboratorio los espermatozoides se colocaron en diluyente de larga duración (MR-A) a una concentración final de $6 \times 10^9/100\text{ml}$. La conservación de las muestras no fue mayor de 24 horas. Las muestras de semen se obtuvieron de cerdos de las razas Landrace, Yorkshire, Pietraen, Duroc, Sigherz y un grupo de Híbridos. La edad de los animales osciló entre 8 y 42 meses (Tabla 1 y 2).

Selección y clasificación de las muestras.

La selección de los cerdos se realizó considerando animales integrados a un programa de inseminación artificial, con registro de producción y sin signos clínicos de alguna patología. La clasificación se hizo analizando los indicadores reproductivos, como la tasa de partos y el número de lechones nacidos por camada (Flowers, 1998). Se define como cerdos de baja prolificidad aquellos animales cuyas cerdas inseminadas con su semen presentan menos de 10 y 9 lechones nacidos por parto en cerdas multíparas y nulíparas respectivamente; los cerdos con baja fertilidad son aquellos cuyas cerdas inseminadas presentan una tasa mayor al 15% de retorno al

estro (Campos, 1995; García, 1994). Con base en lo anterior se clasificaron como cerdos subfértiles aquéllos con baja fertilidad y/o prolificidad y cerdos fértiles los que no presentaran estos antecedentes. Se evaluaron datos de por lo menos cuatro meses anteriores a la fecha en la que se obtuvo la muestra, en el caso de cerdos de menos de 8 meses de edad, únicamente se consideró el indicador de fertilidad es decir el número de cerdas en gestación.

Del total de las muestras de semen analizadas, 39 muestras fueron de cerdos fértiles y 19 muestras de cerdos subfértiles (Tabla 1 y 2). En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras por medio de la evaluación espermática básica.

Evaluación espermática.

En cada una de las muestras se determinaron los siguientes indicadores:

Movilidad: se determinó por observación directa al microscopio óptico a 200X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles.

Viabilidad y Anormalidades.Morfológicas: se determinaron por medio de la técnica de Eosina/Nigrosina de acuerdo a los criterios descritos (Flowers, 1998; Jouannet *et al.*, 1988; Rillo *et al.*, 1996). La muestra se diluyó con el colorante a una proporción de 3:1, se preparó un frotis y se dejó secar a 37 °C. Se observó al microscopio óptico. Se contaron 100 células y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideraron como espermatozoides vivos aquéllos que no presentaron tinción y como

espermatozoides muertos los teñidos en color rojo. Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas. Se analizaron 100 células al microscopio.

Preparación de la muestra.

Las muestras de semen fueron estudiadas bajo tres condiciones: espermatozoides frescos, espermatozoides capacitados y espermatozoides reaccionados.

a) Frescos: El semen fue lavado dos veces con solución salina de fosfatos de Dulbecco (DPBS). Se centrifugó a 600g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en un mililitro de DPBS. Se tomaron 5×10^6 espermatozoides y se resuspendieron en PBS para su posterior marcaje con la lectina.

b) Capacitados: De los espermatozoides lavados se tomaron 5×10^6 células y se depositaron en una caja de plástico de cuatro pozos (Nunc Denmark) con medio TALP-HEPES suplementado con BSA (6mg/ml) y Piruvato de Sodio 1 mM (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) a un pH de 7.4 y fueron incubados durante cuatro horas a 39 °C, en una atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂ (Bonilla *et al.*, 1994).

c) Reaccionados: Después del tiempo de capacitación se indujo la RA mediante la adición de progesterona (Sigma Chemical, St Louis MO., USA) a una concentración final de 10 µg/ml y se dejó incubar durante 20 minutos en las mismas condiciones (Berger, 1990).

Lectinas.

Se utilizaron lectinas conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC): aglutinina de *Triticum vulgare* (WGA), que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, *Concanavalia ensiformis* aglutinina (Con-A), específica para residuos de manosa, y *Ulex europaeus* aglutinina (UEA), que se une a residuos de fucosa. Se preparó un control negativo para cada muestra, incubando las lectinas por 30 minutos con sus respectivos azúcares a una concentración de 0.3 M antes de ser puestas en contacto con los espermatozoides (Fierro *et al.*, 1996).

Citometría de flujo.

Se tomaron alícuotas de 5×10^6 espermatozoides, se incubaron con 5 μ l de la lectina a una dilución 1:50 y se incubaron durante 30 minutos a 39°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron dos veces con PBS, centrifugando a 600 g por 5 minutos. El paquete celular marcado fue fijado en paraformaldehído al 1%. Posteriormente los espermatozoides fueron analizados en un citómetro de flujo modelo FACScan (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San José, CA, EUA).

Se evaluaron 5,000 células por muestra en cada una de las condiciones estudiadas. Se analizaron los histogramas de intensidad de fluorescencia (IF) contra el número de células marcadas (Fierro *et al.*, 1996).

Microscopía de fluorescencia.

Se tomó una alícuota de la muestra de espermatozoides marcados con lectina y lavados con PBS (antes de ser fijados), se observó al microscopio de fluorescencia. Se determinó el patrón de distribución de la lectina, observando la región marcada (De Maistre *et al.*, 1996).

Análisis Estadístico.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba "t" de Student con un nivel de confianza $p < 0.05$.

RESULTADOS.

Clasificación de la muestra.

Se obtuvieron 58 muestras de semen de cerdos de diversas razas y edades provenientes de 12 diferentes granjas del país, las muestras cumplieron con las características descritas anteriormente. Se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su registro de producción. Del número total de muestras, 39 eyaculados fueron considerados como cerdos fértiles, ya que provenían de animales con fertilidad probada, se incluyeron en grupos de acuerdo a su raza, se incluyó un grupo denominado Híbridos que son cerdos con mezcla de razas Pietraen, Duroc y Hampshire. La edad de los cerdos osciló entre 8 y 42 meses (Tabla 1). Los 19 eyaculados restantes fueron clasificados como cerdo subfértiles por presentar baja fertilidad, su edad osciló entre los 11 y 42 meses (Tabla 2).

TABLA 1. Características del semen de los cerdos Fértiles

Raza N=39	Granja	Edad (meses)	Viabilidad (%)	Movilidad (%)	Anormalidades (%)
Landrace (13)	GC, R, J VC,CH.	8-36	90	85	3
Duroc (9)	R, J, M, GC, TP, CH	12-24	90	80	1
Yorkshire (10)	R, J, GC	11-42	95	90	1
Híbridos (7)	VC, CH,GC	9-30	90	80	3

Granjas: Cuatitlán (GC), Jalisco (J), Matamoros (M), Tepatlaxco (TP), Zumpango (Z), Calpulalpan (C), Chapingo (CH), Villa del Carbón (VC), Los Reyes (R).

Híbridos: Mezclas de las razas Pietrain, Duroc, Hampshire.

TABLA 2. Características del semen de los cerdos Subfértils

Raza N=19	Granja	Edad (meses)	Viabilidad (%)	Movilidad (%)	Anormalidades (%)
Yorkshire (5)	GC, J	24-36	92	85	5
Landrace (4)	M, GC, T, Z	11-28	90	80	7
Pietraen (2)	TP, C	17-42	94	85	6
Sigherz (3)	P, T	22-36	95	85	3
Híbridos (5)	P	18-36	95	80	8

Granjas: Cuatitla (GC), Jalisco (J), La piedad (P), Matamoros (M), Teoloyuca (T), Tepatlaxco (TP), Zumpango (Z), Calpulalpan (C).

Híbridos: Mezclas de las razas Pietrain, Duroc, Hampshire.

Evaluación espermática.

Se determinó la calidad de la muestra por medio de la evaluación de la movilidad, viabilidad y morfología. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las muestras de cerdos fértiles y subfértils. Los valores que presentan están dentro de los intervalos que indican buena calidad de la muestra (Hafez, 1993). En promedio se observó del 80 al 95% de movilidad, entre 80 y 95% de viabilidad, y menos de 10% de anomalías morfológicas. No se observaron diferencias entre las diferentes razas (Tablas 1 y 2).

Citometría de Flujo.

Los resultados muestran diferencias muy evidentes entre los espermatozoides marcados con lectinas y los marcados con lectinas neutralizadas con sus respectivos azúcares (control negativo), esto indica que la unión de las lectinas a los espermatozoides fue específica (Figura 4). Así mismo, se aprecian diferencias entre las muestras de espermatozoides frescos, capacitados y con RA.

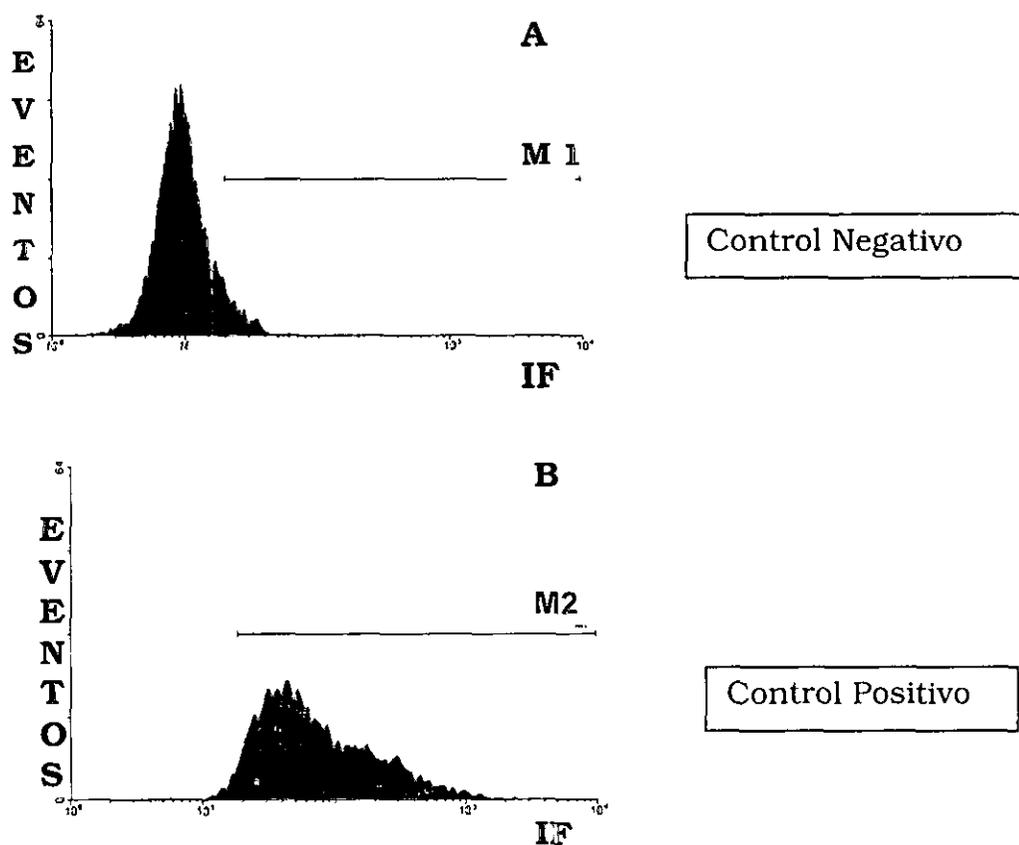


FIGURA 4. Se muestran histogramas de Intensidad de Fluorescencia contra el número de células marcadas. Se puede apreciar la diferencia entre el control negativo (A) y el grupo de espermatozoides marcados con la lectina conjugada a FITC (B). Se observa que la fluorescencia inespecífica es despreciable.

Cerdos Fértiles.

Las muestras de semen se agruparon por razas, en este caso se obtuvieron 5 grupos y se cuantificó la IF debida a la unión de la lectina.

WGA: Se observó que el patrón de unión de la lectina varía entre las diferentes razas y condiciones. La IF fue mayor en espermatozoides frescos, ésta disminuye durante la capacitación y se mantiene sin cambio después de la RA. La diferencia entre espermatozoides frescos y capacitados es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a excepción del grupo de Híbridos en el que la diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 3).

TABLA 3. Intensidad de fluorescencia (IF) de WGA. Análisis por raza.

RAZA	IF ± ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
N= 39			
Landrace	6946 ± 174 ^b	5641 ± 302 ^b	5597 ± 294
Duroc	6560 ± 481 ^a	5474 ± 484 ^a	5020 ± 455
Yorkshire	6654 ± 770 ^c	5486 ± 760 ^c	4610 ± 489
Híbridos	6842 ± 794	6126 ± 508	5295 ± 594

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student observando diferencia significativa entre espermatozoides frescos y capacitados con una $p < 0.05$ (a), $p < 0.001$ (b) y $p < 0.005$ (c). Número de muestra (N).

Por otro lado se realizó un análisis considerando la edad independientemente de la raza. Se formaron tres grupos: Grupo I (de 7 a

18meses), Grupo II (de 19-30 meses) y Grupo III (de 31-46 meses). La distribución de los sitios de unión de WGA tiende a comportarse de forma similar. Se observó una drástica disminución en la IF después de la capacitación, al término de la RA disminuye ligeramente, pero esta diferencia no es significativa. Sólo se mostró diferencia significativa entre los grupos II y III en espermatozoides frescos así como en espermatozoides reaccionados (Tabla 4).

TABLA 4. Intensidad de fluorescencia (IF) de WGA. Análisis por edad.

EDAD (meses)	IF ± ES			
	N=39	Frescos	Capacitados	Reaccionados
Grupo I (7-18)		6455 ± 365	5133 ± 346	4970 ± 275
Grupo II (19-30)		6630 ± 297 ^a	5756 ± 297	5185 ± 248 ^b
Grupo III (31-46)		7826 ± 330 ^a	6326 ± 515	6048 ± 171 ^b

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student observando diferencia significativa entre los grupos II y III de espermatozoides frescos y reaccionados $p < 0.05$ (a) y $p < 0.005$ (b). Número de muestra (N).

Con-A: Al analizar cada una de las razas, se observó un incremento en la fluorescencia de los espermatozoides capacitados con relación a la observada en los espermatozoides frescos en las razas Landrace, Duroc y en

los Híbridos ($p < 0.05$), sin embargo en la raza Yorkshire no se observaron cambios. Después de la RA se observó una ligera disminución en la fluorescencia en todas las razas, esta diferencia es significativa solamente en las razas Landrace y Duroc (Tabla 5).

Con respecto a la edad se observó un incremento de la fluorescencia en espermatozoides capacitados y al término de la RA se presentó una ligera disminución en la IF. Al realizar la comparación entre edades, sólo se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo II y III en espermatozoides frescos (Tabla 6).

TABLA 5. Intensidad de fluorescencia (IF) de Con-A. Análisis por raza.

RAZA	IF \pm ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
N=39			
Landrace	5389 \pm 154 ^a	6353 \pm 203 ^{a, b}	5794 \pm 209 ^b
Duroc	5242 \pm 231 ^a	6049 \pm 195 ^{a, b}	5554 \pm 295 ^b
Yorkshire	5525 \pm 395	5200 \pm 366	4915 \pm 355
Híbridos	4985 \pm 357 ^a	5979 \pm 215 ^a	5723 \pm 195

Se representa la media de IF \pm error estándar (ES). Se realizó la prueba t de Student observando diferencia significativa con una $p < 0.005$, entre espermatozoides frescos y capacitados (a), y entre espermatozoides capacitados y reaccionados (b). Número de muestra (N).

TABLA 6. Intensidad de fluorescencia (IF) de Con-A. Análisis por edad.

EDAD (meses)	IF ± ES			
	N=39	Frescos	Capacitados	Reaccionados
Grupo I (7-18)		5332 ± 204	5980 ± 265	5579 ± 215
Grupo II (19-30)		5184 ± 142 ^a	5854 ± 120	5684 ± 161
Grupo III (31-46)		5820 ± 174 ^a	6231 ± 291	5439 ± 376

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student observando diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los espermatozoides frescos del grupo II y III (a). Número de muestra (N).

UEA: En este caso se observó que la fluorescencia emitida por esta lectina es sustancialmente menor que la que presentan las dos lectinas anteriores. Los valores de la IF son relativamente bajos, sin embargo al compararlos con la del grupo control se mostraron claras diferencias entre ellos. El análisis por raza mostró que la IF tiende a disminuir en los espermatozoides capacitados; al compararlos con los valores de los espermatozoides frescos sólo hay diferencia significativa en las razas Landrace y Yorkshire ($p < 0.05$). En los espermatozoides reaccionados no hubo diferencia con respecto a los capacitados (Tabla 7). El análisis por edad no mostró diferencia significativa entre los grupos (Tabla 8).

TABLA 7. Intensidad de fluorescencia (IF) de UEA. Análisis por raza.

RAZA	IF ± ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
N=39			
Landrace	181 ± 18 ^a	134 ± 22 ^a	142 ± 19
Duroc	192 ± 23	135 ± 16	131 ± 25
Yorkshire	198 ± 27 ^a	126 ± 16 ^a	130 ± 18
Híbridos	161 ± 38	155 ± 22	167 ± 25

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución de t Student observando diferencia significativa ($p < 0.05$) entre espermatozoides frescos y capacitados (a). Número de muestra (N).

TABLA 8. Intensidad de fluorescencia (IF) de UEA. Análisis por edad.

EDAD (meses)	IF ± ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
N=39			
Grupo I (7-18)	198 ± 20	145 ± 14	153 ± 20
Grupo II (19-30)	179 ± 17	145 ± 18	128 ± 10
Grupo III (31-46)	184 ± 29	123 ± 21	161 ± 26

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student y no hubo diferencia significativa entre ningún grupo. Número de muestra (N).

Al agrupar las muestras sin distinción de raza ni de edad, se encontraron los siguientes resultados: Con WGA la IF disminuye en espermatozoides capacitados y disminuye aún más en espermatozoides reaccionados; estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.005$). Con respecto a Con-A observamos que después de la capacitación la fluorescencia se incrementó considerablemente y al término de la RA, ésta disminuye. La fluorescencia emitida por UEA disminuye considerablemente en los espermatozoides capacitados (diferencia significativa $p < 0.005$) y se mantiene sin cambios en espermatozoides reaccionados (Tabla 9 y Figura 5).

TABLA 9. Intensidad de Fluorescencia de Lectinas unidas a Espermatozoides de Cerdos Fértiles.

LECTINAS N=39	IF ± ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
WGA	6751 ± 210 ^b	5621 ± 210 ^a	5141 ± 177
Con- A	5335 ± 107 ^b	5957 ± 118 ^a	5458 ± 120
UEA	197 ± 11 ^b	142 ± 11	135 ± 10

Se representa la media de IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student observando diferencia significativa $p < 0.05$ (a) entre espermatozoides capacitados y reaccionados y $p < 0.01$ (b) entre espermatozoides frescos y capacitados. Número de muestra (N).

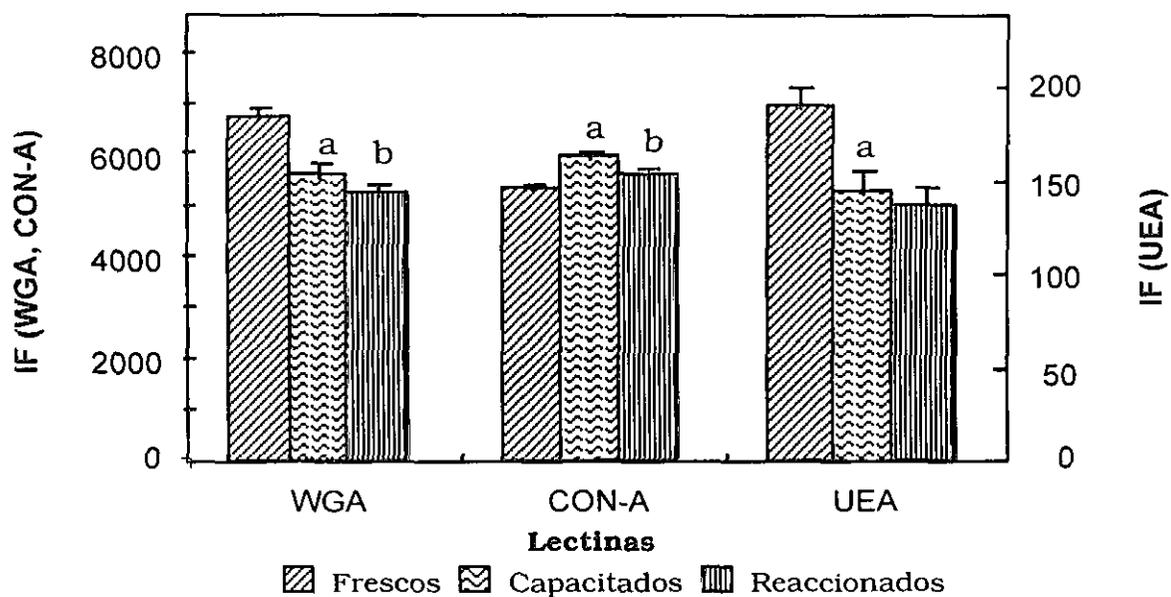


FIGURA 5. Se graficó el promedio de IF \pm error estándar. Se compararon las poblaciones de espermatozoides frescos vs capacitados (**a**) y capacitados vs reaccionados (**b**) mediante la prueba t de Student observando diferencia significativa con una $p < 0.05$.

Cerdos Subfértiles.

WGA: Los resultados mostraron que la unión de WGA a la membrana espermática de cerdos subfértiles disminuye después de la capacitación (diferencia significativa $p < 0.05$), y se mantiene sin cambios en espermatozoides reaccionados (Tabla 10 y Figura 6). Al comparar los datos con los de los cerdos fértiles se encontró que en los primeros hay menor IF y estas diferencias fueron significativas en las tres condiciones ($p < 0.05$) (Figura 7).

TABLA 10. Intensidad de Fluorescencia de Lectinas unidas a espermatozoides de Cerdos Subfértiles

LECTINAS N=19	IF ± ES		
	Frescos	Capacitados	Reaccionados
WGA	5443 ± 411 ^a	4687 ± 314	4452 ± 361
Con- A	5044 ± 198	4943 ± 231	4881 ± 288
UEA	207 ± 20	202 ± 21 ^b	154 ± 16

Se representa la media de la IF ± error estándar (ES). Se realizó la prueba de distribución t de Student observando diferencia significativa $p < 0.05$ (a) entre espermatozoides frescos y capacitados y $p < 0.01$ (b) entre espermatozoides capacitados y reaccionados. Número de muestra (N).

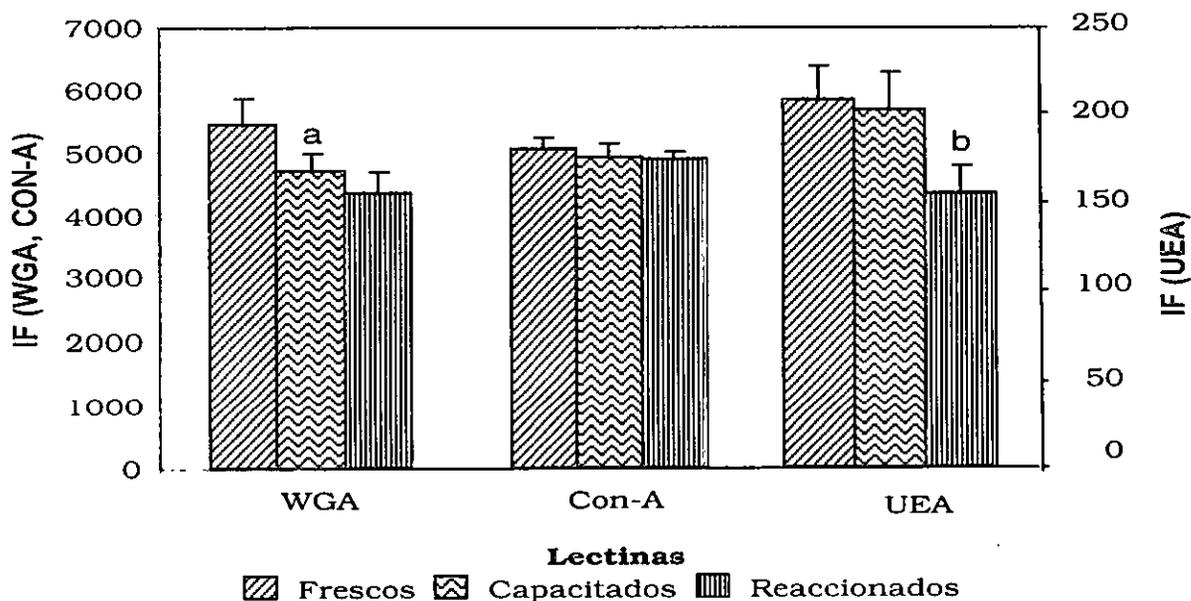


FIGURA 6. Se graficó el promedio de IF ± error estándar. Se compararon las poblaciones de espermatozoides frescos vs capacitados (a) y capacitados vs reaccionados (b) mediante la prueba t de Student observando diferencia significativa con una $p < 0.05$.

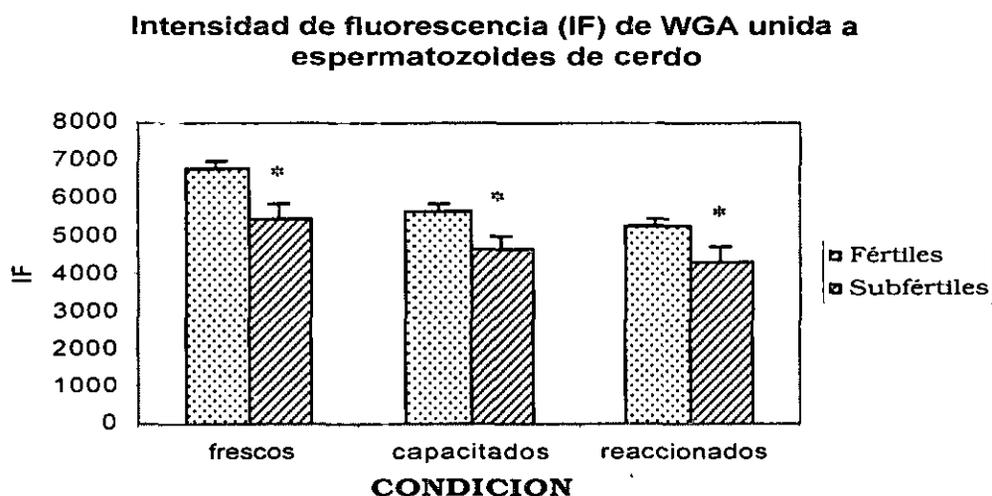


FIGURA 7. Se graficó el promedio de IF \pm error estándar. Se realizó la prueba de distribución *t* de Student entre cerdos fértiles y subfértiles, observando diferencia significativa a una $p < 0.05$ (*).

Con-A: Los resultados observados en los espermatozoides de cerdos subfértiles muestran que la unión de esta lectina no cambia en espermatozoides capacitados y reaccionados con respecto a los frescos (Figura 6). Al comparar estos resultados con los de cerdos fértiles se observó que no hay diferencias entre espermatozoides frescos de ambos grupos; con respecto a los espermatozoides capacitados y reaccionados sí hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de cerdos fértiles y subfértiles (Figura 8).

Intensidad de fluorescencia (IF) de Con-A unida a espermatozoides de cerdos

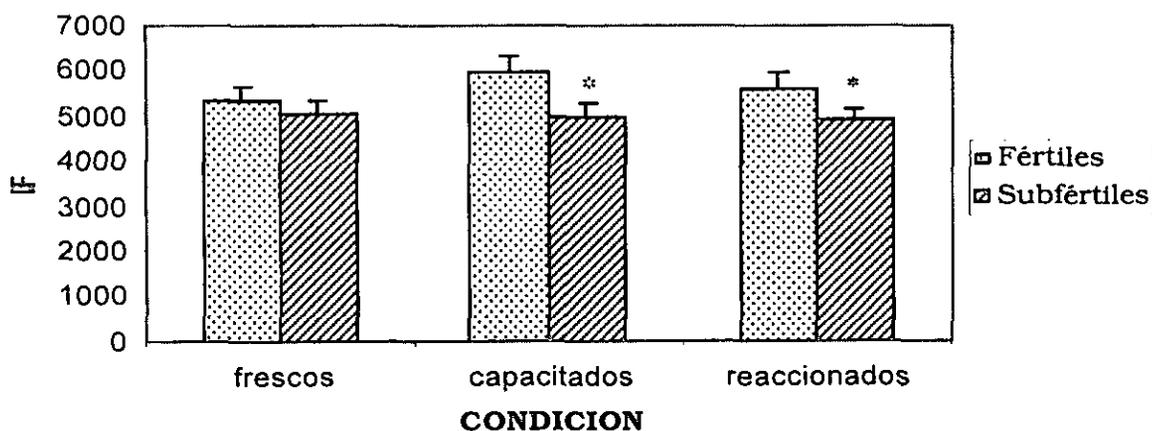


FIGURA 8. Se graficó el promedio de IF \pm error estándar. Se realizó la prueba de distribución *t* de Student entre cerdos fértiles y subfértiles, observando diferencia significativa a una $p < 0.05$ (*).

UEA: Los resultados mostraron que la IF en espermatozoides frescos y capacitados es similar. Sin embargo, en los espermatozoides reaccionados se observó una drástica disminución encontrándose que la diferencia es significativa ($p < 0.01$) como puede apreciarse en la Figura 6. Al comparar estos resultados con muestras de cerdos fértiles se observó que en ambos grupos los espermatozoides frescos y reaccionados presentan IF similares. Por el contrario, después de la capacitación, la IF de espermatozoides de cerdos fértiles es menor que la de espermatozoides de cerdos subfértiles (diferencia significativa $p < 0.05$) (Figura 9).

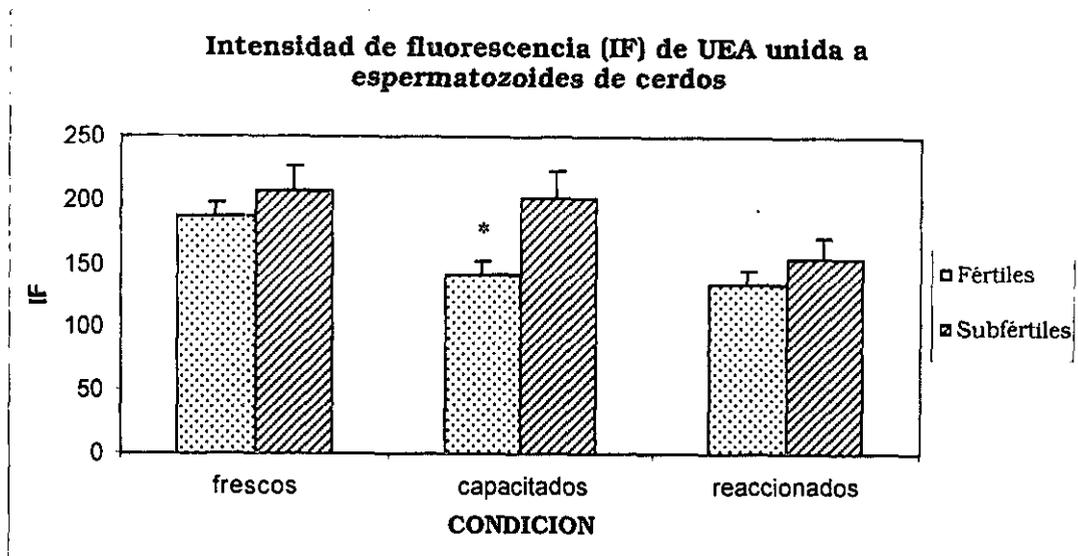


FIGURA 9. Se graficó el promedio de IF \pm error estándar. Se realizó la prueba de distribución *t* de Student entre cerdos fértiles y subfértiles, observando diferencia significativa a una $p < 0.05$ (*).

Microscopía de fluorescencia.

Los resultados muestran diferencias entre los espermatozoides marcados con lectinas y los marcados con lectinas neutralizadas con sus respectivos azúcares (control negativo). Así mismo, se aprecian diferencias entre las muestras de espermatozoides frescos, capacitados y con RA.

WGA: Se presenta en la cabeza y en el flagelo de espermatozoides frescos. Con la capacitación disminuye la fluorescencia en el flagelo, concentrándose en la cabeza. En espermatozoides reaccionados, la fluorescencia desaparece en el flagelo y la intensidad disminuye en la cabeza (Figura 10 a, b, c).

Con-A: Se localiza en toda la cabeza y en la pieza media de los espermatozoides frescos. Después de la capacitación el marcaje se sitúa principalmente en la región acrosomal. En los espermatozoides reaccionados la fluorescencia se concentra principalmente en el borde de la región acrosomal (Figura 10 d, e, f).

La fluorescencia no pudo evaluarse en el caso de UEA ya que los espermatozoides presentaron muy baja IF, comparable con la que presentó el control negativo.

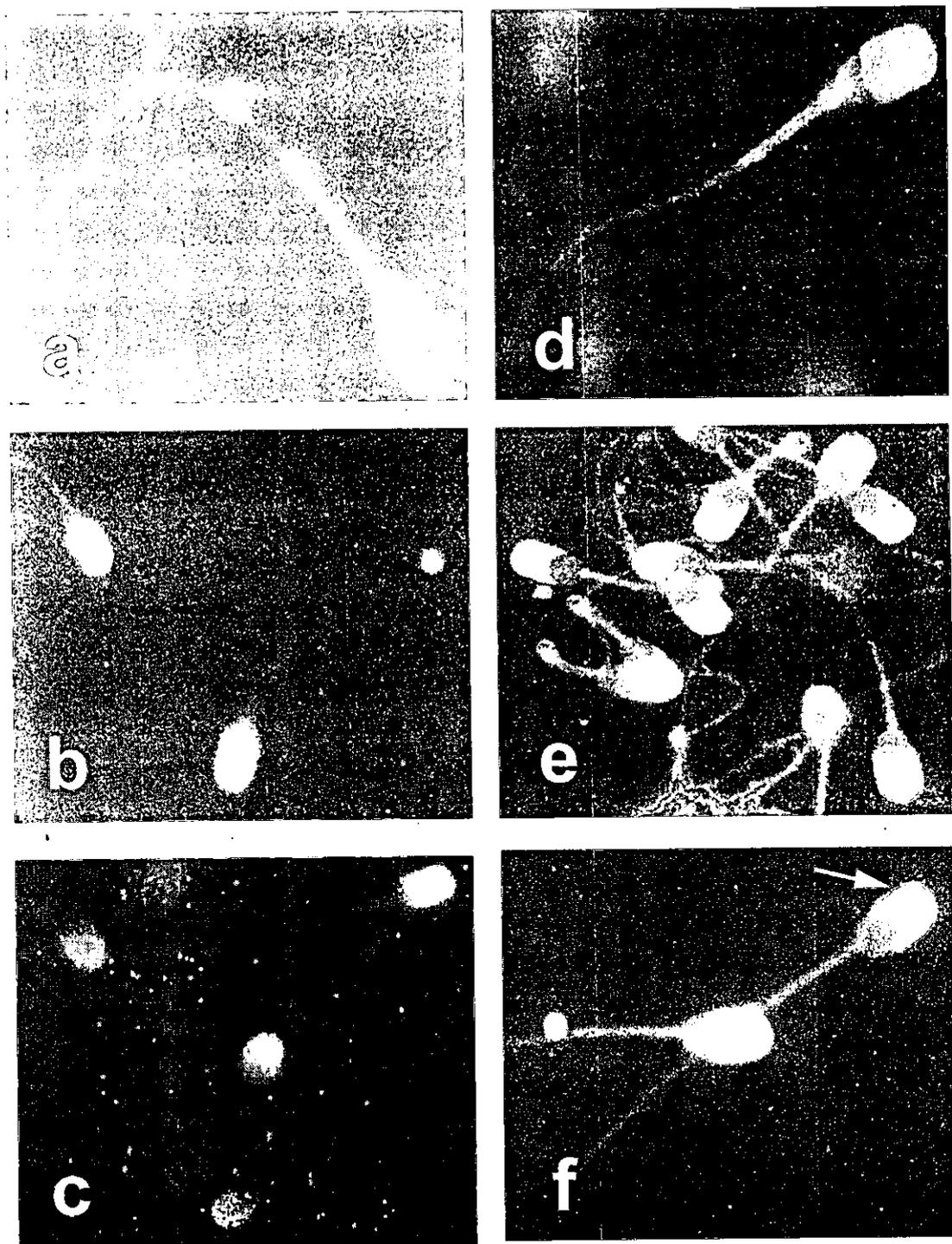


FIGURA 10. Microscopía de Fluorescencia, 400X

Figura 10. Microscopía de Fluorescencia, X400.

a) Con la lectina WGA se marca la membrana plasmática de espermatozoides frescos.

b) El marcaje se concentra en la cabeza, y el flagelo muestra baja fluorescencia en espermatozoides capacitados.

c) En espermatozoides reaccionados sólo se encuentra fluorescencia en la cabeza.

d) Con la lectina Con-A se marca débilmente la cabeza y la pieza media de espermatozoides frescos.

e) Después de la capacitación se concentra la fluorescencia en la región acrosomal.

f) La fluorescencia se encontró principalmente en el borde de la región acrosomal en espermatozoides reaccionados.

DISCUSIÓN.

La capacidad fertilizante de los espermatozoides está relacionada con la movilidad, la morfología y la función del acrosoma, entre otras. El deterioro de alguna de estas funciones se ha ligado a fallas reproductivas (De Jonger *et al.*, 1993), además se ha observado que altos porcentajes de espermatozoides anormales están asociados con infertilidad y con la calidad del embrión (Parinaud *et al.*, 1993). Se ha mostrado una relación entre anomalías morfológicas y la baja capacidad de realizar la RA (Carrell *et al.*, 1994; Heywinkel *et al.*, 1993).

En centros de producción de semen y granjas con centro de inseminación artificial, se determina la capacidad fertilizante de cada eyaculado evaluando la movilidad, la viabilidad y la morfología espermática. Actualmente estos parámetros son utilizados como análisis de rutina para diagnosticar la fertilidad del macho (Flowers, 1998; Rillo *et al.*, 1996). Sin embargo, estos indicadores no son siempre suficientes para identificar eyaculados de cerdos con problemas reproductivos.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias al comparar la evaluación espermática básica entre cerdos fértiles y cerdos subfértiles. Los resultados de viabilidad, movilidad y anomalías morfológicas están dentro de los valores establecidos para considerarse como cerdos fértiles, a pesar de ello, 19 de los cerdos fueron clasificadas como subfértiles por sus antecedentes de baja fertilidad y/o prolificidad.

Es evidente que no se puede utilizar la movilidad, viabilidad y anomalías morfológicas como únicos parámetros para determinar el

poder fecundante de los espermatozoides, ya que no siempre los eyaculados presentan alteraciones en estos parámetros. Por lo tanto debe considerarse que existen otros factores que intervienen en la disminución de la fertilidad, como la falta o la disminución de receptores en el espermatozoide.

Se han realizado diversos estudios para determinar la distribución de residuos de azúcares en espermatozoides de diferentes especies de mamíferos (Koehler, 1981). En la mayoría de las especies examinadas se muestra la presencia de residuos de glucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina, ubicados principalmente en la membrana plasmática, el acrosoma y la región ecuatorial. También se han observado residuos de fucosa en la región post-acrosomal (Bawa *et al.*, 1993; Lee y Ahuja, 1987).

En general, los resultados obtenidos en este trabajo no muestran diferencia significativa entre los datos obtenidos por raza ni por edad de los cerdos. Esto podría deberse al número de muestra, ya que al agruparse tanto por raza o edad, el número de muestra disminuye considerablemente.

Al ser analizadas las muestras de cerdos normales, en su totalidad, encontramos la presencia de residuos de ácido siálico y/o N-acetilglucosamina, manosa y fucosa en la membrana de los espermatozoides. Estos se localizan en toda la membrana plasmática del espermatozoide incluyendo el flagelo y en la membrana acrosomal. Al mismo tiempo se observó que en la superficie del espermatozoide se produce una remoción continua de moléculas glicosiladas, ya que, la distribución de estas moléculas cambia durante la capacitación y la RA.

Los residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico disminuyen considerablemente durante la capacitación y la RA. En estudios previos

utilizando técnicas de marcaje ultraestructural y microscopía de fluorescencia se encontró que WGA se une a la superficie de espermatozoides lavados de cerdo, bovino y humano (De Maistre *et al.*, 1996; Fierro *et al.*, 1996; Flesch *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos por citometría de flujo concuerdan con los trabajos anteriores ya que WGA se une a la membrana plasmática de espermatozoides frescos.

En espermatozoides capacitados y con RA, los sitios de unión a WGA disminuyen y se concentran en la región del acrosoma y en algunos casos en la región post-acrosomal. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede sugerir que la presencia de un gran número de residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana plasmática del espermatozoide es un buen indicador de que no se ha iniciado la capacitación.

Los resultados de cerdos subfértiles mostraron diferencia en la distribución de los receptores, pues se observó un número menor de residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la superficie del espermatozoide. Al igual que en cerdos fértiles, los receptores disminuyen durante la capacitación pero al terminar la RA, éstos se mantienen sin cambios. Esto podría indicar que disminuye la población de espermatozoides que realizó la RA y concuerda con los datos obtenidos con las mismas muestras en las que se evaluó la RA mediante otra metodología (Herrera *et al.*, 2000).

Al comparar estos resultados con los de cerdos fértiles se encontraron diferencias significativas, por lo que se propone que la disminución de residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana

plasmática podrían tener relación con la subfertilidad de los cerdos. Se reportó en espermatozoides humanos que la localización y la concentración de receptores a WGA están directamente asociados con la fertilidad masculina ya que la unión de WGA se encontró disminuida en muestras de semen con alteraciones morfológicas (Gabriel *et al.*, 1994). Así mismo, se encontró que los mismos receptores podrían estar relacionados con la activación del ovocito, ya que bajas concentraciones de WGA impiden que los espermatozoides activen al ovocito y reducen la fertilización. Estas observaciones sugieren que los sitios de unión a WGA en la membrana plasmática podrían ser parte de un complejo receptor-activación del espermatozoide (Flannery y Epel, 1998).

La lectina Con-A se utiliza para determinar la integridad del acrosoma. En espermatozoides de diversos mamíferos, se han realizado estudios ultraestructurales en donde se observa que manosa se une preferencialmente a la membrana interna del acrosoma (Holden *et al.*, 1990; Runnebaum *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1993). En humano se ha observado que Con-A se une a la región anterior de la cabeza del espermatozoide capacitado; al inducir la RA, se observó que la lectina se une a la región ecuatorial y a la membrana acrosomal interna (Fierro *et al.*, 1998; Topfer-Petersen *et al.*, 1984; Vázquez *et al.*, 1996). En el presente trabajo se observó que en espermatozoides frescos la lectina se encuentra en la cabeza y en la pieza media aunque en baja cantidad; en los espermatozoides capacitados, los residuos de manosa se incrementan significativamente en la región acrosomal y en los espermatozoides reaccionados la marca se sitúa de manera muy intensa en el borde de la región del acrosoma. Con lo anterior se puede considerar que

la migración de los receptores a Con-A es un indicador de la capacitación y de la RA de los espermatozoides de cerdo.

Varios autores han demostrado la participación de los sitios de unión de Con-A con la unión del espermatozoide a la ZP en humanos. La expresión de estos receptores en la superficie del espermatozoide se incrementa durante la capacitación por lo que concluyen que la expresión de los residuos de manosa se relaciona con el estado acrosomal del espermatozoide y su potencial fertilizante (Chen *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1989). En los espermatozoides de cerdos subfértiles se observó que la unión de Con-A no presenta cambios durante la capacitación y la RA. Consideramos que la expresión diferencial de estos receptores podría ser uno de los indicadores de espermatozoides de cerdos subfértiles.

Por otra parte, se observó que los espermatozoides de humanos recién eyaculados no presentan unión de la lectina UEA (Lee y Damjanov, 1985). Otros autores observaron que después del lavado, se aprecian residuos de fucosa en la membrana plasmática de la región post-acrosomal, en el cuello y en la pieza media (Bains *et al.*, 1992). Posteriormente se detectó la aparición de residuos de fucosa en la membrana interna del acrosoma y en las vesículas acrosomales solamente dos horas después de haber inducido la RA (Fierro *et al.*, 1996).

Los resultados del presente trabajo muestran que la IF debida a UEA fue menor a la que se presenta con WGA o Con-A, por lo que en microscopía de fluorescencia no se logró detectar. Consideramos que esto se debe al bajo número de residuos de fucosa presentes en el espermatozoide de cerdo. El

citómetro de flujo, por ser un aparato más sensible, permite detectar intensidades bajas de fluorescencia y por lo tanto se logró demostrar la presencia de residuos de fucosa en los espermatozoides de cerdo y detectar sus modificaciones durante la capacitación y la RA. Los resultados de cerdos fértiles muestran una expresión de estos receptores en la membrana plasmática de espermatozoides frescos y capacitados, la cual disminuye significativamente en espermatozoides reaccionados. Al parecer, los residuos de fucosa son importantes para el reconocimiento entre los gametos (Huang *et al.*, 1982). Hasta la fecha no se conoce con exactitud la participación de este carbohidrato durante la fertilización, pero se requiere de su presencia para que el espermatozoide se una al ovocito (Shalgi *et al.*, 1991).

Los datos obtenidos en cerdos subfértiles muestran una expresión similar de residuos de fucosa en la membrana plasmática de espermatozoides frescos y capacitados, la cual disminuye significativamente en espermatozoides reaccionados. Es probable que la sobre-expresión de estos residuos en espermatozoides capacitados repercuta en la capacidad de los espermatozoides para llevar a cabo la RA. Al igual que con las dos lectinas analizadas anteriormente, se observa que la alteración en la expresión de residuos de fucosa en la superficie del espermatozoide podría repercutir en el proceso de unión del espermatozoide al ovocito.

En algunas especies de mamíferos se han estudiado los cambios en la unión de diversas lectinas durante la capacitación y la RA, sin embargo algunos de los resultados son contradictorios. Lee y Ahuja, (1987) no encontraron alteraciones significativas en la distribución de los sitios de unión de las lectinas, por otro lado Aguas y da Silva, (1989), observaron

cambios en las glicoproteínas de la membrana plasmática durante la capacitación de espermatozoides de ratón. En espermatozoides de cerdo se observó una disminución significativa en el porcentaje de unión a las lectinas PNA, WGA y Con-A después de la RA (Vázquez *et al.*, 1996). Estos resultados están en controversia con los de nuestro estudio debido probablemente a que ellos utilizaron microscopía de fluorescencia y/o microscopía electrónica, en cambio en este trabajo se empleó además de la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo que permite analizar miles de células en poco tiempo y con alta sensibilidad.

Los datos obtenidos indican que, además de utilizar la movilidad, viabilidad y anormalidades morfológicas como parámetros para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides, es necesario desarrollar nuevas técnicas más sensibles y confiables. Una de ellas podría ser la cuantificación de los receptores de membrana de los espermatozoides por citometría de flujo. Esto mejoraría el diagnóstico y disminuiría las pérdidas por la selección incorrecta de sementales. Esta técnica podría ser adecuada para centros de inseminación artificial y productores de semen.

CONCLUSIONES.

Se propone que el análisis de la movilidad, viabilidad y anormalidades morfológicas debe ser complementado con otras técnicas, como la cuantificación de receptores de membrana.

Se demostró que durante la capacitación y la RA se modifica la composición del glicolema de espermatozoides de cerdo reflejada por la redistribución de los carbohidratos N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, manosa y fucosa.

La microscopía de fluorescencia nos permitió localizar el lugar preciso de unión de la lectina en las diferentes regiones del espermatozoide, y se logró cuantificar la intensidad de fluorescencia por medio de la citometría de flujo.

Se encontraron diferencias en la expresión de carbohidratos entre cerdos fértiles y subfértiles, por lo que consideramos que estas moléculas podrían estar relacionadas con la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Sería recomendable, en futuras investigaciones, tratar de identificar las glicoproteínas involucradas en las modificaciones del glicocáliz de espermatozoides de cerdos fértiles y subfértiles durante la capacitación y la RA.

REFERENCIAS.

Aguas, A.P. y da Silva, P.P. (1989). Bimodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during Ca^{2+} -dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *J. Cell Sci.* 93:467-479.

Ahluwalia, B., Farshori, P., Jamuar, M., Baccetti, B. y Anderson, W.A. (1990). Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 22:53-62.

Alberts, B., Brayan, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y D, W.J. (1994). *Molecular Biology of The Cell*, Tercera edicion Ed, M. Robetson, ed. (New York, NY: Garland Publishing, Inc) 1220 pp.

Bains, H.K., Sehgal, S. y Bawa, S.R. (1992). Human sperm surface mapping with lectins. *Acta Anat.* 145:207-211.

Bawa, S.R., Pabst, M.A., Werner, G. y Bains, H.K. (1993). Capacitated and acrosome reacted spermatozoa of goat (*Capra indicus*): a fluorescence and electron microscopic study. *Andrologia.* 25:123-135.

Bearer, E.L. y Friend, D.S. (1990). Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation and capacitation. *J. Electron Microsc. Tech.* 16:281-297.

Bellvé, A.R. y O'Brien, D.A. (1983). The mammalian spermatozoon : Structure and temporal assembly. In *Mechanism and control of animal fertilization*, J.F. Hartmann, ed. (New York: Academic Press), pp. 55-113.

Berger, T. (1990). *Pisum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology*. 33:689-695.

Bonilla, E., Amador, A. y Betancourt, M. (1994). *In vitro* capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med. Sci. Res.* 22:725-726.

Boue, F., Lassalle, B., Duquenne, C., Villaroya, S., Testart, J., Lefevre, A. y Finaz, C. (1992). Human sperm proteins from testicular and epididymal origin that participate in fertilization : Modulation of sperm binding to zona-free hamster oocytes, using monoclonal antibodies. *Mol. Reprod. Dev.* 33:470-480.

Brucker, C. y Lipford, G.B. (1995). The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum. Reprod. Update.* :51-62.

Campos, M. (1995). Sistemas de Producción. En: La producción Porcícola en México (México: UAM), pp. 111-141.

Carrell, D.T., Zobell, R.L., Middleton, R.G. y Urry, R.J. (1994). A functional analysis and the potential clinical significance of 7 categories of sperm morphology. *J. Urol.* 151:376-380.

Cheetham, J.J., Chen, R.J.B. y Eppard, R.M. (1990). Interaction of calcium and cholesterol sulphate induce membrane destabilization and fusion: implications for the acrosome reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1024:367-372.

Chen, J.S., Doncel, G.F., Alvarez, C. y Acosta, A.A. (1995). Expression of mannose-binding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zone pellucida binding. *J. Androl.* 16:55-63.

Crozet, N. (1994). Réaction acrosomique et fécondation. *Contracept. Fertil. Sex.* 22:334-336.

Cummins, J.M. y Yanagimachi, R. (1986). Development of ability to penetrate the cumulus oophoros by hamster spermatozoa in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res.* 15:197-212.

Damjanov, I. (1987). Biology of disease : lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* 57:5-20.

De Jonger, C.J., Tarchala, S.M., Rawlins, R.G., Binor, Z. y Radwanska, E. (1993). Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and in vitro fertilization. *Human Reprod.* 8:253-257.

De Maistre, E., Bene, M.C., Foliguet, B., Touati, F. y Faure, G.C. (1996). Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm: a flow cytometric analysis. *Arch. Androl.* 37:179-187.

Fierro, R., Daniel, M., Foliguet, B., Bene, M.C., Barbarino-Monnier, P., Faure, G.C. y Grignon, G. (1996). Acrosome reaction of human sperm: application of TEM/flow cytometry. *ACDS.* 12:109-111.

Fierro, R., Bene, M.C., Foliguet, B., Faure, G.C. y Grignon, G. (1998). Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry. *Italian J. Anat. Embriol.* 103:75-84.

Flannery, B. y Epel, D. (1998). Effects of wheat germ agglutinin on tunicate egg activation and fertilization: is there a plasma membrane sperm receptor system on *Ascidia ceratodes* eggs? *Dev. Growth Differ.* 40:297-306.

Flesch, M.F., Voorhot, W.F., Colenbrander, B., Lambert, M.G., Golden, V. y Barend, M.G. (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol. Reprod.* 59:1530-1539.

Florman, H.M., Bechtol, K.B. y Wassarman, P.M. (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.* 106:243-255.

Flowers, W.L. (1998). Boar fertility and artificial insemination. *Proceeding of the 15 th IPVS Congress.*

Fraser, F.R. y McDermott, C.A. (1992). Ca^{2+} related changes in the mouse sperm capacitation state a possible role for Ca^{2+} ATPase. *J. Reprod. Fertil.* 96:363-377.

Gabriel, L.K., Franken, D.R., Van der Horst, G., Kruger, T.F. y Oehninger, S.C. (1994). Wheat germ agglutinin receptors on human sperm membranes and sperm morphology. *Andrologia.* 1994:5-8.

Gahmberg, C.G., Kotovuori, P. y Tontti, E. (1992). Cell surface carbohydrate in cell adhesion. Sperm cells and leukocytes bind to their target cells through specific oligosaccharide ligands. *APMIS.* 100:39-52.

García, A. (1994). Criterios para seleccionar cerdas de reemplazo en granjas comerciales de ciclo completo (México: Colegio de Postgraduados), pp. 185.

Garner, D.L. y Hafez, E.S.E. (1993). Spermatozoa and seminal plasma. In *Reproduction in farm animals*, E.S.E. Hafez, ed. (Filadelfia: LEA & FEBIGER), pp. 165-187.

Graham, J.K., Kunze, E. y Hammersted, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43:55-64.

Hafez, E.S.E. (1993). *Reproduction in farm animals*, 6a. Ed (Filadelfia: Lea & Febiger) pp. 573

Haynes, J.L. (1988). Principles of flow cytometry. *Cytometry supplement.* 17:7-17.

Herrera, J.A., García, A., Zayas, H., Conejo, J., Jiménez, I., Fierro, R. y Betancourt, M. (2000). Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos con problemas reproductivos. *AIBIR.* 25:25-30.

Heywinkel, E., Freundl, G. y Hofmann, N. (1993). Acrosome reaction of spermatozoa with different morphology. *Andrology.* 25:137-139.

Holden, C.A., Hyne, R.V., Sathananthan, A.H. y Trounson, A.O. (1990). Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol. Reprod. Dev.* 25:247-257.

Holt, W.V. (1995). The sperm plasma membrane. In Colloque INSERM/John Libbey, P. Fenichel y J. Parinaud, eds. (EUROTEXT LTD), pp. 1-16.

Huang, T.T.F., Ohzu, E. y Yanagimachi, R. (1982). Evidence suggesting that L-fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. *Gamete Res.* 5:355-361.

Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D. y Spira, A. (1988). Male factors and likelihood of pregnancy in infertile couples: A study of sperm characteristics. *Int. J. Androl.* 11:379-394.

Kay, V.J. y Robertson, L. (1998). Hiperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 4:776-786.

Knobil, E. y Neill, J.D. (1994). *The Physiology of Reproduction*, Segunda Ed, Volumen 1 (New York: Raven Press Ltd) 400-450 pp.

Koehler, J.K. (1981). Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Mol. Reprod. Dev.* 6:197-217.

Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G. y Roberts, K.D. (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human

spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:7266-7270.

Lee, C.Y. y Wong, E. (1986). Developmental studies of sperm surface antigens using sperm-specific monoclonal antibodies. J. Reprod. Immunol. 9:275-287.

Lee, M. y Damjanov, I. (1985). Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. Anat. Rec. 212:282-287.

Lee, S.H. y Ahuja, K. (1987). An investigation using lectins of glycocomponents of mouse spermatozoa during capacitation and sperm-zona binding. J. Reprod. Fertil. 80:65-74.

Legault, Y., Bleau, G. y Chapdelaine, A. (1980). Steroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the estrous cycle. Biol. Reprod. 23:720-725.

Legault, Y., Bouthillier, M., Bleau, G. y Chapdelaine, A. (1979). The sterol and sterol sulfate content of the male hamster reproductive tract. Biol. Reprod. 20:1213-1219.

Loeser, C.R. y Tulsiani, D.R.P. (1999). The Role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. Biol. Reprod. 60:94-101.

Meizel, S. (1995). Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone. In *Human Sperm Acrosome Reaction*, P. Fénichel y J. Parinaud, eds. (Paris: INSERM/John Libbey Eurotext Ltd), pp. 151-164.

Mercado, E., Hicks, J.J., Drago, C. y Rosado, A. (1974). A study of the interaction of human spermatozoa membrane with ATP and cyclic-AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:185-188.

Miller, D.J. y Ax, R.L. (1990). Carbohydrates and fertilization in mammalian. *Mol. Reprod. Dev.* 26:184-198.

Mori, K., Daitoh, T., Irahara, M., Kamada, M. y Aono, T. (1989). Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161:207-211.

Nagai, T., Niwa, K. y Iritani, A. (1984). Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 70:271-275.

Parinaud, J., Mieusset, R., Vieitez, G., Labal, B. y Richoilley, G. (1993). Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil. Steril.* 60:888-892.

Ravid, A., Sagiv, M., Bartoov, B., Eltes, F., Novogrodski, A., Allalouf, D., Levinsky, H. y Singer, R. (1990). Separation of sub-populations of sperm

with higher fertility potential from normal and pathological semen by PNA. *Andrologia*. 22:225-260.

Rillo, M., Martínez, E., García, C. y De Alba, C. (1996). Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Dom. Anim.* 31:519-526.

Rosado, A., Velazquez, A. y Lara, R. (1973). Effect of neuromidase and follicular fluid upon the surface characteristic of the human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 24:349-354.

Runnebaum, I.B., Schill, W.B. y Topfer-Petersen, E. (1995). Con-A binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia*. 27:81-90.

Schackman, R.W. y Shapiro, B.M. (1981). A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 81:145-154.

Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. y Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Hum. Reprod. Update*. 5:302-313.

Shalgi, R., Maymon, R., Bar-Shira, B., Amihai, D. y Skutelsky, E. (1991). Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29:365-372.

Storey, B.T., L, H.C. y Kim, J.B. (1992). A transient rise in intracellular Ca^{2+} is a precursor reaction to the zona pellucida induced acrosome reaction in mouse sperm and is blocked by the induced acrosome reaction inhibitor 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol. Reprod. Dev.* 32:41-50.

Suzuki, F. (1990). Morphological aspects of sperm maturation: modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport. In *Fertilization in mammals*, B. Bavister y J. Cummins, eds. (Massachusetts: Serono Symposia), pp. 65-75.

Tao, J., Critser, E.S. y Critser, J.K. (1993). Evaluation of mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 36:183-194.

Tesarik, J. (1986). From the cellular to the molecular dimension: the actual challenge for human fertilization research. *Gamete Res.* :47-89.

Tesarik, J., Carreras, A. y Mendoza, C. (1991). Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 56:113-118.

Topfer-Petersen, E., Januschke, E., Schmoeckel, C. y Schill, W.B. (1984). Ultrastructural localization of lectin binding sites of the acrosomal membrane system of boar spermatozoa. *Andrologia.* 16:539-547.

Tulsiani, D.R., Komiya, Y.H. y Araki, Y. (1997). Mammalian Fertilization: A Carbohydrate-Mediated Event. *Biol. Reprod.* 57:487-494.

Vazquez, J.M., Martinez, E., Pastor, L.M., Roca, J., Matas, C. y Calvo, A. (1996). Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochem.* 98:93-100.

Watson, E.A. y Erba, E. (1994). Flow citometry in animal cell culture. A Practical approach, 2a Ed, R.l. Freshney, ed. (Oxford: Oxford University Press) 165-212 pp.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. En: *The physiology of reproduction*, E. Knobil y J.D. Neill, eds. (New York: Raven Press Ltd), pp. 189-317.

Youssef, H.M., Doncel, G.F., Bassiouni, B.A. y Acosta, A.A. (1996). Mannose- binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. *Fertil. Steril.* 66:640-645.